

MAURIZIO SERVILI*, ROBERTO SELVAGGINI*, SONIA ESPOSTO*,
AGNESE TATICCHI*, STEFANIA URBANI*, GIANFRANCESCO MONTEDORO*

I composti fenolici bioattivi dell'olio vergine di oliva tra qualità del prodotto e variabili di processo

Lettura tenuta il 15 novembre 2007

I. INTRODUZIONE

La composizione chimica dell'olio vergine d'oliva è caratterizzata da una frazione saponificabile e dai costituenti minori. La frazione saponificabile, alla quale appartengono i gliceridi, costituisce più del 98% dell'olio mentre i costituenti minori che rappresentano intorno al 2% in peso sono più di 230 sostanze chimiche che includono diverse classi come alcoli alifatici e triterpenici, steroli, idrocarburi, composti volatili e sostanze antiossidanti. Gli antiossidanti sono rappresentati dai caroteni, tocoferoli, fenoli idrofili quali i derivati agliconici dei secoiridoidi del frutto e i lignani. Gli antiossidanti naturali dell'olio vergine d'oliva sono alla base delle proprietà salutistiche e di alcune proprietà sensoriali degli oli vergini di oliva. In questo contesto va osservato che, mentre i tocoferoli e i caroteni possono essere presenti anche in altri grassi vegetali o animali, i secoiridoidi sono presenti esclusivamente nell'olio vergine di oliva e nelle olive da tavola (tab. 1).

Il frutto dell'oliva contiene alte concentrazioni di composti fenolici (1-3% del peso fresco della polpa) (Vasquez Roncaro et al., 1974). Nella tabella 2 sono riportate le classi di fenoli idrofili presenti nella drupa.

Il 3,4 (diidrossifenil) etanolo (3,4 DHPEA) e il p-(idrossifenil) etanolo (p-HPEA) sono i fenil-alcoli più abbondanti (Vasquez Roncaro et al., 1974; Maestro Duran e Vasquez Roncaro, 1976).

I flavonoidi includono flavonoli glucosidi come la luteolina 7-glucoside e la rutina, e gli antociani come la cianidina e la delfinidina glucoside (Mazza e Miniati, 1993; Baldioli e Servili, 1996; Montedoro, 1972).

* *Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università di Perugia*

ACIDI FENOLICI E DERIVATI	IDROSSI-ISOCROMANI
Acido Vanillico	
Acido Siringico	ALCOLI FENOLICI
Acido p-Cumarico	(3,4-Diidrossifenil)etanolo (3,4 DHPEA)
Acido p-Cumarico	(p-Idrossifenil)etanolo (p-HPEA)
Acido Gallico	(3,4-Diidrossifenil)etanolo-Glucoside
Acido Caffeoico	
Acido Protocatechico	
Acido p-Idrossibenzoico	
Acido Ferulico	
Acido Cinnammico	
4-(acetossietil)-1,2-diidrossibenzene	
Acido Benzoico	
SECOIRIDOIDI	
Forma dialdeidica dell'acido decarbossimetil elenolico legato al 3,4-DHPEA (3,4 DHPEA-EDA)	
forma dialdeidica dell'acido decarbossimetil elenolico legato al p-HPEA (p-HPEA-EDA)	
Oleuropeina Aglicone (3,4 DHPEA-EA)	
Ligustroside Aglicone	
Oleuropeina Aglicone (3,4 DHPEA-EA)	
p-HPEA-Derivati	
Forma dialdeidica dell'oleuropeina aglicone	
Forma dialdeidica del ligustroside aglicone	
LIGNANI	
(+)-1-Acetossipinoresinolo	
(+)-Pinoresinolo	
FLAVONOIDI	
Apigenina	
Luteolina	

Tab. 1 *Composti fenolici presenti nell'olio extra vergine di oliva (Servili et al., 2004)*

Numerosi sono gli acidi fenolici presenti nell'oliva; questi composti, come l'acido caffeico, vanillico, siringico, p-cumarico, o-cumarico, protocatechico, sinapico e p-idrossibenzoico rappresentano anche il primo gruppo di polifenoli ritrovati in questo frutto (Montedoro, 1972; Vasquez Roncaro, 1978). Di grande importanza è la classe dei secoiridoidi che caratterizza il frutto dell'oliva. Infatti, mentre gli alcoli, gli acidi fenolici e i flavonoidi si possono ritrovare in diverse famiglie botaniche, questi composti sono esclusivi delle specie appartenenti alla famiglia delle Oleraceae. Oleuropeina, demetiloleuropeina, verbascoside, ligustroside e nüzhenide sono i secoiridoidi più concentrati del frutto (figg. 1 e 2); mentre i primi tre sono presenti in tutte le parti costitutive di esso, il nüzhenide è stato trovato solo nel seme (Servili et al., 1999). I secoiridoidi a livello strutturale sono costituiti da

ANTOCIANI	ALCOLI FENOLICI
Cianidina-3-glucoside	(3,4-Diidrossifenil)etanolo (3,4 DHPEA)
Cianidina-3-rutinoside	p-(Idrossifenil)etanolo (p-HPEA)
Cianidina-3-cafeilglucoside	SECOIRIDOIDI
Cianidina-3-cafeilrutinoside	Oleuropeina
Delfinidina 3-ramnosioglucoside-7-xilosio	Demetioleuropeina
	Ligustroside
FLAVONOIDI	Nüzhenide
Quercetina-3-rutinoside	DERIVATI DELL' ACIDO IDROSSICINNAMICO
	Verbascoside
FLAVONE	
Luteolina-7-glucoside	
Luteolina-5-glucoside	
Apigenina-7-glucoside	
ACIDI FENOLICI	
Acido Clorogenico	
Caffeic acid	
Acido p-Idrossibenzoico	
Acido Protocatechico	
Acido Vanillico	
Acido Siringico	
Acido p-Cumarico	
Acido p-Cumarico	
Acido Ferulico	
Acido Sinapico	
Acido Benzoico	
Acido Cinnammico	
Acido Gallico	

Tab. 2 *Principali composti presenti nel frutto dell'oliva (Servili et al., 2004)*

una parte terpenica derivante probabilmente dalla pathway dell'acido mevalonico (Rodriguez Lopez, 2000) e da una frazione fenolica derivante dal metabolismo fenilpropanoico (fig. 3). I secoiridoidi sono presenti nel frutto come secoiridoidi glucosidi ma si ritrovano generalmente nell'olio, come i più concentrati e importanti composti fenolici sotto forma di secoiridoidi agliconi (fig. 5). I secoiridoidi dell'olio vergine di oliva derivano dalla trasformazione biochimica e dal successivo trasferimento, di una parte dei componenti fenolici dell'oliva, nell'olio durante il processo di estrazione meccanica. In questo contesto la tabella 3 mostra le diverse classi di polifenoli idrofili specifici dell'olio vergine di oliva. Esso, infatti, contiene diversi gruppi di polifenoli come fenil-acidi, (fig. 4) fenil-alcoli, flavonoidi, lignani e secoiridoidi. La concentrazione più elevata di secoiridoidi dell'olio d'oliva

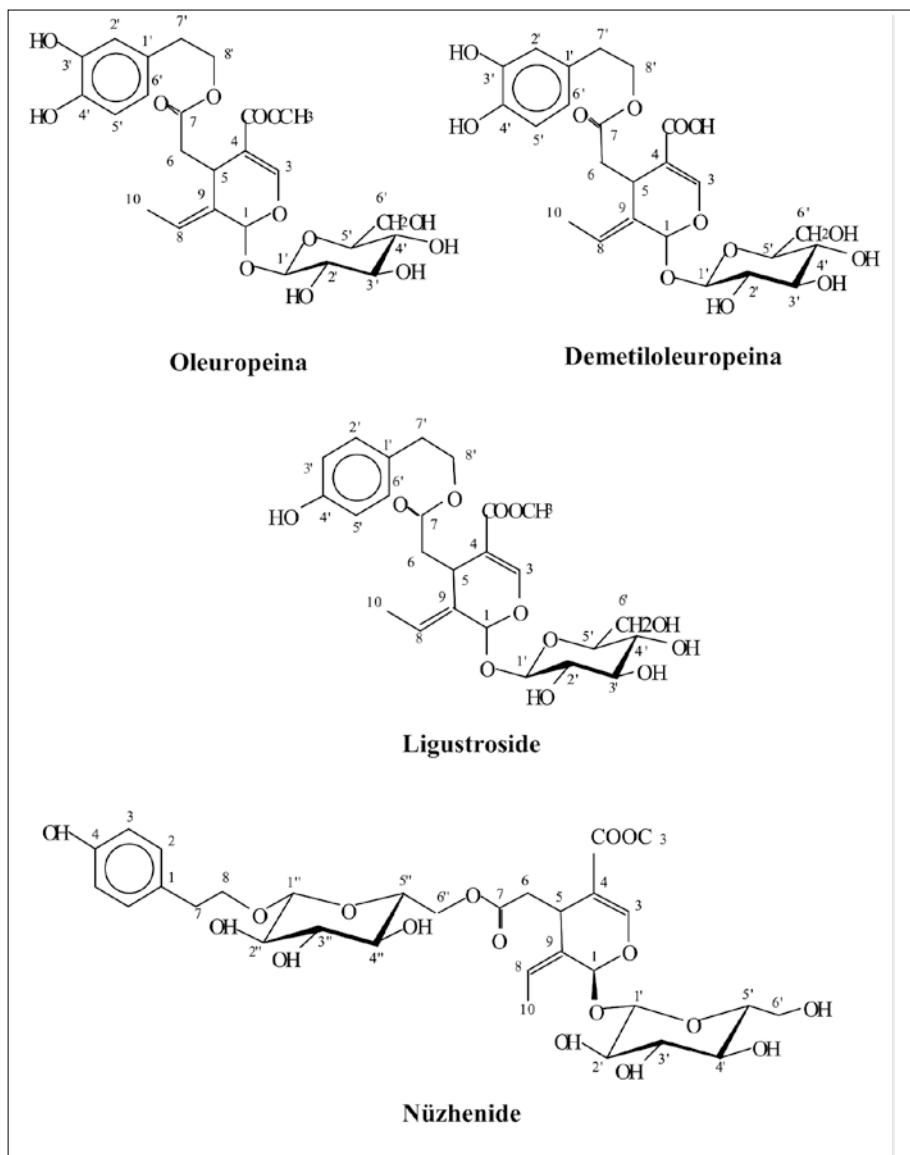


Fig. 1 *Strutture chimiche dei secoiridoidi presenti nel frutto. (Servili et al., 2004)*

è, rappresentata dalle forme dialdeidiche dell'acido elenolico decarbossimetilato legato al 3,4-DHPEA (3,4-DHPEA-EDA) o al (p-HPEA) (p-HPEA-EDA) (Montedoro et al., 1992) e un isomero dell'oleuropeina aglicone (3,4 DHPEA-EA) e del ligustroside p-HPEA-EA. Una ulteriore classe di

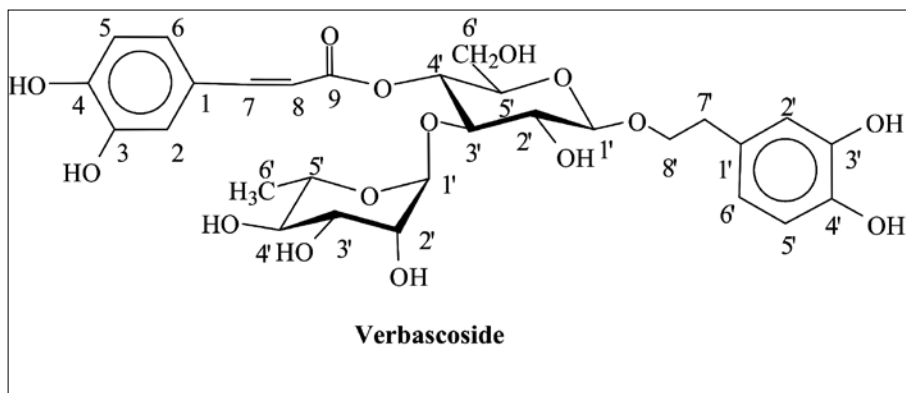


Fig. 2 *Struttura chimica del verbascoside. (Servili et al., 2004)*

COMPOSTI FENOLICI	MEDIANA	PRIMO QUINTILE	QUINTO QUINTILE
3,4-DHPEA	1,8	0,8	3,6
p-HPEA	1,9	0,6	5,0
Acido Vanillico	0,2	0,0	0,3
Acido Caffèico	0,4	0,2	0,7
3,4-DHPEA-EDA	185,7	48,2	631,1
p-HPEA-EDA	36,1	22,5	79
3,4-DHPEA-EA	126,3	61,1	230,6

Tab. 3 *Valori medi (mg/kg) dei più importanti fenil-alcoli, fenil-acidi e secoiridoidi nell'olio vergine di oliva usando su 210 campioni ottenuti in impianto pilota.*

La concentrazione dei composti fenolici era valutata per HPLC secondo Montedoro et al., (8) (Servili et al., 2004)

sostanze fenoliche evidenziate negli oli vergini di oliva sono i lignani quali il (+)-1-pinoresinolo e il (+)-1-acetossipinoresinolo (fig. 6), (Owen et al., 2000a; Brenes et al., 2000).

La presenza dei sostanze fenoliche idrofile nell'olio vergine di oliva è un aspetto fondamentale della sua qualità che è strettamente correlata con le numerose e specifiche funzioni di questi composti.

2. ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE

Alcune sostanze fenoliche dell'olio hanno un'elevata incidenza sulla sua resistenza all'ossidazione e quindi sullo *shelf-life* del prodotto. Numerosi lavori sono stati condotti per valutare la relazione tra il contenuto in polifenoli totali, valutato colorimetricamente, e la stabilità dell'olio all'ossida-

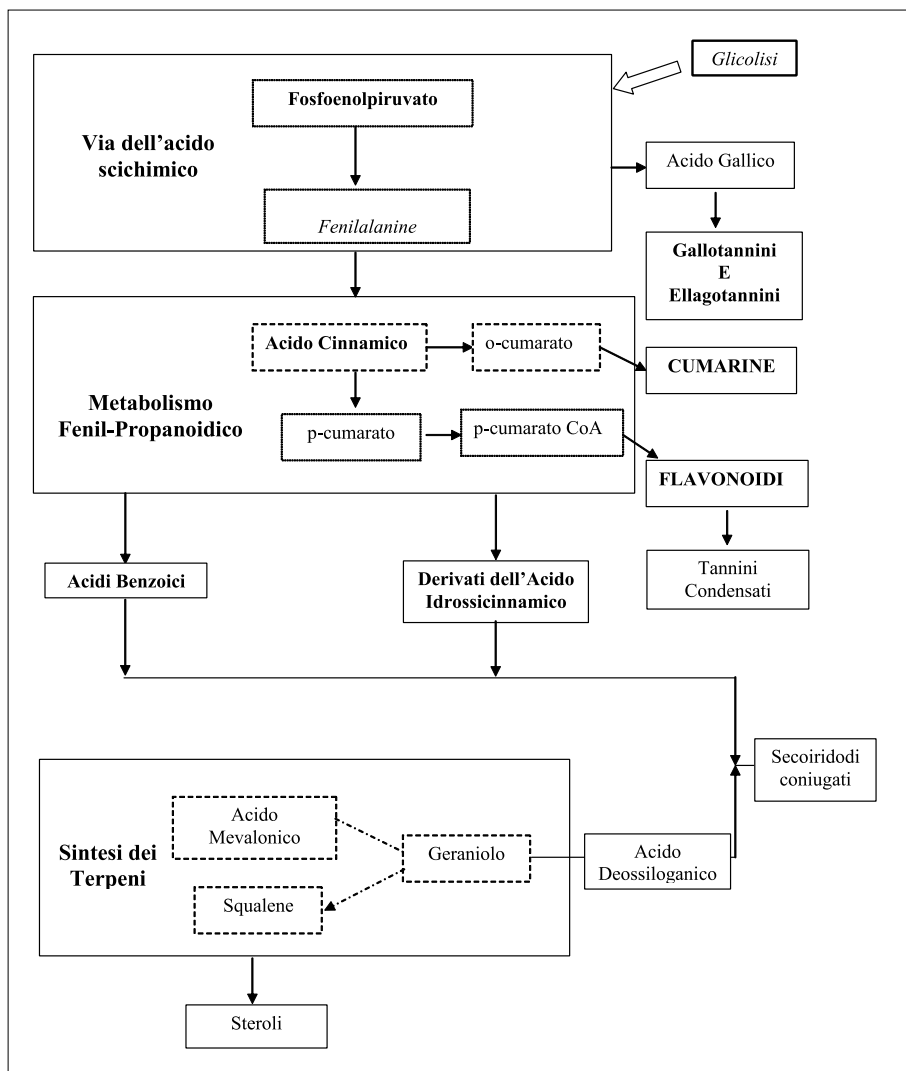


Fig. 3 Schema dei legami tra il metabolismo fenil-propanoidico e la via dell'acido mevalonico

zione (Gordon, 1990; Chimi et al., 1991; Gutierrez et al., 1977; Chimi et al., 1988; Papadopoulos e Boskou, 1991; Ninfali et al., 2001; Bachiocca et al., 2001; Servili e Montedoro 1989; Evangelisti et al., 1997; Briante et al., 2001; Ninfali et al., 2002). Solo di recente si è invece studiata l'incidenza sullo *shelf-life* dell'olio dei singoli composti fenolici presenti negli oli vergini. In questo contesto è stata evidenziata l'attività antiossidante di alcuni derivati dei secoiridoidi come il 3,4-DHPEA-EDA e il 3,4-DHPEA-EA.

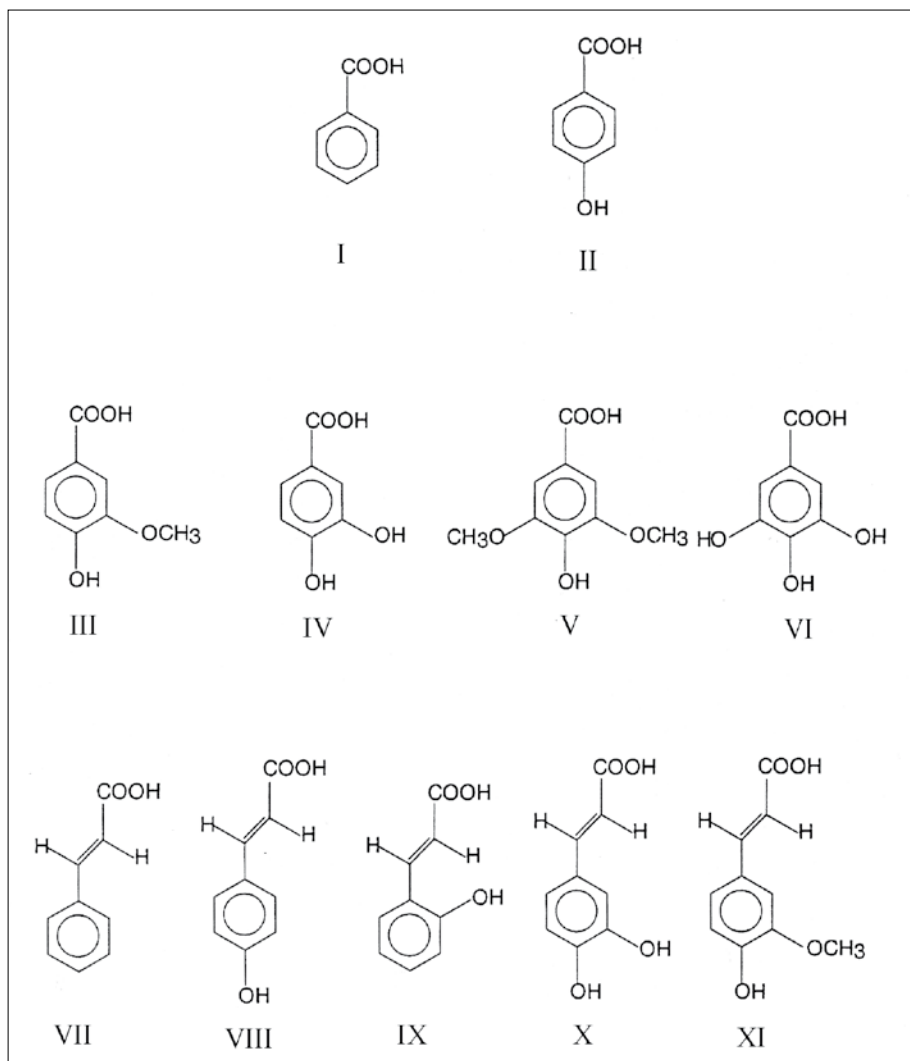


Fig. 4. Struttura chimica dei principali acidi fenolici nell'olio vergine di oliva: Acido Benzoico [I], Acido p-Idrossibenzoico [II], Acido Vanillico [III], Acido Protocatechico [IV], Acido Siringico [V], Acido Gallico [VI], Acido Cinnammico [VII], Acido p-Cumarico [VIII], Acido o-Cumarico [IX], Acido Caffèico [X], Acido Ferulico [XI]. (Servili et al., 2004)

Questi composti hanno infatti, evidenziato una elevata attività protettiva anche nelle fasi di frittura, mentre i lignani hanno dimostrato avere una minore attività nei riguardi della stabilità all'ossidazione dell'olio (Baldioli et al., 1996; Owen et al., 2000; Tovar et al., 2001; Brenes et al., 2002; Gomez Alonso et al., 2003).

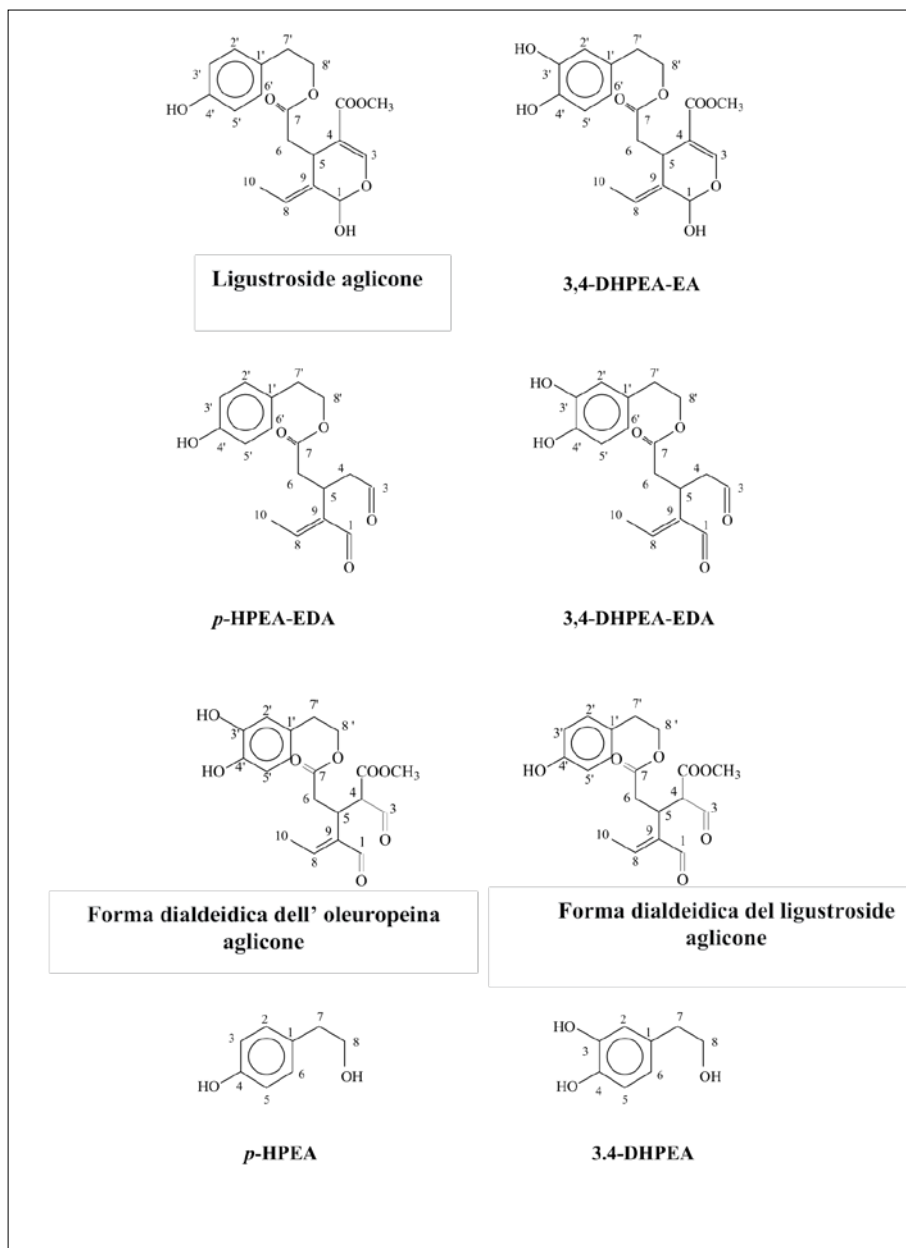


Fig. 5 *Struttura chimica dei secoiridoidi derivati e dei fenil-alcoli presenti nell'olio vergine di oliva. (Servili et al., 2004)*

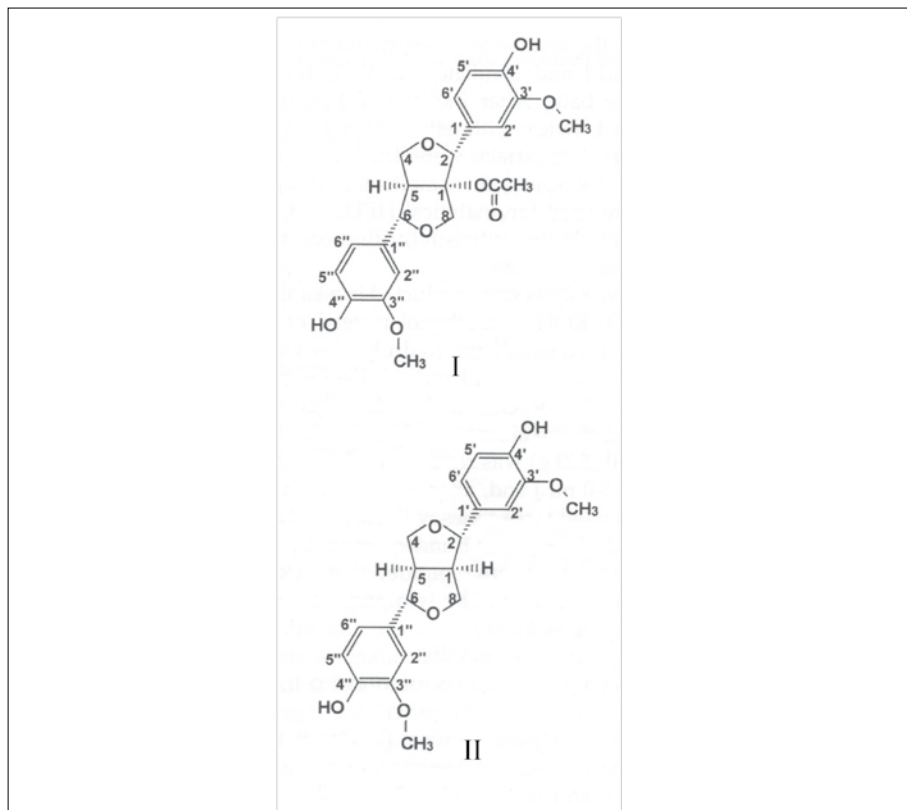


Fig. 6. *Struttura chimica dei lignani presenti nell'olio vergine di oliva.* (Servili et al., 2004)

3. PROPRIETÀ SALUTISTICHE

Per quanto riguarda gli effetti sulla salute, un'attenzione particolare è stata rivolta al possibile coinvolgimento dei suddetti composti secoiridoidi, in particolare del 3,4-DHPEA, nei meccanismi di protezione, esercitati dall'olio d'oliva, sulla insorgenza di alcune malattie cronico-degenerative quali l'aterosclerosi e il cancro, e sui fenomeni infiammatori in generale (Owen et al., 2000c; Gill et al., 2005). Tale interesse è dovuto al fatto che nella patogenesi delle suddette malattie sono sicuramente coinvolti i radicali liberi dell'ossigeno (Ames et al., 1993) e che 3,4-DHPEA (idrossitirosolo) ha un notevole potere antiossidante (Baldioli e Servili, 1996; Owen et al., 2000d). Sono stati evidenziati, infatti, diversi effetti biologici indotti dal 3,4-DHPEA mediati, almeno in parte, dalle sue capacità antiossidanti quali, ad esempio, la capacità di ridurre la perossidazione dei fosfolipidi (Aeschbach et al., 1994), di inibire l'ossidazione delle LDL

(Petroni et al., 1994) e di proteggere diversi tipi cellulari dal danno indotto da uno stress ossidativo (Deiana et al., 1999). Vanno tuttavia ricordati anche altri effetti che sembrano indipendenti dall'azione antiossidante del 3,4-DHPEA come la capacità di inibire l'aggregazione piastrinica e il metabolismo dell'acido arachidonico (Petroni et al., 1994), e di interferire con il metabolismo degli eicosanoidi mediante un effetto inibitorio sull'enzima 5-lipoossigenasi e la conseguente riduzione della produzione del leucotriene B₄ (Petroni et al., 1997). Risultati di particolare interesse hanno evidenziato inoltre che il 3,4-DHPEA è in grado di inibire la proliferazione cellulare, mediante il blocco del ciclo cellulare nella fase G₀/G₁, e di indurre l'apoptosi in linee cellulari tumorali (Fabiani et al., 2002; Fabiani et al., 2006; Hashim et al., 2008; Fitò et al., 2007; Covas, 2007) e la differenziazione cellulare. Risultati che meritano l'approfondimento dei meccanismi coinvolti a livello molecolare.

4. PROPRIETÀ SENSORIALI

La relazione tra la composizione fenolica degli oli vergini di oliva e la nota gustativa di amaro è stata a lungo studiata anche se con risultati spesso non univoci. I primi lavori effettuati sull'argomento hanno evidenziato una relazione tra la sensazione di amaro e il contenuto in polifenoli totali (Gutiérrez Rosales et al., 1992; Montedoro et al., 1992; Beauchamp et al., 2005), mentre solo di recente si è approfondito lo studio sull'incidenza dei singoli composti fenolici sulle proprietà sensoriali degli oli vergini di oliva (Tovar et al., 2001a; García et al., 2001; Kiritsakis, 1998; Gutiérrez Rosales et al., 2003). In questo contesto si è osservato come siano i derivati dei secoiridoidi i componenti a impatto sensoriale maggiormente concentrati negli oli vergini di oliva; il loro contenuto è stato, infatti, spesso correlato alla sensazione di amaro. Va inoltre osservato che, recenti lavori, individuano in un derivato agliconico del ligustroside quale il p-HPEA-EDA uno dei componenti d'impatto della nota di pungente, tipica di alcuni oli vergini di oliva (Andrewes, 2003).

5. INCIDENZA DELLE VARIABILI AGRONOMICHE E TECNOLOGICHE SULLA QUALITÀ DELL'OLIO VERGINE DI OLIVA

Le variabili agronomiche che possono influenzare la composizione fenolica degli oli vergini di oliva sono principalmente la cultivar, l'area geografi-

COMPOSTI FENOLICI	CORATINA	MORAILO	FRANTOIO	CAROLEA	LECCINO
3,4-DHPEA-EA	2,0 ± 0,3	2,1 ± 1,8	1,4 ± 1,4	2,7 ± 2,0	7,9 ± 1,1
p-HPEA	0,9 ± 1,0	0,9 ± 0,7	0,8 ± 0,9	0,7 ± 1,1	12,3 ± 1,6
3,4-DHPEA-EDA	382,4 ± 138,2	340,0 ± 26,2	154,0 ± 26,1	268,0 ± 11,4	67,6 ± 15,5
p-HPEA-EDA	193,2 ± 65,2	99,8 ± 61,2	89,8 ± 7,9	189,6 ± 89,7	12,5 ± 6,2
3,4-DHPEA-EA	177,5 ± 92,6	157,1 ± 84,5	84,1 ± 1,0	134,5 ± 56,3	47,2 ± 15
polifenoli totali	755,9 ± 153,1	599,9 ± 67,1	330,1 ± 27,3	595,5 ± 106,5	147,5 ± 22,5

Tab. 4 Variabilità della composizione fenolica (mg/kg) degli oli vergini di oliva in funzione della cultivar.

I dati sono espressi (mg/kg olio) come media ± deviazione standard delle analisi su dieci campioni. Le olive erano raccolte allo stadio di maturazione industriale e gramolate a 30°C per 60 minuti ed estratti per pressione in impianto pilota. (Servili et al., 2004). La concentrazione dei composti fenolici era valutata per HPLC secondo Montedoro et al. (1992).

ca e le condizioni pedoclimatiche in cui essa viene coltivata con particolare riferimento alle disponibilità idriche e allo stadio di maturazione delle olive (Montedoro et al., 1989; Brenes et al., 1999; Amiot et al., 1986).

5.1 Aspetti agronomici

I principali fattori agronomici verranno, di seguito, analizzati separatamente, evidenziando i riflessi sulla composizione dell'olio.

Cultivar. Numerose ricerche hanno rivelato, che la concentrazione dei composti fenolici con particolare riferimento ai secoiridoidi, dell'oliva e dell'olio dipende fortemente dalla cultivar (tabb. 4 e 5) che incide sui suddetti composti sia quantitativamente che qualitativamente (Gill et al., 2005). Anche i lignani variano molto in funzione della cultivar come, è ben evidente dai dati riportati in tabella 6. Inoltre, il diverso metabolismo di cultivar precoci rispetto a quello delle cultivar tardive, porta a una differenziazione dei processi di sintesi, di polimerizzazione e degradazione di questi composti. Per quanto concerne l'oleuropeina si è visto, che alcune cultivar (Coratina, Rosciola e Frantoio) presentano concentrazioni molto elevate all'inizio dello sviluppo della drupa per poi decrescere progressivamente (fig. 7), mentre la Dolce d'Andria e il Tendellone mostrano livelli di oleuropeina estremamente

COMPOSTI FENOLICI	PICHOLINE	CHETOUI	CHEMLALI
3,4-DHPEA-EA	8,5 ± 0,13	4,6 ± 0,11	0,9 ± 2,72
p-HPEA	21,5 ± 0,21	6,9 ± 0,10	3,4 ± 2,73
3,4-DHPEA-EDA	200,3 ± 17,75	193,7 ± 5,17	80,0 ± 4,64
p-HPEA-EDA	85,6 ± 1,47	75,3 ± 0,93	53,1 ± 7,29
(+)-1-Acetossipinoresinolo	6,3 ± 0,18	17,5 ± 0,68	12,0 ± 7,97
(+)-Pinoresinolo	43,8 ± 0,76	64,5 ± 0,67	11,2 ± 14,63
3,4-DHPEA-EA	151,6 ± 1,09	133,5 ± 1,27	84,5 ± 12,82
Polifenoli totali	517,5 ± 41,2	496,0 ± 32,8	245,1 ± 15,1

Tab. 5 Variabilità della composizione fenolica (mg/kg) degli oli vergini di oliva in funzione della cultivar.

I dati sono espressi (mg/kg olio) come media ± deviazione standard delle analisi su dieci campioni. Le olive erano raccolte allo stadio di maturazione industriale e gramolate a 30°C per 60 minuti ed estratti per pressione in impianto pilota. Risultati non pubblicati. La concentrazione dei composti fenolici era valutata per HPLC secondo Montedoro et al. (1992)

COMPOSTI FENOLICI	(+)-1-ACETOSSIPINORESINOLO	(+)-1-PINORESINOLO
CULTIVAR ITALIANE		
Carolea	69,3 ± 0,8	96,6 ± 0,9
frantoio	58,7 ± 0,9	66,7 ± 0,9
Coratina	59,8 ± 0,6	66,5 ± 0,8
Moraiolo	31,0 ± 0,3	52,6 ± 0,6
Canino	26,4 ± 0,2	137,0 ± 1,0
Cerasuola	26,7 ± 0,1	166,1 ± 1,1
Biancolilla	42,2 ± 0,1	107,0 ± 0,6
Nocellara	31,9 ± 0,1	123,0 ± 0,7
CULTIVAR SPAGNOLE		
Cornicabra	9,8 ± 0,2	124,2 ± 0,4
Hojiblanca	21,8 ± 0,2	61,4 ± 0,4

Tab. 6 Composizione quali-quantitativa in lignani delle maggiori cultivar di olivo italiane e spagnole.

I dati sono espressi (mg/kg olio) come media ± deviazione standard delle analisi su dieci campioni. Le olive erano raccolte allo stadio di maturazione industriale e gramolate a 30°C per 60 minuti ed estratti per pressione in impianto pilota. Risultati non pubblicati. La concentrazione dei lignani era valutata per HPLC secondo Montedoro et al. (1992)

bassi durante tutto il periodo di maturazione, invece il verbascoside e la demetiloleuropeina, sono “cultivar-dipendenti” tanto da essere stati proposti come *marker* per l’origine genetica del frutto (Lo Scalzo e Scarpati, 1993; Servili et al., 1995; Montedoro e Servili, 1992a; Servili et al., 1997).

Maturazione dei frutti. La maturazione del frutto rappresenta un elemento importante per la concentrazione fenolica dell’olio, infatti, la raccolta delle olive a uno stato di maturazione avanzata si traduce in una riduzione della concentra-

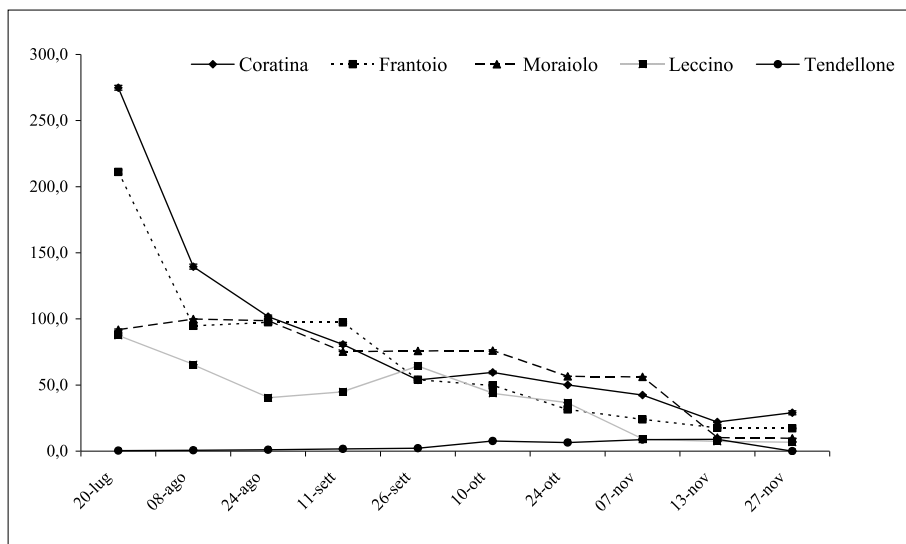


Fig. 7 Effetto della maturazione del frutto nella concentrazione in oleuropeina (mg/g p.s.) in cinque cultivar italiane. I risultati sono il valore medio di tre indipendenti determinazioni, le linee verticali rappresentano \pm la deviazione standard. (Servili et al., 2007 risultati non pubblicati)

zione fenolica del frutto e del relativo olio, con particolare riferimento ai derivati dell'oleuropeina e della demetioleuropeina (tab. 7) (Amiot et al., 1989).

Area geografica. La provenienza geografica della cultivar influenza notevolmente il patrimonio fenolico dell'olio vergine di oliva, infatti, come mostra la tabella 8 gli oli ottenuti dalla stessa cv Coratina) coltivata in differenti are geografiche presentano un contenuto fenolico totale molto diverso (passando da valori di 116 mg/Kg a 692 mg/Kg).

Pratiche agronomiche. Gli effetti più interessanti relativi alle pratiche agronomiche, applicate in olivicoltura sulla qualità dell'olio, riguardano gli interventi irrigui. Una serie di lavori condotti in questa direzione hanno, infatti, evidenziato come l'uso appropriato dell'acqua durante la fase di maturazione del frutto, si traduca non solo in modificazioni sul piano produttivo, ma anche in effetti molto interessanti sul piano della qualità dell'olio (Montedoro e Servili, 1992; Servili et al., 1997; Tovar et al., 2001; Paz Romero et al., 2001; Patumi et al., 1999; Gucci et al., 2004; Servili et al., 2007). Si è, infatti, osservato come l'irrigazione incida principalmente sulla componente fenolica. In particolare le condizioni di stress idrico stimolano la sintesi di sostanze fenoliche nel frutto e quindi il loro aumento nel relativo olio come evidenzia la tabella 9.

COMPOSTI FENOLICI	Moraiolo	
	PRIMO STADIO	SECONDO STADIO
3,4 DHPEA	1,5 ± 0,2	7,9 ± 0,1
p-HPEA	4,1 ± 0,1	3,1 ± 0,1
3-4 DHPEA-EDA	232,3 ± 2,6	32,7 ± 0,2
p-HPEA-EDA	131,3 ± 3,5	27,2 ± 0,1
3-4 DHPEA-EA	80,0 ± 4,4	35,9 ± 0,3
(+)-1-Acetossipinoresinolo	4,4 ± 0,5	3,0 ± 0,0
(+)-1-Pinoresinolo	14,6 ± 0,3	10,2 ± 0,1

Tab. 7 Variabilità della composizione fenolica dell'olio vergine di oliva, in relazione al diverso grado di maturazione dei frutti.

I risultati rappresentano la media ± la deviazione standard di tre analisi indipendenti. La concentrazione dei polifenoli idrofili è stata valutata mediante HPLC secondo Montedoro et al. (1992) (Servili et al., 2005 risultati non pubblicati)

	TUNISIA	ITALIA
3,4-DHPEA-EA	0,6 ± 0,01	2,8 ± 1,30
p-HPEA	2,8 ± 2,9	3,4 ± 0,90
3,4-DHPEA-EDA	52,0 ± 14,1	427,1 ± 31,60
p-HPEA-EDA	21,9 ± 14,2	108,7 ± 12,50
(+)-1-Acetossipinoresinolo	5,8 ± 6,2	19,5 ± 3,70
(+)-Pinoresinolo	15,0 ± 1,6	20,3 ± 6,10
3,4-DHPEA-EA	17,9 ± 18,4	110,1 ± 12,20
Polifenoli totali	116,0 ± 9,7	692,0 ± 53,2

Tab. 8 Concentrazione fenolica (mg/kg) di oli vergini di oliva ottenuti da cv. Coratina, coltivata in differenti aree del mediterraneo

I valori sono medie di cinque differenti campioni ($n = 5$) ± deviazione standard. (Servili et al., 2007 dati non pubblicati)

5.2 Aspetti tecnologici

La composizione fenolica dell'olio vergine di oliva è fortemente influenzata dalle condizioni tecnologiche di produzione e un ruolo fondamentale è giocato dalle fasi di frangitura e gramolatura e dalle condizioni di estrazione.

Frangitura. L'innovazione tecnologica nel campo dell'estrazione meccanica dell'olio vergine d'oliva vede tra i punti meno conosciuti la fase di frangitura. Negli ultimi trenta anni, infatti, si è passati da sistemi di frangitura discontinui quali le molazze, ai frangitori continui, senza che sia stata al contempo sviluppata un'adeguata sperimentazione atta a valutare l'effetto della tecnologia sulla qualità del prodotto. La frangitura, tuttavia, rappresenta una fase critica per la qualità dell'olio, infatti, durante questo processo si ha l'attivazione del patrimonio enzimatico endogeno che catalizza una

COMPOSTI FENOLICI	IRRIGATO	IRRIGATO CON DEFICIT	NON IRRIGATO
3,4-DHPEA*	2,3 ± 0,3 ^a	2,4 ± 0,7 ^a	3,5 ± 0,9 ^a
p-HPEA	7,7 ± 0,8 ^a	7,4 ± 1,4 ^a	3,1 ± 0,4 ^b
3-4 DHPEA-EDA	130,1 ± 25,9 ^a	291,7 ± 40,3 ^b	318,5 ± 39,1 ^b
p-HPEA-EDA	80,2 ± 11,8 ^a	128,2 ± 25,6 ^b	129,9 ± 24,1 ^b
(+)-1-acetossipinoresinolo	4,4 ± 0,8 ^a	3,8 ± 0,9 ^a	6,0 ± 2,6 ^a
(+)-pinoresinolo	44,8 ± 6,7 ^a	49,7 ± 5,6 ^a	47,2 ± 7,9 ^a
3-4 DHPEA-EA	114,1 ± 19,2 ^a	139,6 ± 20,1 ^a	185,5 ± 23,0 ^b

Tab. 9 *Composizione fenolica (mg/kg olio) di oli vergini di oliva provenienti da olivi (cv. leccino) cresciuti con irrigazione normale, con deficit e sotto stress irriguo.*

* I risultati sono il valore medio di cinque determinazioni indipendenti ± la deviazione standard. (a) Le lettere riportate in apice sono i risultati dell'ANOVA e le lettere uguali rappresentano differenze statistiche non significative ($P < 0.01$). La concentrazione dei polifenoli idrofili è stata valutata mediante HPLC secondo Montedoro et al. (1992). (Servili et al., 2007)

serie di reazioni che sono alla base delle caratteristiche organolettiche e della qualità salutistica dell'olio vergine di oliva. Va ricordato, infatti, come in fase di frangitura avvenga la trasformazione dei composti fenolici glucosidi, quali la demetiloleuropeina, l'oleuropeina e il ligustroside, nei relativi agliconi, grazie alle glicosidasi (Heredia et al., 1993). Quest'ultima reazione è anche alla base della solubilizzazione delle suddette sostanze fenoliche nell'olio estratto meccanicamente. Va, infatti, osservato che i secoiridoidi glucosidici e l'oleuropeina in particolare, è contenuta nell'olio vergine di oliva in concentrazioni molto basse, comprese tra 10-50 mg/Kg. Oltre a queste reazioni positive per la qualità sensoriale e salutistica dell'olio, la frangitura attiva complessi enzimatici aventi effetto negativo, quali la polifenolossidasi (PPO) e la perossidasi (POD), che catalizzano la degradazione delle sostanze fenoliche nella fase di gramolatura (Sciancalepore, 1995; Servili et al., 2000). Questi enzimi sono distribuiti come mostrano le figure 8 e 9 in forma diversa nelle parti costitutive della drupa; in particolare la perossidasi è ampiamente contenuta nella mandorla, la polifenolossidasi e le glicosidasi sono presenti quasi esclusivamente nel mesocarpo, mentre la lipossigenasi è contenuta in tutte le parti costitutive del frutto. Questa particolare distribuzione delle attività enzimatiche endogene della drupa lascia intravedere la possibilità di attivare gli enzimi endogeni del frutto in forma differenziata cercando di intervenire selettivamente sulle varie parti costitutive della drupa in fase di frangitura (figg. 9 e 10). Si basano su questo concetto i processi di denocciolatura delle olive che, eliminando la mandorla, riducono la liberazione dell'attività perossidasi nelle paste e quindi l'ossidazione delle sostanze fenoliche dell'olio (Servili et al., 2007b).

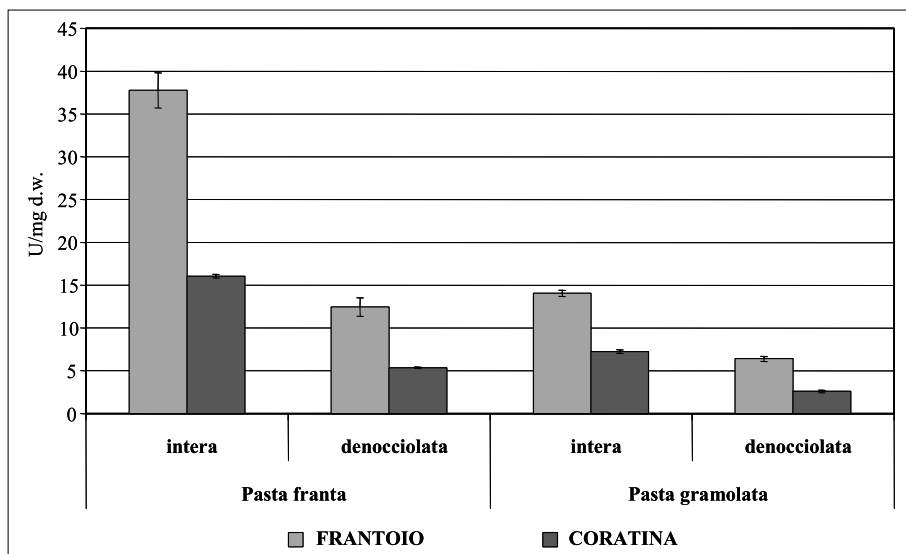


Fig. 8 Attività della POD nelle paste frante e gramolate integrali e denocciolate. (Servili et al., 2007)

Va però considerato come tali processi comportino, allo stato attuale delle conoscenze, una significativa riduzione delle rese industriali di estrazione in quanto, l'eliminazione del nocciolo riduce l'efficienza di separazione dell'olio dalle paste di oliva nella fase di estrazione centrifuga.

Un percorso alternativo a questo riguarda la frangitura "differenziata" delle drupe il cui principio ispiratore è quello di sviluppare un processo che permetta di associare a un'efficiente rottura delle strutture cellulari della polpa (ove è contenuto circa il 98% dell'olio e tra il 92% e il 97% dell'intera frazione fenolica) e della parte legnosa della mandorla (che funge da drenante nella fase di separazione solido/liquido) una limitata degradazione dei tegumenti del seme; questo ultimo elemento può ridurre la liberazione delle perossidasi nelle paste durante la fase di gramolatura. Va osservato a riguardo che i sistemi tradizionali di frangitura come le molazze esplicavano questa attività selettiva, cosa invece non possibile per i sistemi tradizionali a martelli. I frangitori a martelli che sono stati storicamente i primi ad essere introdotti in alternativa alle molazze. L'innovazione tecnologica in questo settore va verso l'uso di macchine di tipo continuo, ma con l'introduzione di corpi battenti che sostituiscano, nel corso della frangitura, all'effetto di percussione, tipico dei frangitori a martelli, quello di taglio; questo ultimo elemento può tradursi in una riduzione della degradazione del tegumento della mandorla e quindi in

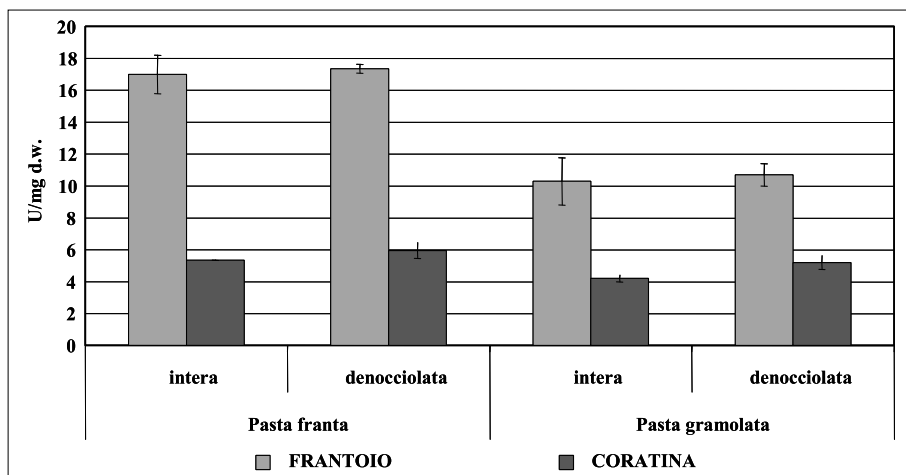


Fig. 9 Attività della PPO nelle paste frante e gramolate integrali e denocciolate. (Servili et al., 2007)

una limitata attivazione delle perossidasi endogene in essa contenute che, degradando le sostanze fenoliche nella fase successiva di gramolatura, riducono la qualità salutistica dell'olio. In questo contesto si inquadra l'introduzione di alcuni nuovi sistemi di frangitura quali il frangitore a denti, il frangitore a coltelli e i frangitori a doppia griglia. Una successiva linea evolutiva va verso l'introduzione di macchine in grado di ridurre il numero di giri del corpo battente. Anche questo approccio tende a produrre un intervento selettivo del frangitore sulle parti costitutive della drupa, operando quindi a livello energetico sulla polpa ma avendo, al contempo, un basso impatto sul seme. Una serie di prove sperimentali che vedevano a confronto il frangitore a martelli, il frangitore a coltelli, un frangitore a basso numero di giri (Rapanelli SPA.) e la denocciolatura hanno evidenziato come in termini di composizione fenolica degli oli, i frangitori di nuova concezione si collocano a un livello intermedio tra il frangitore a martelli tradizionale e la denocciolatura (figg. 10 e 11). Per quanto riguarda i lignani come mostra la figura 12 risultano essere meno influenzati dall'utilizzo di differenti tipi di frangitori.

Gramolatura. Un altro punto critico del processo di estrazione meccanica dell'olio è rappresentato dalla gramolatura (Servili et al., 1994). Anche in questa fase si verificano forti modificazioni a carico dei composti fenolici e volatili. In particolare durante questa fase si ha una forte perdita di composti fenolici e in particolare di tutti i derivati agliconici che si formano durante la frangitura; oltre il 97% di essi, infatti, si disperde nei sottoprodotti come acque di vegetazione e sanse. La gestione del patrimonio antiossidante dell'olio

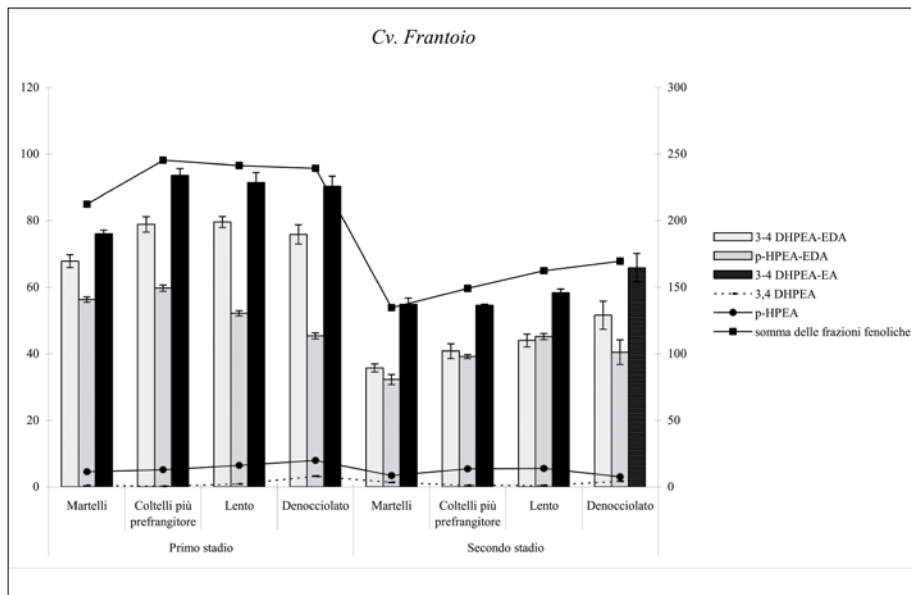


Fig. 10 Effetto di differenti tipi di frangitura sulla composizione fenolica (mg/kg) degli oli vergini di oliva. (I risultati sono il valore medio di tre determinazioni indipendenti le linee verticali rappresentano \pm la deviazione standard. Servili et al., 2006; dati non pubblicati)

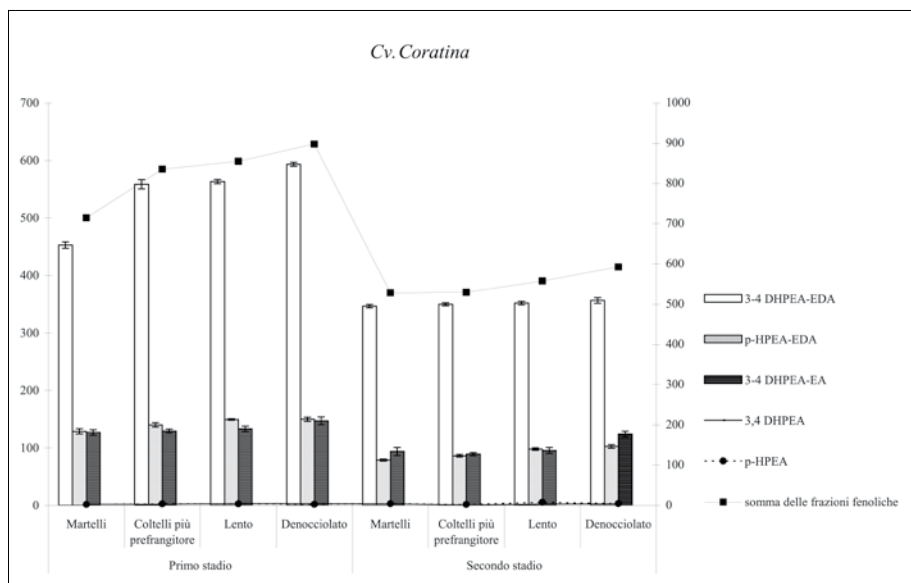


Fig. 11 Effetto di differenti tipi di frangitura sulla composizione fenolica (mg/kg) degli oli vergini di oliva. I risultati sono il valore medio di tre determinazioni indipendenti le linee verticali rappresentano \pm la deviazione standard. Servili et al., 2006; dati non pubblicati

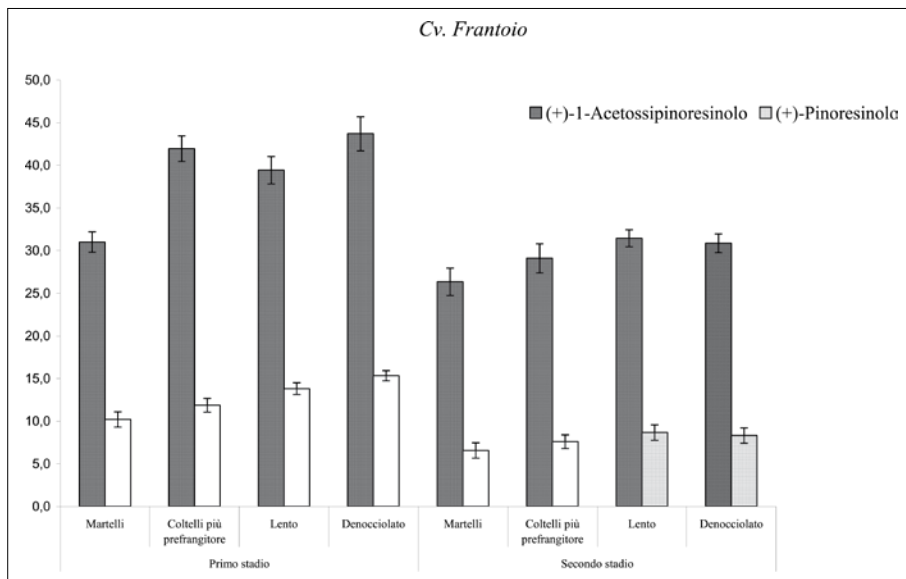


Fig. 12 Effetto di differenti tipi di frangitura sulla composizione in lignani (mg/kg) degli oli vergini di oliva. I risultati sono il valore medio di tre determinazioni indipendenti le linee verticali rappresentano \pm la deviazione standard. Servili et al., 2006; dati non pubblicati

durante la fase di gramolatura e il controllo delle variabili tempo, temperatura e concentrazione di ossigeno, che sono implicati in questa fase, sono pertanto indispensabili per l'ottenimento di un olio che sia apprezzabile da un punto di vista qualitativo. Nelle gramolatrici tradizionali, che prevedono un continuo scambio con l'aria delle paste e quindi un altrettanto continuo assorbimento di ossigeno nel corso del processo, i due unici parametri controllabili sono il tempo e la temperatura di gramolatura. Questi parametri portano a dire che, per ottenere oli di qualità in termini di concentrazione fenolica e volatile, si devono controllare strettamente i tempi di gramolatura (massimo 30 minuti) e le temperature che devono essere comprese tra i 25°C e i 30°C; aumenti dei tempi e delle temperature, si traducono in una perdita massiccia in sostanze fenoliche e in una riduzione della frazione volatile a impatto sensoriale (tabb. 10 e 11).

Nelle gramolatrici di nuova concezione (Servili et al., 2002; Servili et al., 2003a; Servili et al., 2003b; Servili et al., 1998), le paste subiscono la fase di gramolatura in condizioni confinate, riguardo allo scambio gassoso, ovvero l'ossigeno disciolto nelle paste può essere regolato e con esso possono essere controllati i processi di ossidazione dei composti fenolici. La valutazione dell'evo-

COMPOSTI FENOLICI	TEMPERATURE DI GRAMOLATURA			
	20 °C	30 °C	40 °C	50 °C
3,4-DHPEA-EDA	85.8 ^b	27.3 ^c	36.8 ^{bc}	40.8 ^{bc}
p-HPEA-EDA	77.5 ^a	83.1 ^a	70.7 ^a	75.9 ^a
(+)-1-Acetossipinoresinolo	182.7 ^a	174.9 ^a	168.8 ^a	169.5 ^a
3,4-DHPEA-EA	52.9 ^a	28.2 ^{bc}	18.8 ^c	7.3 ^c
Fenoli Semplici	155.6 ^a	114.7 ^a	56.4 ^{bc}	54.4 ^b
Polifenoli totali	231.3 ^c	119.7 ^d	99.3 ^e	83.3 ^c

Tab. 10 *Effetto della temperatura di gramolatura, condotta a contatto con l'aria, sulla composizione fenolica (mg/kg olio) dell'olio vergine di oliva.*

Le lettere sono i risultati dell'ANOVA e le lettere uguali rappresentano differenze statistiche non significative ($P < 0.01$)

luzione dell'ossigeno e dell'anidride carbonica come mostra la figura 13 nel corso della gramolatura portano a concludere che, in primo luogo, non c'è relazione tra ossigeno consumato e anidride carbonica prodotta, mentre una buona correlazione è stata trovata con la modificazione dei composti fenolici delle paste. Infatti, come riportato nelle figure 14 e 15 la concentrazione di ossigeno nello spazio di testa della gramolatrice durante il processo, induce forti modificazioni sulla composizione fenolica nelle paste e negli VOO (tabb. 12, 13). L'oleuropeina, la demetiloleuropeina e i derivati del ligustroside quali 3,4-DHPEA-EDA, 3,4-DHPEA-EA, e p-HPEA-EDA risultano essere molto influenzati dalla quantità di ossigeno presente nello spazio di testa della gramolatrice durante il processo. I lignani al contrario sono più stabili, e quindi meno soggetti alle variazioni del contenuto di ossigeno presente nelle paste. Va anche osservato che dal confronto tra la prova condotta sotto gas inerte (azoto) con quella effettuata con ossigeno a livello dell'aria emergono differenze non significative in termini di concentrazioni fenoliche. L'ossidazione enzimatica secoiridoidi catalizzata dalla PPO e dalla POD può spiegare la relazione esistente tra il decremento dell'ossigeno e la perdita di sostanze fenoliche durante il processo. Infatti, i derivati dei secoiridoidi possono essere considerati come il substrato specifico per i sopra citati enzimi. Utilizzando le gramole confinate che permettono il controllo delle concentrazioni di ossigeno si riesce a ottenere un olio con buone caratteristiche, in termini di composizione fenolica e volatile.

Estrazione per centrifugazione. Attualmente, nei paesi mediterranei, la maggior parte dell'olio vergine di oliva viene estratto per centrifugazione (decanter). Negli ultimi anni si è verificata una notevole evoluzione tecnologica (Montedoro e Servili, 1992; Di Giovacchino et al., 1994; Garcia et al., 2001;

	TEMPO DI GRAMOLATURA	
	30'	60'
Fenoli semplici	72,0 ^a	53,1 ^a
Fenoli idrolizzabili	557,4 ^b	275,0 ^c
3,4 DHPEA	236,1 ^b	39,3 ^c
p-HPEA	88,7 ^a	55,8 ^a
Derivati del p-idrossifeniletanolo	143,9 ^a	134,5 ^a
Oleuropeina aglicone	88,8 ^b	45,5 ^b
Fenoli totali	263,3 ^b	147,4 ^c

Tab. 11 *Effetto del tempo di gramolatura, condotta a contatto con l'aria, sulla composizione fenolica (mg/kg olio) dell'olio vergine di oliva.*

Le lettere sono i risultati dell'anova e le lettere uguali rappresentano differenze statistiche non significative ($P < 0.01$).

Di Giovacchino et al., 2001; Ranalli e Angerosa, 1996; Stefanoudakii et al., 1999; De Stefano et al., 1999) di questo sistema di estrazione al fine di ridurre la quantità di acqua utilizzata nella lavorazione. Considerando quest'ultimo aspetto, le centrifughe possono essere classificate in tre gruppi:

1. decanter tradizionali a tre fasi caratterizzate da una quantità d'acqua di diluizione compresa tra 0.5 e 1 m³/t;
2. decanter a due fasi che possono lavorare senza aggiunta di acqua e che non producono acque di vegetazione come sottoprodotto del processo di estrazione dell'olio;
3. nuove decanter a tre fasi che necessitano di un basso livello d'acqua di diluizione, 0.2-0.3 m³ /t.

Le decanter tradizionali a tre fasi che permettono la separazione dell'olio dall'acqua di vegetazione e dalla sansa vergine con umidità compresa tra il 50% e il 55%, prevedono una diluizione delle paste effettuata per ridurre la loro viscosità e quindi per facilitare la separazione olio-acqua di vegetazione, con un rapporto di diluizione compreso tra 1:0.5 e 1:1 e cioè da 50 a 100 litri di acqua di fonte per 100 Kg di pasta da centrifugare. Questo comporta, oltre all'accumulo di grandi quantità di acqua di vegetazione da smaltire (70-120 litri di acqua di vegetazione per 100 Kg di pasta di olive), una riduzione della qualità dell'olio principalmente dovuta al dilavamento, causato dall'acqua aggiunta, dei composti fenolici presenti all'interno dell'olio, con riduzioni imponenti di questa importantissima frazione antiossidante.

L'evoluzione di questa macchina ha portato alla produzione di centrifughe a due fasi, diffuse soprattutto in Spagna, e a tre fasi, a basso consumo di acqua. Gli oli estratti usando questi nuovi sistemi, confrontati con quelli

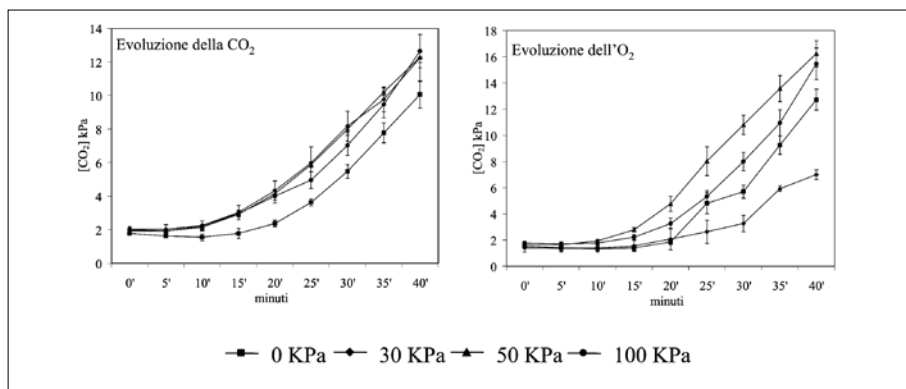


Fig. 13 *Evoluzione della concentrazione di ossigeno e anidride carbonica durante la gramolatura di paste cv. Coratina*

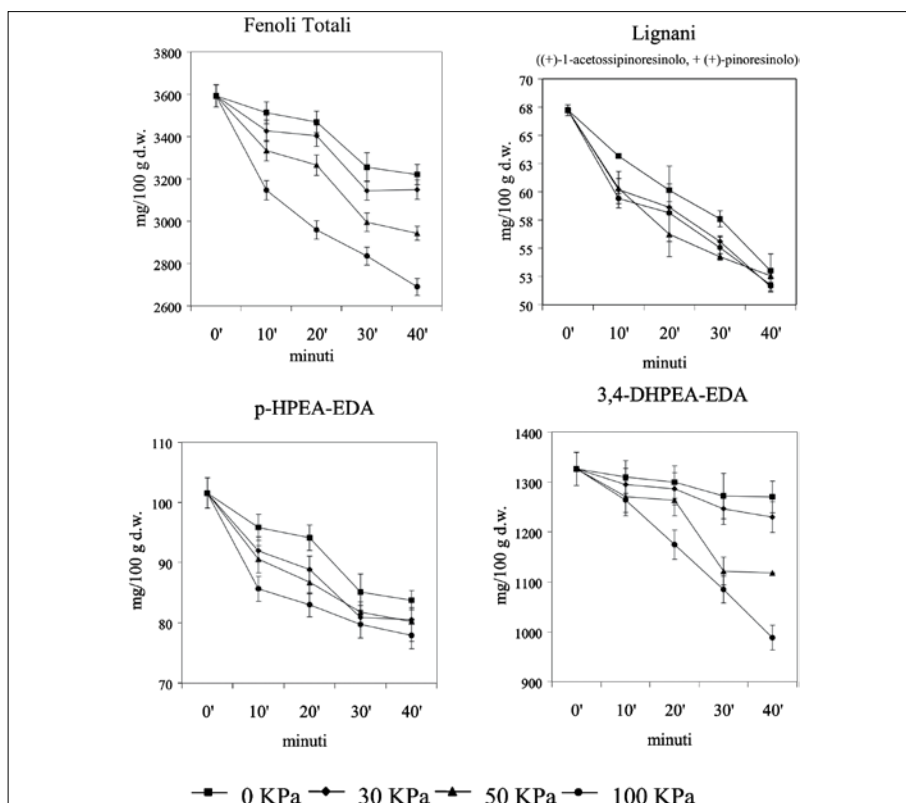


Fig. 14 *Evoluzione della composizione fenolica nelle paste gramolate di cv. coratina a diversi livelli di ossigeno. (I risultati sono il valore medio di tre determinazioni indipendenti le linee verticali rappresentano \pm la deviazione standard)*

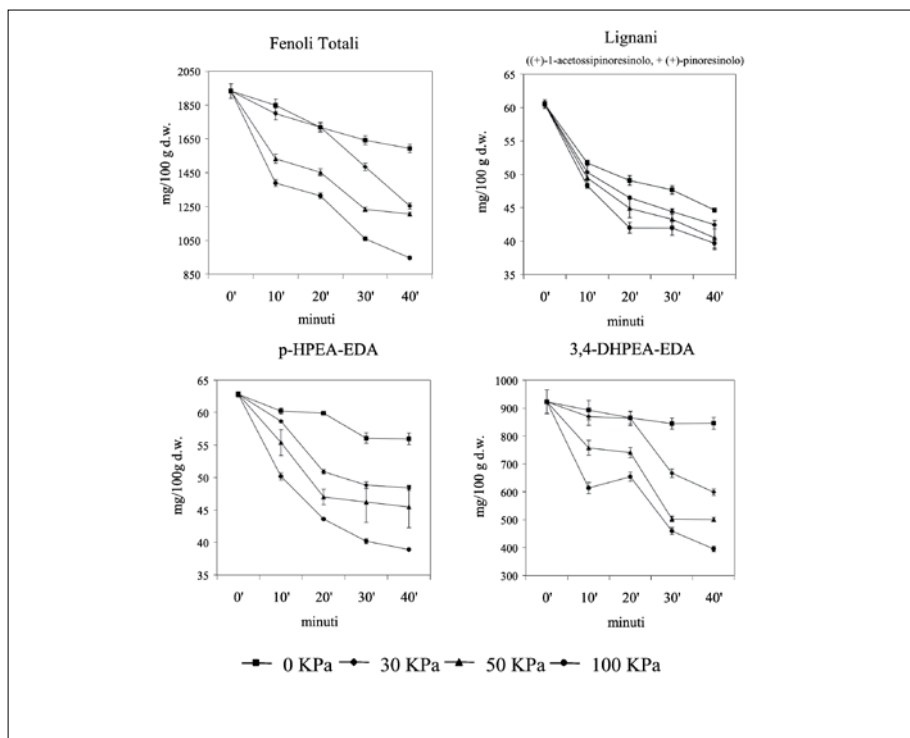


Fig. 15 *Evoluzione della composizione fenolica nelle paste gramolate di cv. Ogliarola a diversi livelli di ossigeno. (I risultati sono il valore medio di tre determinazioni indipendenti le linee verticali rappresentano \pm la deviazione standard)*

COMPOSTI FENOLICI (MG/KG)	O ₂ = 0 KPa	O ₂ = 30 KPa	O ₂ = 50 KPa	O ₂ = 100 KPa
<i>CORATINA cv.</i>				
3,4-DHPEA	6,79 (0,7)a	3,15 (0,8)b	4,4 (0,7)b	1,38 (0,2)c
p-HPEA	10 (1,1)a	5,88 (0,5)bc	7,8 (0,9)b	4,35 (0,4)c
3,4-DHPEA-EDA	478,87 (16,2)a	437,7 (14,3)b	343,08 (11,5)c	229,86 (9,2)d
p-HPEA-EDA	144,24 (1,8)a	135,3 (1,59)b	126,16 (1,4)c	125,11 (3,1)c
(+)-1-acetossipinoresinolo	30,81 (0,94)a	25,83 (2,8)b	29,19 (0,4)ab	27,14 (0,5)ab
(+)-pinoresinolo	8,12 (0,03)ab	7,96 (0,04)a	8,64 (0,4)b	7,93 (0,1)a
3,4-DHPEA-EA	475,59 (13,9)a	361,91 (14,1)b	339,15 (6,9)b	170,61 (2,3)c

Tab. 12 *Concentrazione dei differenti composti fenolici negli oli in funzione della quantità di ossigeno presente in gramolatura. Oli di cv. Coratina. Il contenuto fenolico rappresenta la media di tre sperimentazioni indipendenti \pm deviazione standard. I valori in ogni riga con la stessa lettera non sono significativamente diversi l'uno dall'altro. ($P < 0.05$)*

COMPOSTI FENOLICI (MG/KG)	O ₂ = 0 Kpa		O ₂ = 30 Kpa		O ₂ = 50 Kpa		O ₂ = 100 Kpa	
	OGLIAROLA cv.							
3,4-DHPEA	1	(0,02)a	0,84	(0,05)b	0,64	(0,004)c	0,75	(0,01)d
p-HPEA	3,11	(0,03)a	3,12	(0,7)a	4,05	(0,001)b	4,18	(0,03)b
3,4-DHPEA-EDA	247,68	(1,9)a	235,16	(5,5)b	117,8	(0,8)c	118,09	(0,03)c
p-HPEA-EDA	126,41	(0,4)a	118,61	(5,9)b	86,28	(0,3)c	85,43	(0,62)c
(+)-1-acetossipino- resinolo	21	(0,4)a	25,39	(1,5)b	22,3	(0,3)ac	24,07	(0,09)bc
(+)-pinoresinolo	6,83	(0,07)a	7,57	(0,3)b	7,01	(0,04)a	7,12	(0,03)a
3,4-DHPEA-EA	212,21	(0,1)a	186,4	(4,8)b	100,88	(1,1)c	98,19	(0,2)c

Tab. 13 *Concentrazione dei differenti composti fenolici negli oli in funzione della quantità di ossigeno presente in gramolatura. Oli di cv. Ogliarola.*

Il contenuto fenolico rappresenta la media di tre sperimentazioni indipendenti \pm deviazione standard. I valori in ogni riga con la stessa lettera non sono significativamente diversi l'uno dall'altro. ($P < 0.05$)

	cv. Coratina		cv. Ogliarola	
	DUE FASI	TRE FASI TRADIZIONALE	DUE FASI	TRE FASI TRADIZIONALE
3,4 DHPEA*	0,87 \pm 0,02 ^a	0,58 \pm 0,08 ^b	0,66 \pm 0,11 ^a	0,50 \pm 0,11 ^a
p-HPEA	3,74 \pm 0,07 ^a	2,34 \pm 0,08 ^b	3,30 \pm 0,10 ^a	4,22 \pm 0,10 ^b
Acido Vanillico	0,41 \pm 0,01 ^a	0,19 \pm 0,01 ^b	0,26 \pm 0,01 ^a	0,14 \pm 0,05 ^b
Acido Caffeico	0,16 \pm 0,01 ^a	0,12 \pm 0,02 ^b	0,09 \pm 0,01 ^a	0,21 \pm 0,03 ^b
3,4 DHPEA-EDA	522,2 \pm 13,5 ^a	427,2 \pm 13,8 ^b	30,09 \pm 1,03 ^a	18,53 \pm 0,68 ^b
p-HPEA-EDA	78,16 \pm 0,52 ^a	67,26 \pm 2,55 ^b	20,99 \pm 0,82 ^a	22,40 \pm 0,33 ^a
LGNANI	38,41 \pm 0,10 ^a	35,62 \pm 1,11 ^b	48,00 \pm 3,40 ^a	46,72 \pm 5,78 ^a
3,4 DHPEA-EA	351,7 \pm 11,0 ^a	244,9 \pm 13,6 ^b	68,01 \pm 6,00 ^a	52,04 \pm 3,11 ^b
Polifenoli Totali ⁽³⁾	673 \pm 4 ^a	585 \pm 7 ^b	304 \pm 5 ^a	263 \pm 4 ^b
Periodo di induzione [h]	17,8 \pm 0,1 ^a	15,5 \pm 0,2 ^b	5,2 \pm 0,1 ^a	4,6 \pm 0,1 ^b

Tab. 14 *Effetto dell'estrazione per centrifugazione sulla composizione fenolica (mg/kg olio) dell'olio vergine di oliva.*

I risultati sono il valore medio di tre determinazioni indipendenti \pm la deviazione standard. (a) Le lettere riportate in apice sono i risultati dell'ANOVA e le lettere uguali, in ogni riga, rappresentano differenze statistiche non significative ($P < 0.01$). (Servili et al 2004)

estratti tramite il tradizionale processo di centrifugazione, sono caratterizzati da una concentrazione fenolica più alta, poiché si riduce la perdita di questi composti idrofili nelle acque di vegetazione (tab. 15).

RIASSUNTO

La frazione fenolica dell'olio vergine di oliva riveste una notevole importanza nella definizione delle proprietà sensoriali e salutistiche del prodotto. Nel presente lavoro viene riportata una rassegna sulla composizione fenolica del frutto dell'oliva e degli oli vergini e sulle proprietà salutistiche e sensoriali del prodotto. Inoltre viene evidenziato l'effetto di alcune variabili agronomiche e tecnologiche di produzione sulla composizione fenolica degli oli vergini di oliva.

ABSTRACT

Hydrophilic phenols are the most abundant natural antioxidants of virgin olive oil (VOO). The prevalent classes of hydrophilic phenols found in VOO are phenolic alcohols, phenolic acids, flavonoids, lignans and secoiridoids. Secoiridoids, that include aglycon derivatives of oleuropein, demethyleuropein and ligstroside, that are present in olive fruit, are the most abundant phenolic antioxidants of VOO. The sensory and healthy proprieties of VOO hydrophilic phenols as well as the agronomic and technological parameters that affect their concentration in the oil are discussed in this paper.

BIBLIOGRAFIA

- AESCHBACH R., LOLIGER J., SCOTT B.C., MURCIA A., BUTLER J., HALLIWELL B., ARUOMA O.I. (1994): «Food Chem Toxicol.», 32, p. 31.
- AMES B.N., SHIGENAGA M.K., HAGEN T.M. (1993): Proc Natl Acad Sci U S A., 90, p. 7915
- AMIOT M.J., FLEURIET A., MACHEIX J.J. (1986): «J. Agric Food Chem.», 34, p. 823.
- AMIOT M.J., FLEURIET A., MACHEIX J.J. (1989): *Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation*, «Phytochemistry», 28, p. 67-69.
- ANDREWES P., BUSCH J.L.H.C., DE JOODE T., GROENEWEGEN A., ALEXANDRE H. J. (2003): «Agric. Food Chem.», 51, p. 1415.
- BACCHIOCCA M., ALUIGI G., SERVILI M., BEGLIOMINI A.L., MONTEDORO G.F., NINFALI P. (2001): «Riv. Ital. Sostanze Grasse», 78, p. 151.
- BALDIOLI M., SERVILI M., PERRETTI G., MONTEDORO G.F. J. (1996): «Am. Oil Chem. Soc.», 73, p. 1589.
- BEAUCHAMP G.K., KEAST R.S., MOREL D., LIN J., PIKA J., HAN Q., LEE C.H., SMITH A., BRESLIN P.A. (2005): «Nature», 437, pp. 45-46.
- BRENES M., GARCÍA A., DOBARGANES C., VELASCO J., ROMERO C. J. (2002): «Agric. Food Chem.», 50, p. 5962.
- BRENES M., GARCÍA A., GARCÍA P., RIOS J.J., GARRIDO A. (1999): «J. Agric Food Chem.», 47 pp. 3535-3540.
- BRENES M., HIDALGO F.J., GARCÍA A., RIOS J.J., GARCÍA P., ZAMORA R., GARRIDO A. (2000): «J. Am. Oil Chem. Soc.», 77, p. 715.
- BRIANTE R., LA CARA F., TUNZIELLO P., FEBRAIO F., NUCCI R. (2001): «J. Agric. Food Chem.», 49, p. 3198.

- CHIMI H., CILLARD J., CILLARD P., RAHMANI M. (1991): «J. Am. Oil Chem. Soc.», Elsevier Applied Science, London (UK), 68, p. 307.
- CHIMI H., SADIK A., LE TUTOUR B., RAHMANI M. (1988): «Rev. Fr. Corps Gras», 35, p. 339.
- COVAS M.I. (2007): «Pharmacological Research», 55, pp. 175-186.
- DEJANA M., ARUOMA O.I., BIANCHI M.L., SPENCER J.P.E., KAUR H., HALLIWELL B., AESCHBACH R., BANNI S., DESSI M.A., CORONGIU F.P. (1999): «Free Radic Biol Med.», 26, p. 762.
- DE STEFANO G., PIAQUADIO P., SERVILI M., DI GIOVACCHINO L., SCIANCALEPORE V. (1999): *Fat/Lipids*, p. 101.
- DI GIOVACCHINO L., COSTANTINI N., SERRAIOCCO A., SURRICCHIO G., BASTI C. (2001): «Eur. J. Lipid Sci. Technol», 103, p. 279.
- DI GIOVACCHINO L., SOLINAS M., MICCOLI M. (1994): «J. Am. Oil Chem. Soc.», 71, p. 1189.
- EVANGELISTI F., ZUNIN P., TISCORNIA E., PETACCHI R., DRAVA G., LANTERI S. (1997): «J. Am. Oil Chem. Soc.», 74, p. 1017.
- FABIANI R., DE BARTOLOMEO A., ROSIGNOLI P., SERVILI M., MONTEDORO G.F., MOROZZI G. (2002): «Eur J. Cancer Prev.» 11, p. 351.
- FABIANI R., DE BARTOLOMEO A., ROSIGNOLI P., SERVILI M., SELVAGGINI R., MONTEDORO GF., DI SAVERIO C., MOROZZI G. (2006): «J. of Nut.», 136 (3), pp. 614-619.
- FITÒ M., DE LA TORRE R. COVAS M.I. (2007): «Mol. Nutr. Food Res.», 51, pp. 1215-1224.
- GARCIA A., BRENES M., MARTINEZ F., ALBA J., GARCIA P., GARRIDO A. (2001): «J. Am. Oil Chem. Soc.», 78, p. 625.
- GARCÍA J.M., YOUSFI K., MATEOS R., OLMO M., CERT A. (2001): «J. Agric. Food Chem.», 49, p. 4231.
- GILL C.I.R., BOYD A., MC DERMOTT E., MC CANN M., SERVILI M., SELVAGGINI R., TATICCHI A., ESPOSTO S., MONTEDORO G., MCGLYNN H., ROWLAND I. (2005): «Int. J. Cancer», 1, 117, pp. 1-7.
- GÓMEZALONSO S., FREGAPANE G., SALVADOR M.D., GORDON M.H. (2003): «J. Agric. Food Chem.», 51, p. 667.
- GORDON M.H. (1990): Elsevier Applied Science, London (UK), pp. 118.
- GRIGNAFFINI P., ROMA P., GALLI C., CATAPANO AL (1994): «Lancet.», 343, p. 1296.
- GUCCI R., SERVILI M., ESPOSTO S., SELVAGGINI R. (2004): *Oil quality of olive cv. 'Leccino' grown under irrigated or dryfarmed conditions*, «Acta Hort.», 664, pp. 297-302.
- GUTIERREZ R., GONZALES QUIJANO C., JANER DEL VALLE M.L., JANER DEL VALLE F., GUTIERREZ ROSALES A., VASQUEZ RONCARO A. (1977): «Grasas y Aceites», 28, p. 101.
- GUTIÉRREZ ROSALES F., PERDIGUERO S., GUTIÉRREZ R., OLÍAS J.M. (1992): «J. Am. Oil Chem. Soc.», 69, p. 394.
- GUTIÉRREZ ROSALES F., RÍOS J.J., GÓMEZ REY M.L. (2003): «J. Agric. Food Chem.», 51, p. 6021.
- HASHIM Y.Z.H-Y, ROWLAND R.I., MCGLYNN H., SERVILI M., SELVAGGINI R., TATICCHI A., ESPOSTO S., MONTEDORO GF., KAISALO L., WAHALA K., GILL C.I.R. (2008): «Int. J. Cancer», 122, pp. 495-500.
- HEREDIA A., GUILLÉN R., JIMÉNEZ A., BOLAÑOS J.F. (1993): «Lebensm Unters Forsch.», 196, pp. 147-151.
- KIRITSAKIS A.K. (1998): «J. Am. Oil Chem. Soc.», 75, p. 673.
- LO SCALZO R., SCARPATI M.L. (1993): *A new secoirodoid from olive waste waters*, «J. Natural Products», 56, pp. 621-623.

- MAESTRO DURÁN R., VASQUEZ RONCARO A. (1976): «Gracias y Aceytes», 27, p. 237.
- MAZZA, MINIATI E. (1993): *Anthocyanis in fruits, vegetables and grains*, CRC Press, Boca Raton, Florida (USA) p. 64; (13) MARKOV N.L., *Polyphenol*, Reserarch in Bulgaria. Bull liaison Groupe Polyphenols (1984), p. 12.
- MONTEDORO GF. (1972): S.T.A., 3, p. 177.
- MONTEDORO GF., BALDIOLI M., SERVILI M. (1992): «Giornale Ital. di Nutriz. Clin. e Prev.», 1, p.19.
- MONTEDORO GF., GAROFALO L., BERTOLUCCI M., PANELLI G. (1989): *Influence of the cultivars and pedoclimatic condition on the virgin olive oil quality*, Proceedings of the international flavor conference, Rethymnon, Crete, (Greece), 5-7 July 1989. Ed G. Charalambous, Elseiver Science Publishers B.V., Amsterdam, pp. 881-891.
- MONTEDORO GF., SERVILI M., BALDIOLI M., MINIATI E. (1992): «J. Agric. Food Chem.», 40, p. 1571.
- MONTEDORO GF., SERVILI M. (1992a): «Riv. Ital. Sost. Grasse», LXIX, p. 563.
- MONTEDORO GF., SERVILI M. (1992b): Proceeding of the International Congress "Olive Oil Quality", Firenze (Italy), 13 December 1992, pp. 97-108.
- NINFALI P., ALUIGI G., BACCHIOCCA M., MAGNANI M. (2001): «J. Am. Oil Chem. Soc.», 78, p. 243.
- NINFALI P., BACCHIOCCA M., BIAGIOTTI E., SERVILI M., BEGLIOMINI A.L., MONTEDORO GF. (2002): «J. Am. Oil Chem. Soc.», 79, p. 1151.
- OWEN R.W., MIER W., GIACOSA A., HULL W.E., SPIEGELHALDER B., BARTSCH H. (2000a): «Clin. Chem.», 46, p. 976.
- OWEN R.W., MIER W., GIACOSA A., HULL W.E., SPIEGELHALDER B., BARTSCH H. (2000b): «Food Chem. Toxicol.», 38, p. 647.
- OWEN R.W., GIACOSA A., HULL W.E., HAUBNER R., WÜRTELE G., SPIEGELHALDER B., BARTSCH H. (2000c): «Lancet Oncol.», 1, p. 107.
- OWEN R.W., GIACOSA A., HULL W.E., HAUBNER R., SPIEGELHALDER B., BARTSCH H. (2000d): «The. Eur. J. Cancer.» 36, p. 1235.
- PAPADOPOULOS G., BOSKOU D. (1991): «J. Am. Oil Chem. Soc.», 68, p. 669.
- PATUMI M., D'ANDRIA R., FONTANAZZA G., MORELLI G., GIORIO P., SORRENTINO G. (1999): «J. Hort. Sci. Biotech.», 74, pp. 729-737.
- PAZ ROMERO M., TOVAR M.J., GIRONA J., MOTILVA M.J. (2002): «J. Agric. Food Chem.», 50, pp. 5349-5354.
- PETRONI A., BLASEVICH M., PAPINI N., SALAMI M., SALA A., GALLI C. (1997): «Thromb Res.» 87, p. 315.
- PETRONI A., BLASEVICH M., SALAMI M., SERVILI M., MONTEDORO GF., GALLI C. (1994): «World Rev Nutr Diet.», 75, p. 169.
- RANALLI A., ANGEROSA F. (1996): «J. Am. Oil Chem. Soc.», 73, p. 417.
- RODRIGUEZ LOPEZ V. (2000): *Distribution and Biosynthesis of Iridoid Glucosides in the Loasaceae Family*, DTU Departmentt of Organic Chemistry.
- SCIANCELEPORE V. (1985): «J. Food Sci.», 50, pp. 1194-1195.
- SERVILI M., BALDIOLI M., BEGLIOMINI A.L., MONTEDORO GF. (1995): Atti del 2° congresso Italiano di Scienza e Tecnologia degli alimenti, Cernobbio (CO), pp. 851-860.
- SERVILI M., BALDIOLI M., BEGLIOMINI A.L., SELVAGGINI R., MONTEDORO GF. (2000): *Flavour Frag Chem.*, V. Lanzotti and O. Tagliatalata-Scafati eds., Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 163-173.
- SERVILI M., BALDIOLI M., MARIOTTI F., MONTEDORO GF. (1997): *Phenolic composition of olive fruit and virgin olive oil: distribution in the costitutive parts of fruit and evolu-*

- tion during the oil mechanical extraction process*, Proceeding of the Third International Symposium on Olive Growing, Creta, Grecia..
- SERVILI M., BALDIOLI M., MONTEDORO G.F. (1994): *Proceedings of the Second International Symposium on Olive Growing*, Jerusalem, Israel 6-10 September 1993, in «Acta Hort.», S. Lavee and I. Klein eds., 1, pp. 331-336.
- SERVILI M., BALDIOLI M., SELVAGGINI R., MACCHIONI A., MONTEDORO G.F. (1999): «J. Agric. Food Chem.», 47, p. 12.
- SERVILI M., BALDIOLI M., SELVAGGINI R., MARIOTTI F., FEDERICI E., MONTEDORO G.F. (1998): 13 the International symposium on plant lipids, Seville, pp. 307-310.
- SERVILI M., ESPOSTO S., LODOLINI E.M., SELVAGGINI R., TATICCHI A., URBANI S., MONTEDORO G.F., SERRAVALLE M., GUCCI R. (2007a): «J. Agric. Food Chem.», 55, pp. 6609-6618.
- SERVILI M., MONTEDORO G.F. (1989): «Industrie Alimentari», 28, p. 14.
- SERVILI M., SELVAGGINI R., BALDIOLI M., BEGLIOMINI A.L., TATICCHI A., ESPOSTO S. (2002): *Innovation in virgin olive oil processing*, «Riv. Ital. Sost. Grasse», 79, pp. 439-441.
- SERVILI M., SELVAGGINI R., TATICCHI A., ESPOSTO S., MONTEDORO G.F. (2003a): «Journal of the American Oil Chemists' Society», 80, pp. 685-695.
- SERVILI M., SELVAGGINI R., TATICCHI A., ESPOSTO S., MONTEDORO G.F. (2003b): «J.Agric.Food Chem.», 51, pp. 7980-7988.
- SERVILI M., TATICCHI A., ESPOSTO S., URBANI S., SELVAGGINI R., MONTEDORO G.F. (2007b): «J. Agric. Food Chem.», 55, pp. 7028-7035.
- STEFANOUDAKI E., KOUTSAFTAKIS A., KOTSIFAKI F., ANGEROSA F., DI GIROLAMO M. (1999): «Acta Horticulturae», 474, pp. 705.
- TOVAR M.J., MOTILVA M.J., PAZ ROMERO M. (2001a): «J. Agric. Food Chem.», 49, p. 5502.
- TOVAR M.J., MOTILVA M.J., PAZ ROMERO M. (2001b): «J. Agric. Food Chem.», 49, pp. 5502-5508.
- VASQUEZ RONCARO A. (1978): «Rev. Fr. Corps Gras», 25, p. 21.
- VASQUEZ RONCARO A., GRACIANI COSTANTE E., MAESTRO DURÁN R. (1974): «Gracas y Aceites», 25, p. 269.