

## Determinazione dei pigmenti e loro legame con parametri di qualità e autenticità dell'olio di oliva extravergine

### I. INTRODUZIONE

L'olio di oliva extravergine è uno degli alimenti base della cucina e della cultura mediterranea, ma la sua importanza e il suo pregio ha ormai raggiunto le dimensioni internazionali. Il ruolo dell'olio di oliva extravergine nella dieta e i suoi benefici in termini di benessere fisico sono dimostrati da numerosi studi e ricerche in tutto il mondo. Gran parte di queste virtù sono date dall'elevato contenuto di sostanze "bioattive", ovvero sostanze con una specifica funzione nell'organismo di chi assume l'alimento, spesso legate al corretto funzionamento metabolico e altri aspetti della salute. Queste sostanze sono presenti in quantità maggiori nell'olio di oliva di tipo "extra-vergine" rispetto agli oli di oliva di minore qualità, e questo spiega in parte perché l'olio di oliva extravergine sia uno degli alimenti più soggetti a frode.

In questo contributo partiremo dalla descrizione della composizione chimica tipica degli oli di oliva extravergine per affrontare la problematica delle frodi e la necessità di trovare metodi sempre più robusti e sicuri per valutare l'autenticità di questo prezioso prodotto agro-alimentare. In particolare, ci soffermeremo poi su una delle componenti minoritarie degli oli rappresentate dai pigmenti, le sostanze responsabili del colore di un olio. Passeremo quindi in rassegna i metodi analitici più utilizzati per la determinazione dei pigmenti, e i risultati più significativi che recenti studi hanno evidenziato sulla relazione tra la concentrazione dei vari pigmenti e l'autenticità (e la qualità) degli oli di oliva extravergine. L'ultima parte del lavoro riguarderà un recente metodo spettroscopico sviluppato nel nostro gruppo di ricerca e le sue potenzialità applicative.

\* *Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale, Università di Pisa*

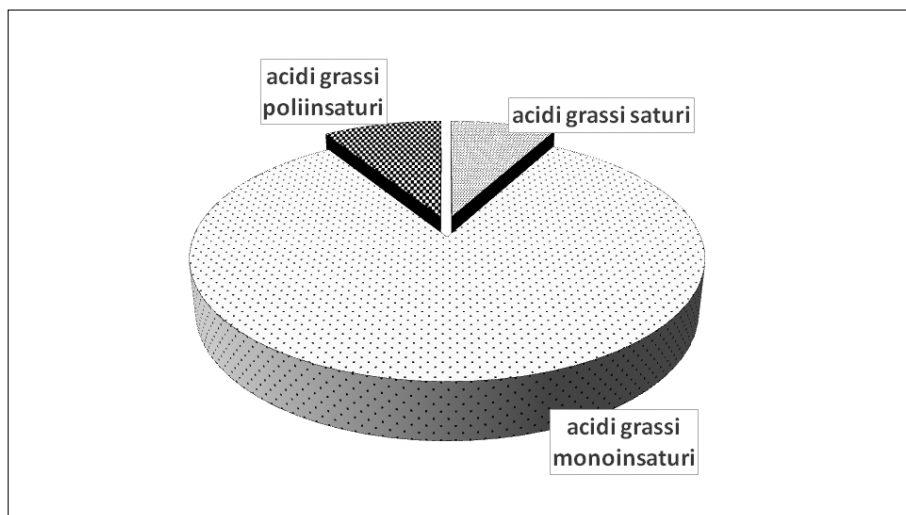


Fig. 1 *Distribuzione percentuale media degli acidi grassi che costituiscono la frazione saponificabile dell'olio di oliva extravergine*

### 1.1 *La composizione chimica di un olio di oliva extravergine*

Come la maggior parte degli alimenti, anche l'olio di oliva extravergine è una matrice molto complessa, un insieme di sostanze chimiche derivate in parte direttamente dal frutto dell'oliva e in parte conseguenti a processi di trasformazione che avvengono durante il processo di produzione dell'olio. Tipicamente queste sostanze si suddividono in due tipologie: la cosiddetta frazione saponificabile, che rappresenta circa il 98-99% dell'olio di oliva, e il rimanente 1-2% che costituisce la cosiddetta frazione insaponificabile (Boscou et al., 2006).

La frazione saponificabile è costituita per lo più da trigliceridi, e in minima parte da digliceridi, acidi grassi liberi, cere e fosfolipidi. Una delle caratteristiche che distingue l'olio di oliva extravergine da oli di oliva di minore qualità e da oli derivati da altri semi e frutti, è proprio l'alta percentuale di acidi grassi insaturi (fig. 1), che è ripartita tra acidi grassi monoinsaturi, come il maggioritario acido oleico (55-83%), e acidi poliinsaturi, come l'acido linoleico (5.5-20%) e l'acido linolenico (<0.1%). I rimanenti acidi sono i cosiddetti acidi grassi saturi, come il palmitico (5.5-20%) e lo stearico (0.5-5%).

La frazione insaponificabile dell'olio di oliva extravergine, pur rappresentando una bassa percentuale dell'alimento (1-2%), è ricca di molte sostanze (fig. 2) responsabili delle proprietà organolettiche e nutrizionali di questo prodotto. Tra i più importanti ricordiamo gli idrocarburi, che rappresentano circa la metà

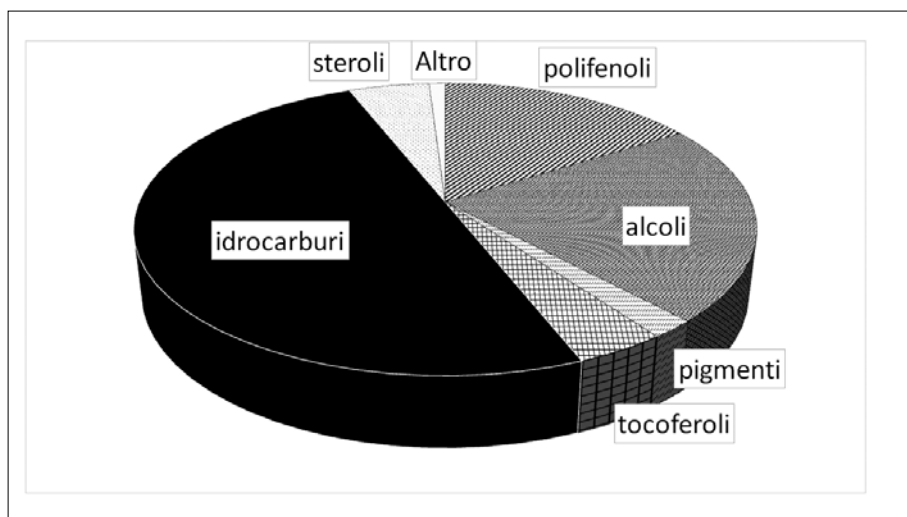


Fig. 2 Distribuzione percentuale media dei composti minoritari che costituiscono la frazione insaponificabile (1-2% del totale) dell'olio di oliva extravergine

dei componenti minoritari, tra cui ricordiamo lo squalene e i terpeni variamente sostituiti, seguono gli steroli, come lo stigmasterolo e il campesterolo, e i tocoferoli, come la vitamina E. Gli alcoli rappresentano circa il 20% dei composti minoritari e possono essere sia alcoli grassi che alcoli terpenici, come il geranilgeraniolo. Tra le sostanze minoritarie dalle importanti proprietà nutrizionali ci sono i polifenoli, una ricca e varia classe di composti antiossidanti, tra cui i più noti presenti nell'olio di oliva extravergine sono l'oleuropeina, l'oleacantale, il tirosolo, l'idrossitirosolo, l'apigenina e la luteolina.

Infine, ulteriori sostanze minoritarie sono i pigmenti, derivati della clorofilla e carotenoidi, che determinano il colore dell'olio di oliva, dal caratteristico giallo-verde, tipico degli oli appena franti, al giallo-oro degli oli più maturi (Minguez-Mosquera et al., 1990). Gli oli di oliva possono contenere da 5 a 100 ppm di pigmenti (1ppm = 1mg/Kg). Il contenuto in pigmenti, come vedremo, può essere associato alla qualità di un olio di oliva extravergine e alla sua "età".

### 1.2 I pigmenti caratteristici di un olio di oliva extravergine

Il legame tra colore e contenuto in pigmenti è ben noto in letteratura (Giuliani, 2011). La frangitura di olive molto verdi produce un olio dal tipico colore verde per l'alto contenuto in clorofille, mentre se le oli-

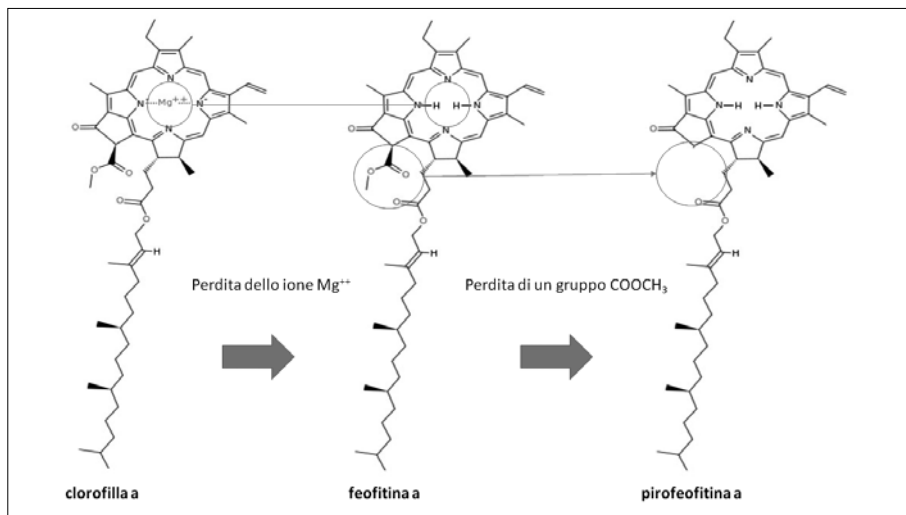


Fig. 3 Trasformazioni a cui è soggetta la clorofilla *a* nell'olio di oliva. Per effetto dell'acidità la clorofilla *a* si trasforma in feofitina *a* (perdita dello ione  $Mg^{++}$ ); per effetto di trattamenti termici o per irraggiamento luminoso la feofitina *a* si trasforma in pirofeofitina *a* (perdita di un gruppo funzionale  $COOCH_3$ )

ve sono più mature, la prevalenza di carotenoidi rispetto alle clorofille determina un colore tendente al giallo-oro. L'esatta combinazione e la proporzione tra pigmenti (Minguez-Mosquera e Garrido-Fernandez, 1989), che è quindi alla base del colore dell'olio, non dipende solo dalle caratteristiche del frutto delle olive (*Olea Europaea L.*), ma anche da altri fattori (Ramirez et al., 2015), come la cultivar, il grado di maturazione al momento della raccolta, le condizioni atmosferiche e pedo-climatiche, il processo di estrazione utilizzato per produrre l'olio (Criado et al., 2007b; Roca e Minguez-Mosquera, 2001) e, infine, le condizioni di conservazione (Guerrero et al., 2005).

La struttura molecolare delle clorofille (fig. 3) e, in particolare, la struttura planare del macrociclo tetrapirrolico coordinato da uno ione di magnesio,  $Mg^{++}$ , è responsabile dell'assorbimento di luce visibile nella regione del verde. La clorofilla *a* conferisce infatti una colorazione blu-verdognola, mentre la clorofilla *b* determina un colore verde-giallognolo. Tuttavia, nell'olio di oliva le clorofille si trasformano assai velocemente in feofitine, perché l'ambiente acido fa sì che lo ione  $Mg^{++}$  venga sostituito da due ioni  $H^+$  (fig. 3). Questa modifica strutturale, fa sì che anche il colore dell'olio si modifichi nel tempo. La feofitina *a* (fig. 3) è presente in quantità maggiori rispetto alla feofitina *b*. Se l'olio di oliva non è ben conservato, le feofitine

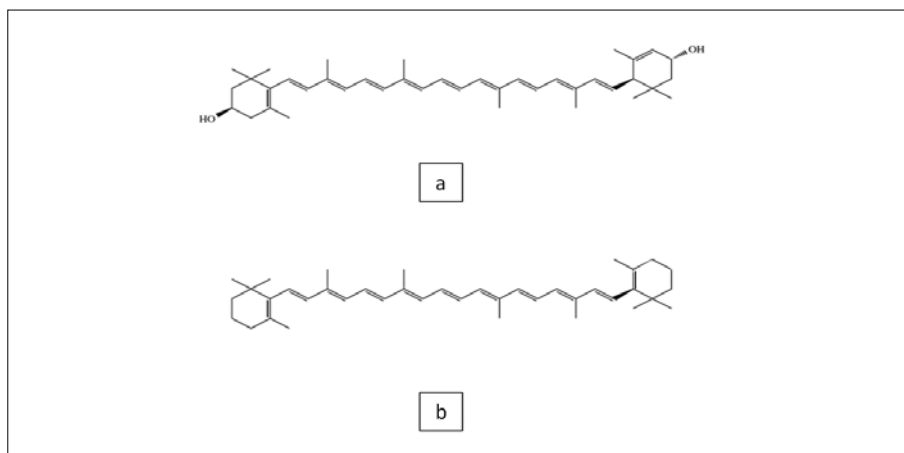


Fig. 4 *Struttura molecolare della luteina (a) e del  $\beta$ -carotene (b)*

possono trasformarsi ulteriormente (fig. 3), degradando a pirofeofitine (Gertz e Fiebing, 2006), la cui presenza può essere quindi considerata un indice di invecchiamento dell'olio.

Oltre ai derivati delle clorofille, i pigmenti nell'olio di oliva extravergine includono i carotenoidi, tra cui i maggioritari sono la luteina e il  $\beta$ -carotene (fig. 4). I carotenoidi sono composti isoprenoidi con una struttura idrocarburica con vari doppi legami,  $C=C$ , che sono responsabili delle loro interessanti proprietà come antiossidanti (Jaswir et al., 2011). I carotenoidi possono essere ulteriormente divisi in caroteni (che contengono solo atomi di carbonio e di idrogeno) e xantofille (che contengono anche atomi di ossigeno).

### 1.3 *L'autenticità di un olio di oliva extravergine e il problema delle frodi*

Valutare l'autenticità di un olio edibile è ad oggi ambito di numerose ricerche sia per garantire una maggiore protezione dei consumatori sia per evitare eventuali danni alle economie locali. Come si è potuto osservare anche negli ultimi anni, le frodi sui prodotti alimentari sono state al centro di numerose inchieste. Le frodi alimentari consistono in modifiche apportate intenzionalmente sui prodotti alimentari per ricavarne illeciti guadagni. Esistono diversi tipi di frodi, inerenti l'alterazione di un prodotto, e le principali possono essere così classificate (Spink e Moyer, 2013):

- *Adulterazione*: consiste nella sostituzione di una parte del prodotto con una di peggiore qualità o di più basso costo;

ADULTERANTE	MARKERS
Olio raffinato	1,2 digliceridi, 1,3 digliceridi Acidi grassi e cere Steroli Oligopolimeri dei triacilgliceroli
Olio di noci	Filbertone Composti polari Fosfolipidi Steroli Tocoferoli
Oli vegetali	Acidi grassi Trigliceridi Tocoferoli Acidi amminici

Tab. 1 *Alcuni tra gli adulteranti più utilizzati (olio raffinato, olio di noci e altri oli vegetali) nelle adulterazioni dell'olio di oliva extravergine e sostanze (marker) la cui presenza o una particolare concentrazione può rivelare la presenza dell'adulterante*

- *Sofisticazione*: consiste in un miglioramento dell'aspetto del prodotto in seguito all'aggiunta di sostanze, come coloranti;
- *Falsificazione*: consiste nella sostituzione di un prodotto con un altro;
- *Contraffazione*: consiste nell'usare marchi o nomi di prodotti tipici in modo inadeguato.

Nel caso dell'olio di oliva extravergine si assiste purtroppo alla presenza sul mercato di numerose frodi che ne fanno l'alimento in assoluto più frodato. Per questo motivo molte ricerche scientifiche sono rivolte proprio allo sviluppo di metodi analitici in grado di rivelare la presenza di adulterazioni e di valutare l'autenticità dei prodotti in commercio (Angerosa et al., 2006).

In tabella 1 sono riportate le tre adulterazioni di un olio di oliva extravergine più comuni e i relativi *marker* adottati per valutarne l'autenticità.

Recenti studi hanno proposto una metodologia analitica basata sulle proprietà chimico-fisiche di un olio, quali densità e indice di riflessione, per quantificare basse quantità di olio di oliva raffinato; il metodo è stato poi esteso anche ai casi di aggiunta di olio di mais o di girasole, permettendo di determinare eventuali impurità durante il processo di produzione dell'olio (Torrecilla et al., 2011). Come mostrato in tabella 1, per rilevare quantità di olio di oliva raffinato in oli di oliva extravergine, i *marker* adottati sono per lo più composti minoritari bioattivi (Fragaki et al., 2005). Tali miscele non producono modifiche facilmente rilevabili sulla composizione chimica della miscela finale a causa delle condizioni blande adottate nel processo di deodorizzazione, e di conseguenza l'identificazione di un eventuale adulterazione è molto impegnativa (Saba et al., 2005). A titolo di esempio, possiamo

	COI	CODEX ALIMENTARIUS	EC
acidità libera	X	X	X
indice di perossidi	X	X	X
assorbimento ultravioletto (UV)	X	X	X
analisi sensoriale	X	X	X
solventi volatili alogenati	X	X	X
$\alpha$ -tocoferoli	X	X	
determinazione di Cu, Fe, Pb e As	X	X	
impurità insolubili	X	X	
contenuto frazione insaponificabile	X	X	

Tab. 2 *Parametri di qualità fissati dalle tre principali organizzazioni internazionali che si occupano di normare il settore dell'olio*

soffermarci sul primo caso riportato in tabella 1: i composti 1,2 digliceridi e 1,3 digliceridi. In oli di oliva extravergine, i digliceridi sono presenti infatti in forma 1,2 e 1,3, rispettivamente riconducibili all'incompleta biosintesi dei trigliceridi e all'idrolisi chimica o enzimatica dei trigliceridi formati prima o durante il processo di estrazione dell'olio. Oli ottenuti da olive di scarsa qualità comportano un aumento della forma 1,3 diglicerica, mentre oli ottenuti da frutti sani contengono esclusivamente la forma isomerica 1,2. Processi blandi di raffinazione degli oli di oliva vergine, comprensivi di neutralizzazione, lavaggio e deodorizzazione a basse temperature, comportano una diminuzione del contenuto di digliceridi e un aumento del rapporto 1,3 digliceridi / 1,2 digliceridi (Pérez-Camino et al., 2001). Tale valore viene infatti considerato un possibile marker della freschezza di un olio, considerata la spontanea trasformazione della forma isomerica 1,2 nella forma 1,3 durante la conservazione di un olio. Tra i metodi più utilizzati per determinare questo parametro, si distinguono metodi cromatografici e metodi basati sulla spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (Mannina et al., 2003; Spyros e Dais, 2000).

Sia l'analisi chimico-fisica che quella sensoriale sono necessarie per avere una valutazione integrale della qualità di un olio di oliva; esse infatti risultano procedure complementari. L'analisi chimica fornisce informazioni inerenti allo stato attuale dell'olio, ma non vi è un unico test in grado di darci il quadro completo di tutto. Le varie analisi eseguite sugli oli di oliva sono utili per determinare i cosiddetti parametri di qualità e di autenticità o genuinità. I parametri di qualità sono riconducibili ai processi idrolitici e ossidativi che avvengono nelle olive, durante la filiera produttiva e durante il periodo di conservazione dell'olio. In tabella 2 (Boskou et al., 2006) sono riportati i vari parametri di qualità adottati dai tre enti principali: il Concilio Internazionale dell'Olio (COI), il *Codex Alimentarius* e la Comunità Europea (EC).

CATEGORIA	OLIO EXTRAVERGINE DI OLIVA	OLIO VERGINE DI OLIVA	OLIO DI OLIVA VERGINE LAMPANTE	OLIO DI OLIVA RAFFINATO	OLIO DI OLIVA	OLIO DI SANSA OLIVA GREGGIO	OLIO DI SANSA DI OLIVA RAFFINATO	OLIO DI SANSA DI OLIVA
Acidità % (*)	≤0,8	≤2,0	>2,0	≤0,3	≤1,0	-	≤0,3	≤1,0
Indice di perossidi meqO <sub>2</sub> /Kg	≤20	≤20	-	≤5,0	≤15	-	≤5,0	≤15
K <sub>232</sub>	≤2,5	≤2,6	-	-	-	-	-	-
K <sub>270</sub> (**)	≤0,22	≤0,25	-	≤1,10	≤0,90	-	≤2,00	≤1,70
Delta-K	≤0,01	≤0,01	-	≤0,16	≤0,15	-	≤0,20	≤0,18
Solventi alogenati volatili								
Ciascun solvente								
Sommatoria (***)	≤0,1	≤0,1	-	≤0,1	-	≤0,1	≤0,1	≤0,1
	≤0,2	≤0,2	-	≤0,2	-	≤0,2	≤0,2	≤0,2
Valutazione organolettica	Md=0	Md≤3,5	Md≥3,5	-	-	-	-	-
Mediana dei difetti Md								
Valutazione organolettica	Mf>0	Mf>0	-	-	-	-	-	-
Mediana del fruttato Mf								

(\*) è espressa come quantità di acido oleico in 100 gr di olio.  
(\*\*) K<sub>270</sub> se il solvente è cicloesano, K<sub>268</sub> se il solvente è isotano.  
(\*\*\*) è una misura della quantità di cloroformio, tricloroetilene e tetracloroetilene.

Tab. 3 *Parametri di qualità definiti dalla normativa della Comunità Europea*

Prendendo in esame solo i parametri di qualità adottati dalla Comunità Europea, i limiti di legge per ciascuna categoria di olio sono riportati in tabella 3.

Come si può notare, la Comunità Europea non ha ancora recepito molte delle indicazioni della comunità scientifica che riguardano i composti minoritari, che, per legge, non vengono quindi presi in considerazione per la definizione dell'autenticità dell'olio di oliva extravergine. Tuttavia, molti dei composti minoritari sono presenti in quantità significative solo negli oli di oliva extravergine e la loro quantificazione potrebbe aiutare notevolmente il settore dell'olio.

In questo contesto, molte ricerche scientifiche si sono dedicate negli ultimi anni allo studio dei composti minoritari, come il tirosolo ed i suoi derivati e vari tipi di tocoferoli. Nelle pagine seguenti ci soffermeremo soprattutto sui



pigmenti. Anche i pigmenti possono essere infatti oggetto di frodi. Una delle sofisticazioni più emblematiche riguarda l'aggiunta nell'olio di oliva extravergine del colorante E141, ovvero un derivato della clorofilla contenente al posto dello ione  $Mg^{2+}$  uno ione di  $Cu^{2+}$ . Evidentemente anche il colore di un olio può essere quindi alterato in modo non naturale. Fortunatamente è stato messo a punto un semplice esame chimico in grado di rivelare la presenza di E141, tramite l'analisi dell'assorbimento nella regione dell'ultravioletto-visibile dell'olio in esame (Del Giovine e Fabietti, 2005).

## 2. METODI DI ANALISI PER DETERMINARE I PIGMENTI IN OLIO DI OLIVA EXTRAVERGINE

In letteratura sono presenti molti lavori inerenti l'identificazione in matrici oleose dei pigmenti, volte sia a una differenziazione geografica o varietale, sia a evidenziare possibili adulterazioni (Lazzerini et al., 2016b). Le metodologie analitiche possibili possono essere suddivise in due categorie: tecniche cromatografiche e tecniche spettroscopiche. Le prime sono contraddistinte da diversi pretrattamenti del campione, quali estrazione ed eventuali saponificazioni (Psoiadou e Tsimidou, 1998), mentre le seconde risultano essere analisi immediate, dirette. Dunque, se da un lato con le tecniche cromatografiche le perdite di campione possono risultare più elevate, dall'altro con le tecniche spettroscopiche risulta spesso necessario utilizzare una elaborazione dei dati più complessa per interpretare correttamente i dati ottenuti (Pizarro et al., 2013).

### 2.1 *Metodi cromatografici*

La tecnica cromatografica maggiormente utilizzata è l'HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*, accoppiata a spettrometria di massa o rivelatore DAD. Tale approccio analitico prevede tre fasi: estrazione/purificazione dei pigmenti dai campioni di olive o di oli, separazione cromatografica e analisi dei pigmenti. Per quanto riguarda la fase di estrazione/purificazione dei pigmenti, in letteratura sono riportati due differenti metodologie: LPD, *Liquid Phase Distribution* (Minguez-Mosquera e Garrido-Fernandez, 1989) e SPE, *Solid Phase Extraction* (Gutierrez et al., 1989). Analizzando i recuperi che si ottengono utilizzando le due metodologie, in particolare per pigmenti come luteina,  $\beta$ -carotene e feofitina a, è stato possibile verificare la migliore

$\lambda$ (nm)	PIGMENTO RILEVATO:
410	feofitina a
430	clorofilla a
435	feofitina b
440	neoxantina, violaxantina
445	anteraxantina
446	luteina, $\beta$ -carotene
454	$\beta$ -carotene
466	clorofilla b
666	clorofilla a

Tab. 4 *Pigmenti identificati mediante rivelatore DAD a opportune lunghezze d'onda,  $\lambda$*

efficienza del metodo SPE rispetto al metodo LPD (Minguez-Mosquera et al., 1992). Per quanto riguarda la separazione cromatografica dei pigmenti essa dipende fortemente dalla scelta del tipo di colonna cromatografica adottata. Inizialmente venivano usate colonne cromatografiche in fase diretta, le quali risultavano però essere molto sensibili al contenuto acquoso e alla temperatura, e richiedevano tempi di analisi molto lunghi (Schmitz et al., 2005). Successivamente ottimi risultati sono stati ottenuti usando colonne cromatografiche  $C_{18}$  in fase inversa: l'uso di tale colonne permette un'ottima separazione per le clorofille e i suoi derivati e per i carotenoidi a catena corta e a basso peso molecolare (Meléndez-Martínez et al., 2007). Infine la recente introduzione delle colonne cromatografiche  $C_{30}$  in fase inversa, ha portato una maggiore selettività per carotenoidi a catena lunga consentendo un'efficace separazione e risoluzione degli isomeri geometrici meno polari, come il  $\beta$ -carotene (Giuffrida et al., 2007). Studi comparativi inerenti a un'analisi generica di carotenoidi hanno dimostrato profili cromatografici simili sia mediante l'uso di colonne cromatografiche  $C_{18}$  e  $C_{30}$ , ma contraddistinti da tempi di analisi maggiori nel caso di colonne  $C_{30}$ . Quindi è sempre necessario valutare l'approccio da adottare a seconda della matrice biologica di partenza (Crupi et al., 2010). Un altro aspetto da non trascurare in questo tipo di analisi cromatografiche è la scelta dei solventi e del gradiente di eluizione. In letteratura, lo schema di eluizione per la separazione dei pigmenti in matrici oleose più adottato è riportato in questo lavoro (Minguez-Mosquera et al., 1991).

Infine, l'analisi dei pigmenti per via cromatografica può avvenire con rivelatore spettrofotometrico DAD, *Diode Array Detector*, o rivelatore MS, *Mass Spectrometry*. Il rivelatore DAD è quello più utilizzato e consente l'identificazione dei carotenoidi e delle clorofille presenti in un olio selezionando

opportunamente le lunghezze d'onda (Criado et al., 2007a). In tabella 4 sono riportate le lunghezze d'onda selezionate per l'identificazione dei vari pigmenti (come si vede, nella regione della luce visibile).

L'utilizzo della spettrometria di massa, MS, come rivelatore è risultato idoneo per la determinazione e quantificazione delle clorofille e dei suoi derivati (Chen et al., 2015), ma non dei carotenoidi.

## 2.2 *Metodi spettroscopici*

Le tecniche spettroscopiche, come l'assorbimento ultravioletto-visibile (UV/Vis), la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR), la spettroscopia infrarossa (FT-IR) e l'emissione di fluorescenza, sono molto usate per autenticare e differenziare gli oli edibili. Tuttavia non sono molti i lavori che indagano sul contenuto delle clorofille e dei carotenoidi. La maggior parte dei metodi spettroscopici sopra elencati infatti tende ad analizzare la componente maggioritaria di un olio, cioè la frazione saponificabile, e solo alcuni la frazioni insaponificabile.

Le informazioni ottenibili dalla regione dell'ultravioletto (UV) non sono efficienti dal punto di vista investigativo e analitico, soprattutto per l'elevata sovrapposizione di segnali, riconducibile alla presenza nei campioni di oli di oliva di alcheni coniugati, derivati dei perossidi, ma anche di alcuni composti bioattivi, come i tocoferoli, le antocianine e i polifenoli, che assorbono in tale zona spettrale (Pizarro et al., 2013). Come si può vedere in figura 5, la banda di assorbimento nella zona dell'ultravioletto è molto intensa e poco strutturata, soprattutto se confrontata con l'assorbimento di luce nella regione del visibile.

Occorre ricordare, comunque, che l'assorbimento nell'ultravioletto viene considerato fondamentale per la definizione della qualità degli oli di oliva extravergine e per discriminare un olio di oliva extravergine da oli di oliva di minor qualità. Come riportato in tabella 3 ci sono ben tre indici di qualità che riguardano l'assorbimento nell'ultravioletto: l'indice K232 (assorbimento a lunghezza d'onda  $\lambda = 232$  nm), l'indice K270 (assorbimento a lunghezza d'onda  $\lambda = 270$  nm), e il valore Delta-K (una differenza tra indici di assorbimento tra  $\lambda = 266$  nm e  $\lambda = 274$  nm).

Come si vede in figura 5, i due assorbimenti a 232 e 270 nm riguardano una zona dell'ultravioletto con segnali molto larghi e intensi, che sono indice dello stato ossidativo di un olio. In particolare, l'assorbimento a 232 nm aumenta considerevolmente per la formazione di dieni coniugati (prodotti da

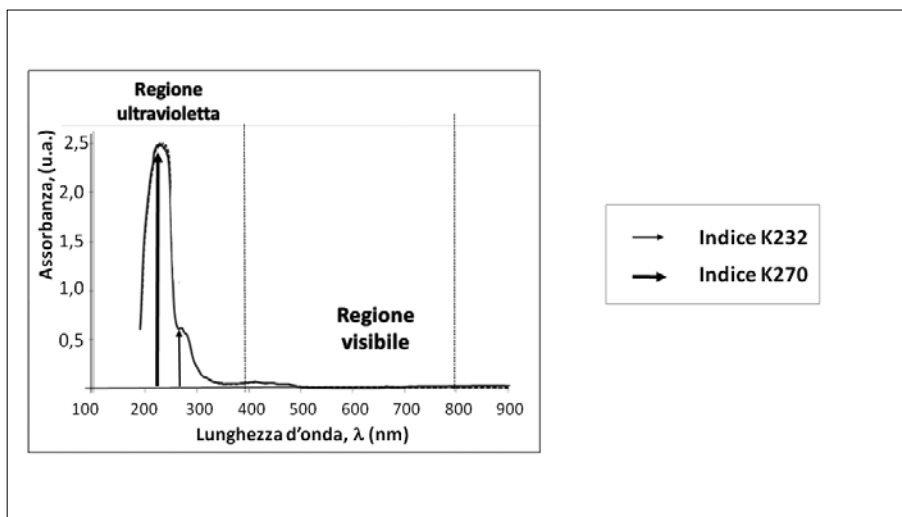


Fig. 5 Esempio di spettro di assorbimento UV-vis di un campione di olio di oliva extravergine dove le due regioni, ultravioletto e visibile, sono messe in evidenza. Tra i parametri di qualità di un olio di oliva extravergine, riconosciuti dalla normativa, ci sono gli indici K232 e K270, che corrispondono all'assorbimento a due lunghezze d'onda corrispondenti, come indicato in figura con delle frecce

processi di ossidazione primaria degli acidi grassi) mentre l'assorbimento a 270 nm aumenta per la formazione di trieni coniugati (prodotti da processi di ossidazione secondaria).

La regione del visibile e vicino ultravioletto-visibile fornisce informazioni inerenti ai pigmenti contenuti in un olio, essendo questa la zona dei "colori". Gli assorbimenti nella zona spettrale tra 430-460 nm (Domenici et al., 2014) sono riconducibili alla composizione dei carotenoidi nella matrice oleosa, mentre nella zona spettrale tra 600 e 800 nm sono evidenziabili i picchi delle principali transizioni elettroniche dei gruppi clorofilliani, come vedremo in dettaglio nel paragrafo successivo.

Per quanto riguarda la regione spettrale del vicino infrarosso, da 800 a 2500 nm, essa non consente di ottenere informazioni inerenti ai pigmenti, ma è invece molto sfruttata per determinare la composizione acidica di un olio (Baeten et al., 2001).

Infine, un approccio recente rivolto alla determinazione e quantificazione delle clorofille e dei suoi derivati è la spettroscopia di emissione di fluorescenza (Sikorska et al., 2012). Questo tipo di fotoluminescenza, ovvero di emissione di luce successiva all'assorbimento di una radiazione da parte di alcune molecole, può essere sfruttata per rilevare e quantificare eventuali adultera-

zioni alimentari e monitorare cambi composizionali durante la conservazione (Guimet et al., 2004). Ad esempio, andando a studiare sia gli spettri di eccitazione che gli spettri di emissione, oppure utilizzando tecniche sincrone, è possibile ricavare informazioni sulle clorofille e suoi vari derivati. Con lunghezze d'onda di eccitazione intorno ai 350-420 nm ed emissione intorno ai 600-700 nm, nello spettro di fluorescenza sincronico di un olio di oliva si osserva un'unica banda intorno a 550 nm, riconducibile ai pigmenti clorofilliani ovvero: clorofilla a, clorofilla b, feofitina a e feofitina b. Essi presentano spettri di emissione molto simili, ma con un massimo di assorbimento differente nell'intervallo di 653-671 nm (Díaz et al., 2003). Affiancando tale approccio a un'analisi multivariata PLS, *Partial Least Squares*, è possibile effettuare una quantificazione dei singoli componenti clorofilliani. Tale metodologia però non può essere adottata per l'analisi dei carotenoidi, in quanto essi non sono composti fluorescenti.

### 3. ANALISI SPETTROSCOPICA DELL'OLIO DI OLIVA NELLA REGIONE DEL VICINO ULTRAVIOLETTA - VISIBILE

Come detto in precedenza, gli spettri di assorbimento nella regione del visibile di un olio di oliva extravergine hanno alcune caratteristiche ben definite (Ayuso et al., 2004; Domenici et al., 2016): una prima banda di assorbimento con una caratteristica forma a tre picchi nell'intervallo da 390 a 520 nm e una banda più stretta intorno a 660-675 nm (fig. 6). Quest'ultima banda è dovuta alle clorofille e loro derivati, mentre la prima banda è più complessa, perché è dovuta alla sovrapposizione dei picchi di assorbimento di vari pigmenti, sia carotenoidi che clorofille. L'assorbimento di un olio di oliva extravergine è molto diverso rispetto a quello di oli derivati da semi e frutti diversi dall'oliva, proprio perché diversa è la composizione in pigmenti tra i diversi tipi di olio (Ancora, 2014; Lazzerini et al., 2016a). Questa evidenza sperimentale è alla base di numerosi studi volti a identificare frodi legate alla miscelazione tra oli di oliva e oli di semi diversi, sfruttando metodi spettrofotometrici al posto dei metodi cromatografici (Domenici et al., 2014; Cayuela et al., 2014; Torrecilla et al., 2010; Pizarro et al., 2013).

Tra i metodi spettrofotometrici proposti, uno molto recente (Cayuela et al., 2014) si basa sulla definizione di due nuovi indici: il K470 e il K670, corrispondenti ai valori di assorbimento dell'olio di oliva extravergine alle lunghezze d'onda di 470 e 670 nm, rispettivamente. Questi due indici sono correlati alle concentrazioni delle clorofille e dei carotenoidi. Il metodo, come

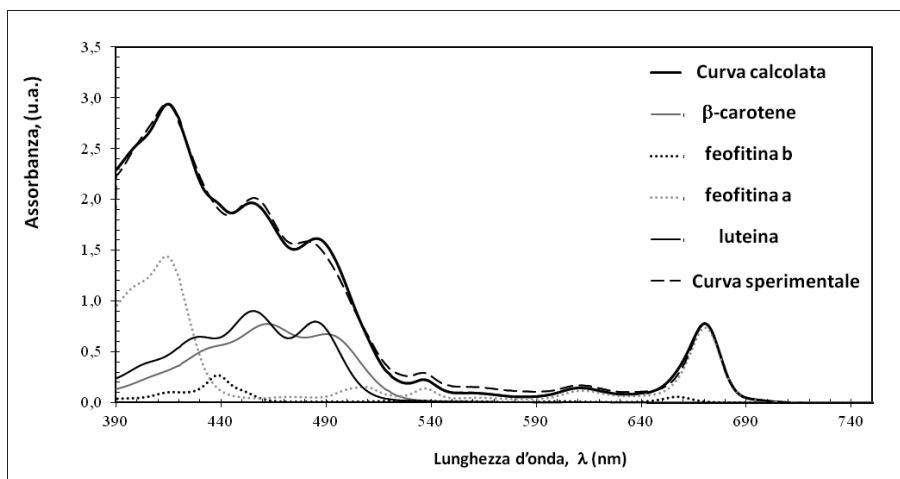


Fig. 6 Esempio di spettro di assorbimento di un campione di olio di oliva extravergine nella regione del vicino ultravioletto – visibile (da 390 a 750 nm). Lo spettro ottenuto sperimentalmente (– –) è confrontato con lo spettro calcolato (–) utilizzando il metodo qui descritto (Domenici et al., 2014). Le curve corrispondenti al contributo all'assorbimento dei quattro pigmenti principali sono riportate come indicato in legenda

tutti i metodi spettrofotometrici, è molto veloce, non implica il trattamento chimico dei campioni ed è relativamente poco costoso. Tuttavia, i soli valori di assorbimento a queste due lunghezze d'onda non sembrano essere sufficienti per determinare la concentrazione dei pigmenti negli oli analizzati, ma solo il totale dei carotenoidi e il totale delle clorofille.

Per avere una quantificazione dei vari pigmenti occorre analizzare lo spettro di assorbimento nel visibile in modo da distinguere i contributi dei diversi pigmenti, e per far questo occorre sviluppare un approccio matematico per analizzare quantitativamente gli spettri. Un primo approccio di questo tipo, basato sulla deconvoluzione degli spettri di assorbimento nel visibile dell'olio di oliva, fu proposto da Ayuso (Ayuso et al., 2004) utilizzando due segnali, quello del  $\beta$ -carotene e della clorofilla a. Più di recente (Domenici et al., 2014) è stato proposto un metodo matematico più elaborato per analizzare lo spettro come combinazione lineare di quattro segnali, derivati dagli spettri sperimentali dei quattro pigmenti principali in un olio di oliva extravergine: due carotenoidi (luteina e  $\beta$ -carotene) e due derivati delle clorofille (feofitina a e feofitina b). Un esempio di spettro di assorbimento di un olio di oliva extravergine è mostrato in figura 6, dove è riportato anche lo spettro calcolato usando l'approccio matematico sopra descritto e gli spettri dei singoli pigmenti che lo compongono (Domenici et al., 2014).

L'applicazione di questo metodo prevede di registrare uno spettro di assorbimento su un campione di olio di oliva tal quale, analizzare matematicamente lo spettro per ottenere le concentrazioni dei quattro pigmenti principali e altri parametri significativi, come il rapporto tra carotenoidi e feofitine, e la somma totale dei pigmenti. Complessivamente il metodo richiede al massimo 3 minuti, contro i 20-30 minuti medi necessari per una analisi cromatografica.

Questo metodo ha superato una prima fase di validazione in cui è stato studiato un campione molto ampio di oli di oliva extravergine, comprendente oli di oliva extravergine di diversa origine geografica, cultivar e annata (Ancora, 2014; Domenici et al., 2014; Lazzerini et al., 2016a; Lazzerini et al., 2016b) e recentemente è stato implementato per poter determinare un ulteriore pigmento della classe delle xantofille (Buti, 2016).

A fianco a questi metodi di analisi dettagliata degli spettri di assorbimento sono stati sviluppati di anche approcci di analisi statistica multivariata che richiedono, comunque, la costruzione di ampi *data-base* per poter dare informazioni significative sulla correlazione tra contenuto in pigmenti e caratteristiche degli oli di oliva extravergine (Torrecilla et al., 2010; Torrecilla et al., 2011; Torrecilla et al., 2015).

#### 4. CONSIDERAZIONI SULL'UTILIZZO DEI PIGMENTI COME PARAMETRI DI AUTENTICITÀ E QUALITÀ DELL'OLIO DI OLIVA EXTRAVERGINE

Come ampiamente discusso in questo lavoro, esistono vari metodi per la quantificazione dei pigmenti in campioni di olio di oliva extravergine. La concentrazione dei pigmenti e il rapporto tra vari pigmenti in un olio di oliva extravergine sono parametri che possono variare molto da campione a campione, perché molti sono i fattori che li influenzano. Per questo motivo, l'uso di questi parametri per caratterizzare gli oli di oliva e per determinare la loro autenticità è stato per molti anni scoraggiato. Tuttavia, negli ultimi vent'anni gli studi condotti parallelamente da vari gruppi di ricerca, soprattutto in Spagna e in Italia, hanno messo in evidenza che i pigmenti possono essere utilizzati per questi scopi. Gran parte di questi studi si sono soffermati su campioni di olio di oliva extravergine prodotti a partire da olive coltivate in Spagna (Roca et al., 2003; Roca et al., 2001; Pizarro et al., 2013; Olivieri et al., 2011; Domenici et al., 2014; Guerrero et al., 2005; Gandul-Rojas e Minguez-Mosquera, 1996), e relativamente pochi studi riguardano oli di olive extravergine prodotti da olive coltivate in Italia (Giuf-

Caratterizzazione varietale	Clorofille <sub>tot</sub> /Carotenoidi <sub>tot</sub> Carotenoidi minoritari/luteina
Autenticazione	% violaxantina % luteina Contenuto totale di pigmenti luteina/ $\beta$ -carotene

Tab. 5 *Parametri legati al contenuto di pigmenti per verificare l'origine geografica e l'autenticità di un olio di oliva extravergine*

frida et al., 2011; Ancora, 2014; Lazzerini et al., 2016b; Lazzerini, 2016c) in Grecia e in Tunisia (Dabbou et al., 2010; Psomiadou e Tsimidou, 2001; Lazzerini, 2016c).

In tabella 5 (Lazzerini et al., 2016a) sono riassunti i principali indici e parametri proposti in letteratura per differenziare gli oli di oliva extravergine in base alle caratteristiche varietali (cultivar) e per verificare eventuali frodi (autenticazione). In letteratura è stato visto che gli oli di oliva extravergine spagnoli hanno un rapporto tra derivati delle clorofille e carotenoidi vicino a 1 (Gandul-Rojas et al., 2000), mentre gli oli di oliva extravergine prodotti in Italia, mostrano una maggiore variabilità, legata probabilmente a maggiori differenze pedoclimatiche tra oli prodotti nel meridione e nelle regioni centrali (Lazzerini et al., 2016b; Lazzerini, 2016c).

Un altro parametro interessante è il rapporto tra carotenoidi minoritari e luteina, che secondo il lavoro di Roca (Roca et al., 2003) varia da 0.4 e 1.5 in base alla cultivar. Ma questo dato è stato per ora verificato solo su oli spagnoli. Secondo vari studi (Roca e Minguez-Mosquera, 2001; Lazzerini et al., 2016b), altri parametri importanti sono il contenuto totale dei pigmenti e il rapporto tra luteina e  $\beta$ -carotene, che possono essere utilizzati per un primo screening per l'autenticità di un olio di oliva.

Anche se saranno necessari ulteriori studi per ampliare la casistica degli oli di oliva extravergine analizzati, questi lavori danno già una chiara indicazione del fatto che il contenuto in pigmenti possa essere ritenuto importante per l'autenticazione e per la definizione di parametri di qualità, che dovrebbero affiancare quelli già esistenti (normati e non).

Gli sviluppi in questo settore riguardano soprattutto la metodologia spettroscopica, in quanto essa elimina completamente la problematica del trattamento chimico dei campioni di olio prima dell'analisi. Inoltre, i metodi spettroscopici che utilizzano l'assorbimento nel visibile sono estremamente semplici da usare e poco costosi, al contrario dei metodi cromatografici. In futuro è auspicabile che l'analisi quantitativa dei pigmenti di un olio di oliva extravergine possa avvenire direttamente nei siti di produzione e di vendita



degli oli, attraverso strumenti portatili di facile utilizzo da parte di personale non esperto.

Lo sviluppo di metodi semplici e allo stesso tempo affidabili in grado di testare l'autenticità e garantire la qualità di un prodotto agroalimentare, è molto importante soprattutto in un paese ricco di prodotti di qualità come l'Italia. Incentivare questo tipo di studi sarebbe un segnale importante non solo per chi si occupa di ricerca scientifica, ma anche per gli stessi produttori e per i consumatori.

#### RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano il professor Maurizio Zandomeneghi, per aver introdotto il nostro gruppo di ricerca alle problematiche della caratterizzazione spettroscopica dell'olio di oliva extravergine, il dottor Andrea Serani, per i suoi utili suggerimenti per quanto riguarda i metodi cromatografici, Donatella Ancora e Francesco Buti, per aver contribuito ad alcune fasi della ricerca.

#### RIASSUNTO

Una delle caratteristiche peculiari dell'olio di oliva extravergine è il suo colore, che è dovuto alla presenza di una classe di composti minoritari: i pigmenti. La determinazione quantitativa dei pigmenti, ovvero delle concentrazioni dei carotenoidi, delle clorofille e dei loro derivati, può essere fatta utilizzando vari metodi sperimentali, suddivisi in metodi cromatografici e metodi spettroscopici. In questo lavoro si passeranno in rassegna questi due approcci, soffermandoci sugli ultimi sviluppi che hanno consentito di analizzare molti campioni di olio di oliva extravergine di diverse cultivar, provenienze geografiche e sottoposti a varie condizioni di conservazione. Questi studi sono stati utili a individuare dei parametri associati al contenuto dei pigmenti in grado di definire l'autenticità e la qualità di un olio aprendo a interessanti prospettive applicative.

#### ABSTRACT

The colour of extra-virgin olive oil is one of the characteristic features of this peculiar agricultural product. Colour is determined by the presence of pigments, such as carotenoids, chlorophylls and their derivatives. Their presence and their relative concentration can be determined by several analytical techniques, divided between chromatographic and spectroscopic ones. In this brief manuscript, most of the recent methodologies developed to determine pigments in olive oils will be reviewed. In particular, the possible use of several parameters based on pigments' content will be discussed in order to assess the quality and authenticity of extra-virgin olive oils.

## BIBLIOGRAFIA

- ANCORA D. (2014): *UV-Vis and <sup>1</sup>H-NMR spectroscopic methods applied to the study of extra-virgin olive oil produced in Tuscany and Apulia*, Tesi magistrale in Chimica, Università di Pisa.
- ANGEROSA F., CAMPESTRE C., GIANANTE L. (2006): *Analysis and authentication*, in *Olive Oil Chemistry and Technology*, a cura di D. Boskou, AOCS Press, Champaign (USA), pp. 113-172.
- AYUSO J., HARO M.R., ESCOLAR D. (2004): *Simulation of the visible spectra for edible virgin olive oils: potential uses*, «Applied Spectroscopy», 58, pp. 474-480.
- BAETEN V., DARDENNE P., APARICIO R. (2001): *Interpretation of Fourier transform Raman spectra of the unsaponifiable matter in a selection of edible oils*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 49, pp. 5098-5107.
- BOSKOU D., BLEKAS G., TSIMIDOU M. (2006): *Olive oil composition*, in *Olive Oil Chemistry and Technology*, a cura di D. Boskou, AOCS Press, Champaign (USA), pp. 40-72.
- BUTI F. (2016): *Implementazione di un nuovo metodo per la determinazione di pigmenti in oli di origine vegetale*, Tesi triennale in Chimica, Università di Pisa.
- CAYUELA J.A., YOUSFI K., MARTINEZ M.C., GARCIA J.M. (2014): *Rapid determination of olive oil chlorophylls and carotenoids by using UV-Vis spectroscopy*, «Journal of American Oil Chemists's Society», 91, pp. 1677-1684.
- CHEN K., RIOS J.J., PÉREZ-GÁLVEZ A., ROCA M. (2015): *Development of an accurate and high-throughput methodology for structural comprehension of chlorophylls derivatives (I). Phytolated derivatives*, «Journal of Chromatography A», 1406, pp. 99-108.
- CRIADO M.N., MOTILVA M.J., GÒNI M., ROMERO M.P. (2007): *Comparative study of the effect of the maturation process of the olive fruit on the chlorophyll and carotenoid fractions of drupes and virgin oils from Aberquina and Farga cultivars*, «Food Chemistry», 100, pp. 748-755.
- CRIADO M.N., ROMERO M.P., MOTILVA M.I. (2007): *Effect of the technological and agromonomical factors on pigment transfer during olive oil extraction*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 55, pp. 5681-5688.
- CRUPI P., MILELLA R.A., ANTONACCI D. (2010): *Simultaneous HPLC-DAD-MS (ESI+) determination of structural and geometrical isomers of carotenoids in mature grapes*, «Journal of Mass Spectrometry», 45, pp. 971-980.
- DABBOU S., BRAHMI F., TAAMALI A., ISSAOUI M., OUNI Y., BRAHAM M., ZARROUK M., HAMMAMI M. (2010): *Extra Virgin Olive Oil Components and Oxidative Stability from Olives Grown in Tunisia*, «Journal of American Oil Chemists's Society», 87, pp. 1199-1209.
- DEL GIOVINE L., FABIETTI F. (2005): *Copper chlorophyll in olive oils: identifications and determination by LIF capillary electrophoresis*, «Food Control», 16, pp. 267-272.
- DÍAZ G.T., MERÁS I.D., CORREA C.A., ROLDAN B. (2003): *Simultaneous Fluorimetric Determination of Chlorophylls a and b and Pheophytins a and b in Olive Oil by Partial Least-Squares Calibration*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 51, pp. 6934-6940.
- DOMENICI V., ANCORA D., CIFELLI M., SERANI A., VERACINI C.A., ZANDOMENEGHI M. (2014): *Extraction of pigment information from near UV-Vis absorption spectra of extra virgin olive oils*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 62, pp. 9317-9325.

- FRAGAKI G., SPYROS A., SIRAGAKIS G., SALIVARAS E., DAIS P. (2005): *Detection of extra virgin olive oil adulteration with lampante and refined olive oil using nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate statistical analysis*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 53, pp. 2810-2816.
- GANDUL-ROJAS B., MÍNGUEZ-MOSQUERA M.I. (1996): *Chlorophyll and carotenoid composition in virgin olive oils from various Spanish olive varieties*, «Journal of the Science of Food and Agriculture», 72, pp. 31-39.
- GANDUL-ROJAS B., ROCA-L., CEPERO M., MÍNGUEZ-MOSQUERA M.I. (2000): *Use of chlorophyll and carotenoid pigment composition to determine authenticity of virgin olive oil*, «Journal of American Oil Chemists's Society», 77, 8.
- GERTZ C., FIEBING H.J. (2006): *Pyropheophytin a determination of thermal degradation products of chlorophyll a in virgin olive oil*, «European Journal of Lipid Science and Technology», 108, pp. 1062-1065.
- GIULIANI A. (2011): *Chlorophylls in olive and in olive oil: chemistry and occurrences*, «Critical Reviews in Food Science and Nutrition», 51, pp. 678-690.
- GIUFFRIDA D., SALVO F., SALVO A., LA PERA L., DUGO G. (2007): *Pigments composition in monovarietal virgin olive oils from various sicilian varieties*, «Food Chemistry», 101, pp. 833-837.
- GUERRERO L.G., GANDUL-ROJAS B., ROCA M., MÍNGUEZ-MOSQUERA I. (2005): *Effect of storage on the original pigment profile of Spanish virgin olive oil*, «Journal of the American Oil Chemists' Society», 82, pp. 33-39.
- GUIMET F., BOQUE R., FERRE J. (2004): *Cluster Analysis Applied to the Exploratory Analysis of Commercial Spanish Olive Oils by Means of Excitation-Emission Fluorescence Spectroscopy*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 52, pp. 6673-6679.
- GUTIERREZ F., ALBI M.A., PALMA R., RIOS J.L. (1989): *Olias J.M. Bitter taste of virgin oil: correlation of sensory evaluation and instrumental HPLC*, «Journal of Food Science», 54, pp. 68-73.
- JASWIR I., NOVIENDRI D., REWO F.H., OCTAVIANI F. (2011): *Carotenoids: sources, medical properties and their application in food and nutraceutical industry*, «Journal of Medical Plants Research», 71, pp. 7119-7131.
- LAZZERINI C., CIFELLI M., DOMENICI V. (2016): *Pigments in Extra-Virgin Olive Oil: Authenticity and Quality*, in *Products from olive tree*, a cura di D. Boskou e M. L. Clodoveo, InTech, Reijka, pp. 99-114.
- LAZZERINI C., BUTI F., CIFELLI M., ZANDOMENEGHI M., DOMENICI V. (2016): *Olio di Oliva Extravergine Toscano: uno studio sul contenuto dei pigmenti e prospettive per un nuovo indice di qualità*, in *Codice Armonico, sesto congresso di scienze naturali – Ambiente Toscano*, a cura dell'associazione amici della Natura Rosignano, Edizioni ETS, Pisa, pp. 155-165.
- LAZZERINI C. (2016): *Applicazione di un metodo spettroscopico innovativo per la determinazione di pigmenti in oli di oliva extravergine e confronto con un metodo cromatografico*, tesi di laurea magistrale in Chimica, Università di Pisa.
- MANNINA L., SOBOLEV A.P., SEGRE A.L. (2003): *Olive oil as seen by NMR and chemometrics*, «Spectroscopy Europe», 15, pp. 6-14.
- MELÉNDEZ-MARTINEZ A., VICARIO I.M., HEREDIA F.J. (2007): *Review: analysis of carotenoids in orange juice*, «Journal of Food Composition and Analysis», 20, pp. 638-649.
- MÍNGUEZ-MOSQUERA M.I., GARRIDO-FERNÁNDEZ J. (1989): *Chlorophyll and carotenoid presence in olive fruit (Olea europaea, L.)*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 37, pp. 1-7.

- MINGUEZ-MOSQUERA M.I., GANDUL-ROJAS B., GARRIDO-FERNANDEZ J., GALLARDO-GUERRERO M.L. (1990): *Pigments present in virgin olive oils*, «Journal of American Oil Chemists's Society», 67, pp. 192-196.
- MINGUEZ-MOSQUERA M.I., GANDUL-ROJAS B., MONTANÒ-ASQUERINO A., GARRIDO-FERNÁNDEZ J. (1991): *Determination of chlorophylls and carotenoids by HPLC during olive lactic fermentation*, «Journal of Chromatography A», 585, pp. 259-266.
- MINGUEZ-MOSQUERA M.I., GANDUL-ROJAS B., GALLARDO-GUERRERO M.L. (1992): Rapid method of quantification of chlorophylls and carotenoids in virgin olive oils by HPLC, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 40, pp. 60-63.
- OLIVERI P., CASALE M., CASOLINO M.C., BALDO M.A., NIZZI F., FORINA G.F. (2011): *Comparison between classical and innovative class-modelling techniques for the characterisation of a PDO olive oil*, «Analytical Bioanalysis and Chemistry», 399, pp. 2105-2113.
- PÉREZ-CAMINO M. C., MOREDA W., CERT, A. (2001): *Effects of olive fruit quality and oil storage practices on the diacylglycerol content of virgin olive oils*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 49, pp. 699-704.
- PIZARRO C., RODRÍGUEZ-TECEDOR S., PÉREZ-DEL NOTARIO N., ESTEBAN-DÍEZ I., GONZÁLEZ-SÁIZ J.M. (2013): *Classification of Spanish extra virgin olive oils by data fusion of visible spectroscopic fingerprints and chemical descriptors*, «Food Chemistry», 138, pp. 915-922.
- PSOMIADOU E., TSIMIDOU M. (1998): *Simultaneous HPLC determination of tocopherols, carotenoids and chlorophylls for monitoring their effect on virgin olive oil oxidation*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 46, pp. 5132-5138.
- PSOMIADOU E., TSIMIDOU M. (2001): *Pigments in Greek Virgin Olive Oils: Occurrence and Levels*, «Journal of the Science of Food and Agriculture», 81, pp. 640-647.
- RAMIREZ E., GANDUL-ROJAS B., ROMERO C., BRENES M., GUERRERO L.G. (2015): *Composition of pigments and colour changes in green table olives related to processing type*, «Food Chemistry», 66, pp. 115-124.
- ROCA M., MINGUEZ-MOSQUERA M.I. (2001): *Change in the natural ratio between chlorophylls and carotenoids in olive fruit during processing for virgin olive oil*, «Journal of the American Oil Chemists Society», 78, pp. 133-138.
- ROCA M., GANDUL-ROJAS B., GUERRERO L.G., MINGUEZ-MOSQUERA M.I. (2003): *Pigments parameters determining Spanish virgin olive oil authenticity: stability during storage*, «Journal American Oil Chemists's Society», 80, pp. 1237-1240.
- SABA A., MAZZINI F., RAFFAELLI A., MATTEI A., SALVADORI P. (2005): *Identification of 9(E), 11(E)-18:2 fatty acid methyl ester at trace level in thermal stressed olive oils by GC coupled to acetonitrile CI-MS and CI-MS/MS, a possible marker for adulteration by addition of deodorized olive oil*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 53, pp. 4867-4872.
- SCHMITZ H.H., EMENHISER C., SCHARTZ J.J. (1995): *HPLC separation of geometric carotene isomers using a calcium hydroxide stationary phase*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 43, pp. 1212-1218.
- SIKORSKA E., KHMELINSKII I., SIKORSKI M. (2012): *Analysis of olive oils by fluorescence spectroscopy: methods and applications*, in *Olive Oil-Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions*, a cura di D. Boskou, InTech, Reijka, pp. 63-89.
- SPINK J., MOYER D.C. (2013): *Understanding and combating food fraud*, «Food Technology Magazine», 67, pp. 30-35.
- SPYROS A., DAIS P. (2000): *Application of <sup>31</sup>P NMR spectroscopy in food analysis. Quantitative determination of the mono- and diglyceride composition of olive oils*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry» 48, pp. 802-805.

- TORRECILLA J.S., ROJO E., DOMÍNGUEZ J.C., RODRÍGUEZ F. (2010): *Linear and non linear chemometric models to quantify the adulteration of extra virgin olive oil*, «Talanta», 83, pp. 404-409.
- TORRECILLA J.S., GARCIA G., GARCIA S., RODRÍGUEZ F. (2011): *Quantification of adulterant agents in extra virgin olive oil by models based on its thermophysical properties*, «Journal of Food Engineering», 103, pp. 211-218.
- TORRECILLA J.S., VIDAL S., AROCA-SANTOS R., WANG S.C., CANCELLA J. (2015): *Spectroscopic determination of the photodegradation of monovarietal extravirgin olive oils and their binary mixtures through intelligent systems*, «Talanta», 144, pp. 363-368.

