

G. DI LECCE¹, M. R. LOIZZO²,
E. BOSELLI¹, A. GIOMO¹,
N.G. FREGA¹

Caratterizzazione analitico-sensoriale di oli vergini di oliva campani

PROGRESS IN NUTRITION
VOL. 11, N. 3, 170-177, 2009

TITLE
Chemical and sensory
characterization of virgin olive
oils from Campania

KEY WORDS
Virgin olive oil, phenolic
compounds oxidative stability,
HPLC/DAD-MS²

PAROLE CHIAVE
Olio vergine di oliva, composti
fenolici, stabilità ossidativi,
HPLC/DAD-MS²

¹Dipartimento di Scienze degli
Alimenti, Università Politecnica delle
Marche, Ancona, Italia

²Dipartimento di Scienze
Farmaceutiche, Facoltà di Farmacia,
Scienze della Nutrizione e della
Salute, Università della Calabria,
Rende (CS), Italia

Indirizzo per corrispondenza:
Dr. Emanuele Boselli
Dipartimento di Scienze degli Alimenti,
Università Politecnica delle Marche,
Via Breccie Bianche
60131 Ancona, Italia
E-mail: e.boselli@univpm.it

Summary

Twenty extra virgin olive oils from Campania (Italy) were characterized for their chemical and sensory properties. The phenolic profile was evaluated using high performance liquid chromatographic coupled with mass spectrometry of second order. The fatty acid profile, the oxidative stability (rancimat test), the total phenols, the free acid and the peroxide value were compared with the sensory score obtained using a trained panel. The phenolic profile resulted to be strictly related to the preference of the panel, as well as to the oxidative parameters of the oils.

Riassunto

Venti campioni di oli extravergine di oliva campani sono stati sottoposti ad un'indagine analitico-sensoriale al fine di valutare le proprietà chimiche e sensoriali. Il profilo fenolico è stato ottenuto mediante cromatografia liquida ad alta risoluzione accoppiata alla spettrometria di massa di secondo ordine. Sono stati determinati anche la composizione acidica, la stabilità ossidativa mediante rancimat test, i polifenoli totali, l'acidità libera e il numero di perossidi. I risultati sono stati messi in relazione con il profilo sensoriale elaborato da un panel di assaggiatori esperti. Il profilo fenolico analizzato, si è dimostrato strettamente correlato sia al giudizio del panel, che ai parametri della stabilità ossidativa degli oli.

Introduzione

L'olio vergine di oliva (VOO) presenta caratteristiche organolettiche e proprietà nutrizionali differenti da tutti gli altri oli di origine vegetali. Secondo il regolamento 2568/91 e successive modifiche, l'olio vergine di oliva, è ottenuto esclusivamente mediante processi meccanici e non

richiede nessun trattamento di raffinazione per poter essere utilizzato. L'olio di oliva è l'unico alimento per cui l'analisi sensoriale è un parametro di qualità.

La composizione chimica dell'VOO, la stabilità ossidativa e le caratteristiche sensoriali sono intimamente connesse alle condizioni pedoclimatiche (1, 2), alle pratiche

agronomiche (3, 4), alla cultivar impiegata (5), al grado di maturazione delle drupe (6), e al processo tecnologico di trasformazione (7).

Il caratteristico profilo sensoriale, in particolare le sensazioni di fruttato ed erbaceo, derivano dalla degradazione di acidi grassi polinsaturi (acido linoleico e linolenico), che attraverso reazioni enzimatiche a catena, conosciute come "via della lipossigenasi", vengono generate durante il processo estrattivo. Oltre ai composti volatili, anche le sostanze a struttura fenolica, chiamate erroneamente polifenoli, partecipano alla strutturazione del flavour di un olio vergine di oliva. I composti fenolici infatti, oltre ad espletare la loro azione antiossidante (8), prolungando la shelf-life del prodotto (9) e giocano un ruolo di primaria importanza nella caratterizzazione dei sentori gustativi. Infatti, gli attributi sensoriali di amaro e piccante che si riscontrano comunemente negli oli vergini di oliva, sono stati attribuiti rispettivamente al contenuto di oleuropeina aglicone nella forma aldeidica e dialdeidica (10), e alla forma dialdeidica del decarbossimetil-ligstroside aglicone (11).

In questo lavoro, sono stati caratterizzati venti campioni di oli vergine di oliva campani prodotti nella campagna olearia 2007. Per tutti i campioni è stato valutato il profilo dei composti fenolici mediante cromatografia liquida ad alta presta-

zione, accoppiata alla spettrometria di massa. È stata determinata la composizione degli acidi grassi, la stabilità ossidativa e i polifenoli totali mediante saggio colorimetrico, l'acidità libera, il numero di perossidi e il profilo sensoriale.

Materiali e metodi

Campioni, reagenti, solventi e standards

La sperimentazione è stata condotta su venti campioni di olio vergine di oliva, prodotti nella regione Campania, nella campagna olearia 2007. I campioni, certificati UNI10939:2001, sono stati stoccati al buio e a una temperatura di circa 10°C, in bottiglie ambrate.

Il reagente Folin-Ciocalteu è stato fornito dalla Merck & Co. Inc. (Darmstadt, Germany). Gli standard analitici dei metilesteri degli acidi grassi e dei composti fenolici sono stati forniti dalla Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), dalla Supelchem Inc. (Bellefonte, PA), da Extrasynthèse (Genay, France), e Fluka (Buchs, Switzerland). Tutti i solventi utilizzati erano di grado analitico o per HPLC.

Determinazioni analitiche

La determinazione dell'acidità libera (% di acido oleico in 100 g di

olio), del numero di perossidi (meq O₂ kg⁻¹ di olio) e l'analisi sensoriale sono state effettuate in accordo ai metodi standards messi appunto dalla CEE (1991) (12) e dal COI (2003).

I metilesteri degli acidi grassi (FAME), dei venti campioni di olio, sono stati ottenuti utilizzando KOH 1M e seguendo il metodo di Christie (13). I FAMES sono stati determinati mediante gas-cromatografia utilizzando un gas-cromatografo ad alta risoluzione (HRGC) Mega 2 series Model MFC 800 (Fisons Instruments, Milano, Italia). Le condizioni analitiche dello strumento sono state descritte da Boselli et al, 2008 (14). La stabilità ossidativa degli oli è stata valutata attraverso il Rancimat (Metrohm model 679, Herisau, Svizzera), uno strumento che misura il tempo di induzione all'ossidazione forzata di un campione di olio di 5 g, termostato a 110°C e sottoposto ad un flusso di aria di 20 L h⁻¹. La resistenza all'ossidazione è espressa in ore.

La frazione fenolica è stata estratta seguendo la procedura descritta da Montedoro et al (15). Successivamente l'estratto fenolico è stata ripreso in un mL di metanolo e filtrato attraverso un filtro di cellulosa rigenerata da 0,2 µm (Schleicher & Schuell, Dassel, Germania).

L'estratto è stato impiegato per la determinazione dei polifenoli to-

tali in accordo con il metodo spettrofotometrico di Singleton et al, (16); i risultati sono stati espressi come mg di acido gallico in un kg di olio facendo riferimento ad una curva di taratura ($r^2=0.993$).

Profilo cromatografico dei composti fenolici ottenuto in HPLC-DAD-MS/MS

L'identificazione dei composti fenolici è stata eseguita attraverso cromatografia liquida ad elevata prestazione (HPLC), accoppiata ad un rivelatore a fotodiodi (DAD) e ad uno spettrometro di massa di secondo ordine (ESI-MS/MS). Un'aliquota di estratto fenolico è stata iniettata, tramite loop da 20 μL , in un sistema HPLC.

La pompa era Varian 9010 (Middelburg, Paesi Bassi). La colonna HPLC, da 25 cm e 4,6 mm i.d., era impaccata con fase stazionaria Chromspher C18 (diametro delle particelle 5 μm , Chrompack, Middelburg, Paesi Bassi). La separazione è avvenuta con gradiente di flusso, utilizzando i solventi A (acido acetico al 2% in acqua) e B (metanolo al 100%), nelle proporzioni descritte da Boselli et al (17); il flusso HPLC era di 800 $\mu\text{L}/\text{min}$. I rivelatori erano uno spettrometro di massa LCQ-Duo (Thermoquest, San José, USA) ed un rivelatore a fotodiodi Varian Prostar PDA 330 (Middelburg, Paesi Bassi), disposti in parallelo. Gli spettri

di massa sono stati ottenuti con l'interfaccia ad elettronebulizzazione (ESI) e ionizzazione negativa e positiva dell'eluente. I dati sono stati elaborati tramite il software Excalibur (Thermoquest).

I profili cromatografici degli acidi fenolici, dei fenil-etil-alcoli e dei secoiridoidi sono stati registrati nell'ultravioletto ad una lunghezza d'onda pari a 280 nm, i flavoni a 350 nm. I dati per l'analisi quantitativa sono stati acquisiti utilizzando il software Varian Star 6.3 (Walnut Creek, CA, USA). Al fine di quantificare i composti fenolici, sono state costruite rette di taratura: i flavoni sono stati espressi in mg Kg^{-1} di quercetina ($r^2=0.997$), gli acidi fenolici, i fenil-etil-alcoli e i secoiridoidi in mg Kg^{-1} di 3,4 diidrossifenilacetico ($r^2=0.998$).

Analisi statistica

L'analisi delle componenti principali, è stata effettuata al fine di individuare potenziali relazioni tra i dati ottenuti dalle diverse analisi e per caratterizzare gruppi di campioni e determinare eventuali differenze. Per questo scopo è stato utilizzato il software *Unscrambler* (CAMO, Corvallis, USA).

Risultati e discussione

I venti campioni di oli vergine di oliva campani sono stati caratteriz-

zati mediante analisi chimiche e sensoriali. Dall'analisi dei parametri di qualità, quali acidità libera, numero di perossidi e analisi sensoriale, tutti i campioni sono risultati appartenenti alla categoria merceologica degli oli extravergine. I giudizi sensoriali, ottenuti da un panel, costituito da dieci assaggiatori esperti, sono stati elaborati ed i campioni sono stati suddivisi in quattro gruppi di preferenza (gradimento > dell'80%: campioni n. 10, 18, 22, 28, 30, 32; campioni tra il 50 e 75%: 3, 6, 8, 25, 31, 37; tra il 40 e il 50%: 15, 20, 23, 24; e un gradimento < del 40%: 7, 21, 29 e 33). Il panel ha caratterizzato i campioni in analisi secondo i seguenti descrittori: punteggio totale, fruttato d'oliva, sensazioni erbacee, intensità olfattiva e sensazioni di amaro e piccante. Correlazioni positive sono state riscontrate tra il punteggio totale e l'intensità olfattiva ($r^2=0,94$), tra quest'ultima e il fruttato d'oliva ($r^2=0,80$) e tra le sensazioni di amaro e piccante ($r^2=0,66$).

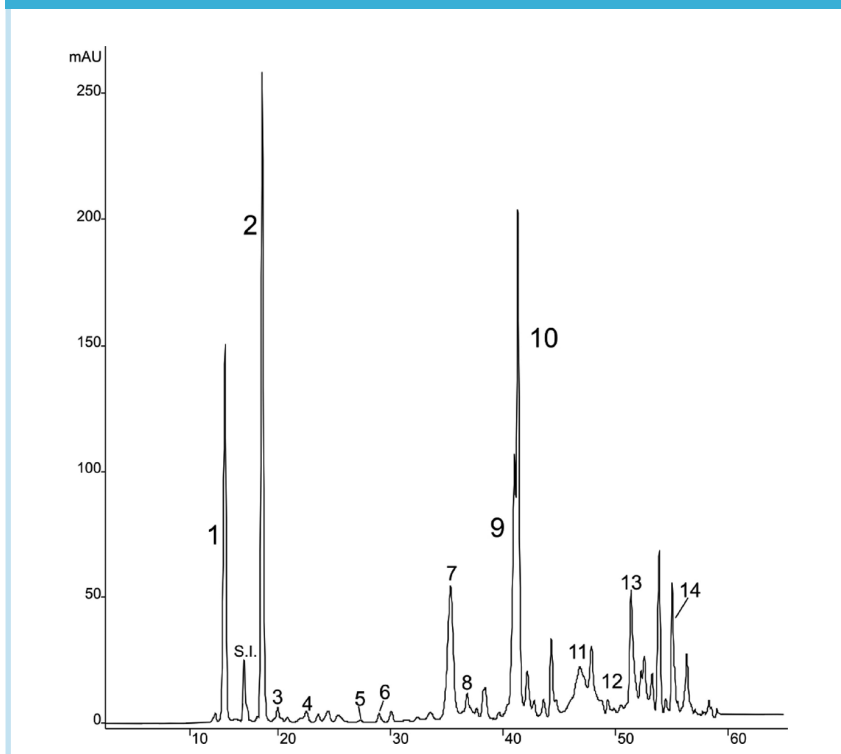
La stabilità ossidativa degli oli, misurata come tempo di induzione all'ossidazione forzata, risulta essere compresa tra le 11,9 e 32 ore rispettivamente per i campioni 28 e 31.

I fenoli totali, analizzati mediante reattivo di Folin-Ciocalteu, sono compresi tra 94.1 e 250.5 mg Kg^{-1} di acido gallico. I dati della stabilità ossidativa e del contenuto in fe-

noli totali, riscontrati negli oli in analisi, sono da considerarsi in linea con i risultati ottenuti da altri autori, e mostrano una debole correlazione positiva ($r^2=0,36$). In merito alla composizione in acidi grassi, tutti i campioni in analisi, ad eccezione degli oli identificati con il numero 21 e 28, presentano una distribuzione pressochè identica. Le percentuali dell'acido più rappresentativo, l'acido oleico, sono comprese tra il 71 e il 78%. I campioni 21 e 28, mostrano bassi valori di acido oleico, rispettivamente 62 e 64%, mentre alto è il contributo apportato dall'acido linoleico e dall'acido palmitico.

Dall'analisi del profilo fenolico (Fig. 1), ottenuto in HPLC-DAD-MS/MS, sono stati identificati e quantificati 14 composti fenolici. Il 3,4-diidrossifeniletanolo (idrossitirosolo, 3,4-DHPEA), e il *p*-idrossifeniletanolo (tirosolo, *p*-HPEA), sono i fenil etil alcoli principali. Tutti i campioni mostrano livelli inferiori ai 10 mg Kg⁻¹, per entrambi gli alcoli; unica eccezione è rappresentata dal campione 25 (Tab. 1). L'acido vanillico, la vanillina, l'acido *p*-cumarico, l'acetato del 3,4 diidrossifeniletanolo, la luteolina e l'apigenina sono presenti in quantità riconducibili a qualche parte per milione (Tab. 1). I secoiridoidi, caratteristici del frutto dell'*Olea europaea*, sono i composti fenolici maggiormente presenti. Le molecole iden-

Figura 1 - Profilo fenolico ($\lambda = 280$ nm) del campione 25: 1, 3,4-DHPEA; 2, *p*-HPEA; 3, acido vanillico; 4, vanillina; 5, 3,4-DHPEA-Ac; 6, acido *p*-cumarico; 7, 3,4-DHPEA-EDA; 8, 3,4-DHPEA-EDA-Ox; 9, *p*-HPEA-EDA; 10, *p*-HPEA-EDA-Ox; 11, 3,4-DHPEA-EA; 12, LA; 13, luteolina; 14, apigenina



tificate e appartenenti a questa classe di composti sono: l'oleuropeina aglicone (3,4-DHPEA-EA), il ligstroside aglicone (LA), la forma dialdeidica decarbossimetilata dell'oleuropeina (3,4-DHPEA-EDA), e del ligstroside aglicone (*p*-HPEA-EDA), e le rispettive forme ossidate. I campioni 8, 22 e 31, che presentano elevate quantità di 3,4-DHPEA-EDA e *p*-HPEA-EDA, mostrano contemporaneamente bassi livelli

dei corrispondenti secoiridoidi ossidati. Correlazione positiva ($R^2=0,66$) è stata riscontrata tra il contenuto di 3,4-DHPEA-EDA e il risultato relativo al test ossidativo. L'oleuropeina aglicone, presenta valori compresi tra 1 e 30 mg Kg⁻¹, mentre il ligstroside aglicone mostra quantità non superiori ai 5,2 mg Kg⁻¹. Interessanti sono state le correlazioni osservate sia tra la somma dei composti fenolici quantificati in HPLC e il conte-

Tabella 1 - Composti fenolici quantificati. L'idrossitiroso (3,4-DHPEA), il tirosolo (*p*-HPEA), l'acido vanillico, la vanillina, l'acetato del 3,4-diidrossifenilietilalcol (3,4-DHPEA-Ac), l'acido *p*-cumarico, la forma dialdeidica dell'acido elenolico legata all'idrossitiroso (3,4-DHPEA-EDA), la forma ossidata (3,4-DHPEA-EDA-Ox) la forma dialdeidica dell'acido elenolico legato al tirosolo, (*p*-HPEA-EDA), la forma ossidata (*p*-HPEA-EDA-Ox), l'oleuropeina aglicone (3,4-DHPEA-EA) e il ligitroside aglicone (LA), sono espressi in mg Kg⁻¹ di acido 3,4-diidrossifenilacetico. La luteolina e l'apigenina in mg Kg⁻¹ di quercetina

Campioni composti fenolici	3	6	7	8	10	15	18	20	21	22	23	24	25	28	29	30	31	32	33	37
3,4-DHPEA	3,89	5,03	2,99	5,24	4,36	1,85	1,03	0,19	8,37	2,84	5,16	1,38	15,2	7,22	2,97	0,90	5,70	1,38	2,49	1,72
<i>p</i> -HPEA	5,73	3,80	3,21	5,40	2,40	2,14	3,04	1,93	3,47	2,54	7,49	4,12	24,3	2,75	3,73	1,96	2,53	1,51	2,61	1,44
Ac. vanillico	1,62	0,02	0,02	3,37	1,52	9,01	0,97	0,80	1,08	2,18	1,66	1,36	0,85	2,73	-	1,21	-	-	0,95	-
Vanillina	1,70	1,68	0,77	1,92	0,82	0,46	1,83	0,99	2,09	2,10	2,57	1,54	0,75	3,21	1,11	1,64	1,32	0,79	0,72	0,54
3,4-DHPEA-Ac	-	1,48	0,45	-	1,79	2,07	1,83	-	1,75	2,53	0,96	1,39	0,40	1,70	-	0,44	0,56	0,38	0,27	0,58
Ac. <i>p</i> -cumarico	1,65	1,69	0,02	2,65	0,56	0,49	0,93	0,45	2,99	0,02	0,82	0,83	0,48	2,49	0,72	0,72	0,61	0,79	0,49	0,75
3,4-DHPEA-EDA	23,0	34,1	26,0	90,0	49,1	38,8	31,1	0,80	23,7	88,5	30,0	25,2	12,0	39,2	17,0	25,8	129	52,4	9,6	51,0
3,4-DHPEA-EDA-Ox	9,71	10,2	3,77	2,25	7,36	6,30	1,18	1,63	15,2	2,52	4,37	6,55	2,22	14,3	2,48	3,93	2,10	1,26	3,19	5,43
<i>p</i> -HPEA-EDA	44,0	23,2	24,9	52,0	34,6	25,5	50,9	13,3	18,5	83,7	42,0	58,3	12,6	21,4	30,7	45,2	60,1	44,0	16,2	32,1
<i>p</i> -HPEA-EDA-Ox	9,71	31,9	5,67	28,5	35,6	22,4	19,6	59,4	19,8	1,00	26,0	50,6	23,8	22,4	8,30	17,8	26,5	25,5	33,1	32,8
3,4-DHPEA-EA	19,3	22,5	9,00	20,5	27,4	8,40	16,6	0,08	17,6	25,1	14,3	7,30	10,0	22,8	11,8	12,2	29,8	2,40	7,70	17,6
LA	3,62	2,89	2,62	4,54	2,93	2,45	1,72	-	3,95	2,59	2,12	2,52	1,08	3,70	5,20	2,99	3,85	2,29	3,71	1,35
Luteolina	1,87	1,82	0,95	2,57	2,26	2,36	1,75	2,82	1,33	2,32	1,80	4,56	2,09	1,14	1,56	2,42	2,23	2,91	3,26	1,98
Apigenina	1,15	0,61	0,54	1,10	1,11	1,05	0,76	1,43	0,48	1,20	1,05	2,11	1,00	0,58	-	1,12	0,86	1,32	1,29	0,70
Totali	127	141	80,8	220	172	123	133	84,5	120	219	140	168	107	146	85,5	118	266	137	85,7	148

Figura 2A - Loading plot: delle variabili utilizzate nella PCA

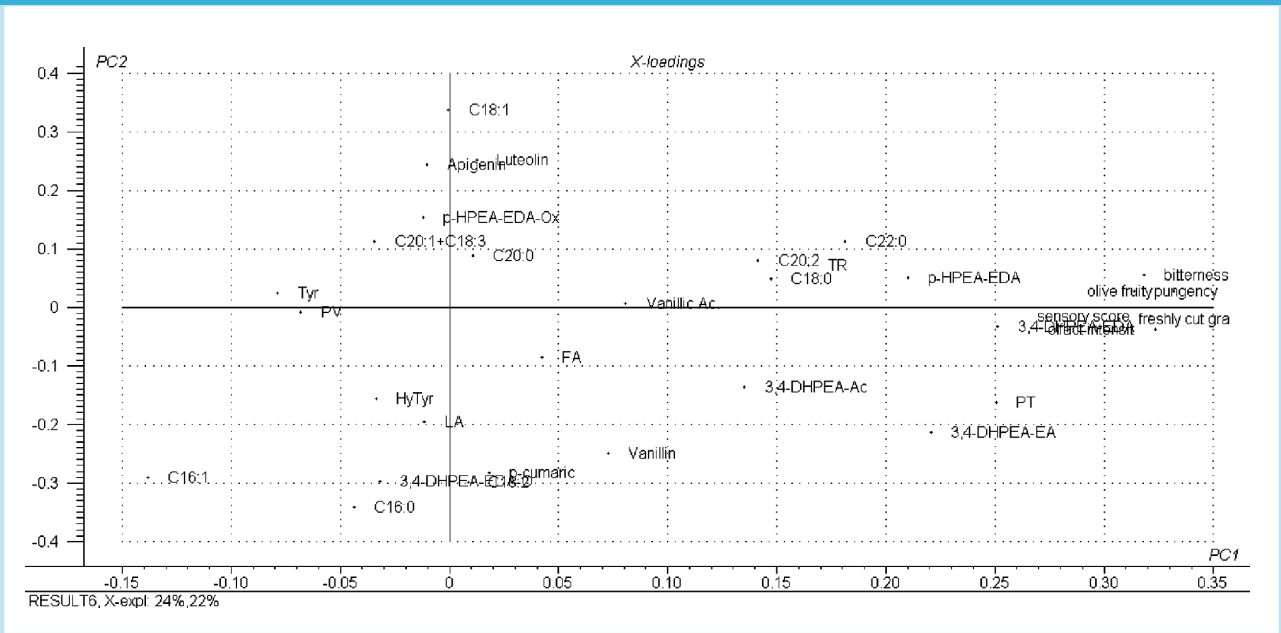
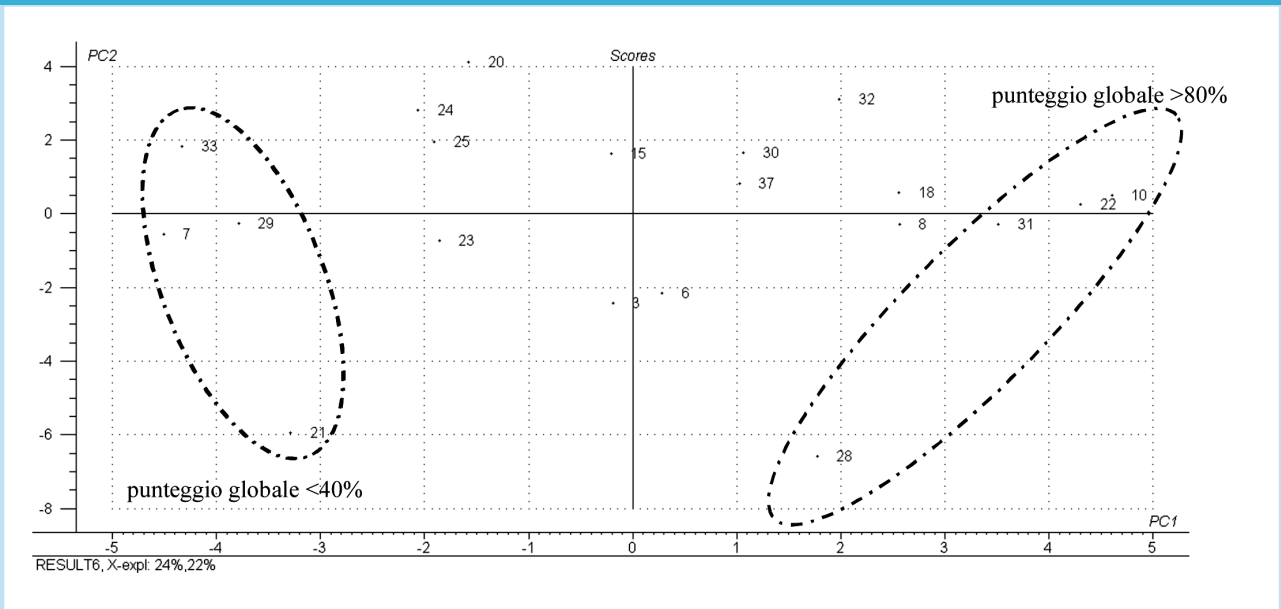


Figura 2B - Score plot: dei campioni elaborati con la PCA



nuto in fenoli totali ($r^2=0,73$), che con il tempo di rancimat ($r^2=0,52$). Le sensazioni gustative di amaro e piccante, sono i principali sentori attribuiti alle due forme dialdeidiche decarbossimetilate dell'oleuropeina e del ligstroside aglicone (18); anche in questo caso, è stata riscontrata una correlazione positiva tra il 3,4-DHPEA-EDA e la sensazione di amaro ($r^2=0,48$). In figura 2A, è mostrata la relazione esistente tra gli attributi sensoriali di amaro e piccante e le principali molecole appartenenti alla famiglia dei secoiridoidi: l'oleocantale (*p*-HPEA-EDA), il 3,4-DHPEA-EA e il 3,4-DHPEA-EDA. Sempre in figura 2A, è interessante notare che le forme ossigenate del 3,4-DHPEA-EDA e *p*-HPEA-EDA non mostrano nessuna correlazione con le sensazioni di amaro e piccante e con il tempo di rancimat; risultano invece strettamente connesse al numero di perossidi

Conclusioni

L'analisi delle componenti principali, ha permesso di riassumere i risultati, ottenuti sulla base di numerose variabili, in poche dimensioni, conservando il più possibile l'informazione presente nei dati originali. La figura 2B (*score plot*) evidenzia, in maniera univoca, la suddivisione dei campioni sulla

base del giudizio espresso dai panelisti e dai risultati ottenuti dalle diverse determinazioni analitiche. L'analisi sensoriale può risultare un metodo rapido e affidabile per ottenere informazioni sulla qualità degli oli vergini. Le determinazioni chimico-fisiche sono però imprescindibili dal concetto di qualità.

Bibliografia

1. Bonoli M, Bendini A, Cerretani L, Lercker G, Gallina Toschi T. Qualitative and semiquantitative analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oil as a function of the ripening degree of fruit by different analytical techniques. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 7026-32.
2. Morellò JR, Romero MP, Motilva MJ. Influence of seasonal conditions on the composition and quality parameters of monovarietal virgin olive oils. *J Am Oil Chem Soc* 2006; 83: 683-8.
3. Romero MP, Tovar MJ, Girona J, Motilva MJ. Changes in the HPLC phenolic profile of virgin olive oil from young trees (*Olea Europaea* L. Cv. Arbequina) grown under different deficit irrigation strategies. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 5349-54.
4. Servili M, Esposito S, Lodolini E, Selvaggini R, Taticchi A, Urbani S. Irrigation effects on quality, phenolic composition, and selected volatiles of virgin olive oils cv. Leccino. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 6609-18.
5. Olivares-Lopez MJ, Innocenti M, Giacherini C, Ieri F, Romani A, Mulinacci N. Study of the phenolic composition of spanish and italian monocultivar extra virgin olive oils: Distribution of lignans, secoiridoidic, simple phenols and flavonoids. *Talanta* 2007; 73: 726-32.
6. Rotondi A, Bendini A, Cerretani L, Mari M, Lercker G, Gallina Toschi T. Effect of olive ripening degree on the oxidative stability and organoleptic properties of cv. Nostrana di Brisighella extra virgin olive oil. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 3649-54.
7. Cerretani L, Bendini A, Rotondi A, Lercker G, Toschi TG. Analytical comparison of monovarietal virgin olive oils obtained by both a continuous industrial plant and a low-scale mill. *Eur J Lip Sci Technol* 2005; 107: 93-100.
8. Franconi F, Coinu R, Carta S, et al. Antioxidant effect of two virgin olive oils depends on the concentration and composition of minor polar compounds. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 3121-5.
9. Di Lecce G, Bendini A, Cerretani L, Bonoli-Carbognin M, Lercker G. Shelf stability of extra virgin olive oil under domestic conditions. *Ind Aliment-Italy* 2006; 461: 873-80.
10. Gutierrez-Rosales F, Rios JJ, Gomez-Rey ML. Main polyphenols in the better taste of virgin olive oil. Structural confirmation by on-line high-performance liquid chromatography electrospray. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 6021-5.
11. Andrews P, Busch JLHC, De Joode T, Groenewegen A, Alexandre H. Sensory properties of virgin olive oil polyphenols. Identification of deacetoxy-ligstroside aglycons as a key contributor to pungency. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 1415-20.
12. EC 1991 Commission Regulation (EEC) 2568/91 of 11 July 1991 on characteristics of olive oil and on the relevant methods of analysis. Official EC Journal, L248, 0001-0083.
13. Christie WW. The preparation of derivatives of fatty acid. In: *Gas Chromatography and Lipids*. The oily Press, Scotland 1998: 64-84.
14. Boselli E, Pacetti D, Lucci P, Di Lecce G, Frega NG. Supplementation with

- high-oleic sunflower oil and α -tocopheryl acetate: Effects on pork meat lipids *Eur J Lipid Sci Technol* 2008; 110: 381-91.
15. Montedoro GF, Servili M, Baldioli M, Miniati E. Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation and quantitative compounds and semi-quantitative evaluation by HPLC. *J Agric Food Chem* 1992; 40: 1571-6.
16. Singleton VL, Rossi JA Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 1965; 16: 144-58.
17. Boselli E, Di Lecce G, Minardi M, Pacetti D, Frega NG. La spettrometria di massa nell'analisi di componenti minori polari dell'olio vergine di oliva. *Riv It Sost Grasse* 2007; 84: 3-14.
18. Angerosa F. Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensory panels. *Eur J Lipid Sci Technol* 2002; 104: 639-60.