



Campagna finanziata con il contributo
della Comunità Europea e dell'Italia - Reg. (CE) 867/08



Sistemi di controllo del rispetto delle norme di autenticità e qualità dell'olio di oliva e delle olive da tavola

UNAPROL

Chi più sa, più vuole sapere

La ricerca scientifica applicata all'olivicoltura è un mezzo indispensabile per migliorare l'efficienza delle imprese e per essere competitivi sui mercati mondiali a tutti i livelli.

La tecnologia olearia italiana ha fatto grande il made in Italy in tutto il mondo e lo sviluppo della ricerca nel miglioramento della qualità del prodotto è stato alla base di questo successo.

Le ricerche sostenute da Unaprol con il contributo del mondo universitario su: risonanza magnetica per caratterizzare geograficamente gli oli italiani ed i relativi territori di produzione; l'individuazione dei marcatori di qualità e gli effetti dell'irrigazione nella gestione del suolo; la qualità dell'offerta per quanto riguarda gli oli extra vergine di oliva e gli studi sull'analisi sensoriale e nutrizionale - unita alla identificazione e tipizzazione delle varie cultivar con la standardizzazione dei processi lavorazione biologica per il miglioramento delle olive da tavola - rappresentano un importante contributo di conoscenza.

Questo impegno per i temi della ricerca è in linea con gli obiettivi della regolamentazione comunitaria e contribuisce a rafforzare in Europa l'immagine di un Paese che ha voglia di progredire sul piano della conoscenza che soddisfa la richiesta delle imprese - che hanno fame di innovazione - e l'esigenza di trasparenza sui mercati da parte dei consumatori.

Unaprol che ha sempre sostenuto, con le risorse degli olivicoltori la ricerca scientifica, è grata a tutti i docenti ed esperti universitari che hanno condotto gli studi presentati in questo volume. Un grazie particolare al prof. Maurizio Servili dell'Università di Perugia che ha coordinato questo lavoro del sapere che è un piacere presentare nell'intento di agevolare il contatto tra la richiesta di informazione e l'offerta di conoscenza. Buona lettura a tutti.

Massimo Gargano
Presidente di Unaprol



Al nostro caro amico
Ranieri Filo della Torre

"omnia vincit amor"





FILIERA OLIVICOLA

**PROGETTAZIONE, REALIZZAZIONE E GESTIONE DI SISTEMI
DI CONTROLLO DEL RISPETTO DELLE NORME DI AUTENTICITÀ,
QUALITÀ E COMMERCIALIZZAZIONE DELL'OLIO DI OLIVA
E DELLE OLIVE DA MENSA IMMESSI SUL MERCATO.**



COORDINAMENTO EDITORIALE:

Michele Bungaro

COMITATO TECNICO

Fabio Tognetti

Domenico De Santis

Biagio Rastelli

Nazario D'errico

Miriam Mastromauro

Nunzio Scaramozzino

Attilio Ferraiolo

PREFAZIONE

PRESENTAZIONE

OLI EXTRA VERGINI DI OLIVA

Analisi di Spettrometria di Massa Isotopica e di Risonanza Magnetica Nucleare per la caratterizzazione geografica e la tracciabilità di oli extravergini di oliva italiani.

Portarena S., Gobbino M., Lauteri M., Mannina L., Donatella Capitani, Brugnoli E. CNR Porano

Applicazione di alcuni markers di qualità per la caratterizzazione genetica e geografica degli oli extravergini di oliva italiani.

Servili M., Urbani S., Esposito S., Taticchi A., Di Maio I., Sordini B., Veneziani G., Selvaggini R.

Effetti dell'irrigazione e della gestione del suolo sulla qualità delle produzioni olivicole di diverse cultivar italiane.

Gucci R., Servili M., Caruso G., Urbani S., Taticchi A., Esposito S., Gucci

OLIVE DA TAVOLA

PRESENTAZIONE

Analisi nutrizionale e sensoriale delle olive da tavola nell'ambito delle attività previste dal Regolamento CE n.867/2008.

Lanza B., Di Serio M.G., Iannucci E., Russi F., CRA

Identificazione, tipizzazione molecolare e caratterizzazione biotecnologica di batteri lattici e lieviti di olive da tavola fermentate al naturale.

Aldo Corsetti, Giorgia Perpetuini, Rosanna Tofalo, Maria Schirone, Giuseppe Fasoli, Giovanna Suzzi*

Standardizzazione del processo di deamarizzazione biologica per il miglioramento della qualità delle olive da tavola di varietà italiane.

Servili M., Esposito S., Urbani S., Taticchi A., Di Maio I., Veneziani G., Sordini B., Selvaggini R.

DISCIPLINARE DI PRODUZIONE





FILIERA OLIVICOLA

Chi più sa, più vuole sapere

La ricerca scientifica applicata all'olivicoltura è un mezzo indispensabile per migliorare l'efficienza delle imprese e per essere competitivi sui mercati mondiali a tutti i livelli.

La tecnologia olearia italiana ha fatto grande il made in Italy in tutto il mondo e lo sviluppo della ricerca nel miglioramento della qualità del prodotto è stato alla base di questo successo.

Le ricerche sostenute da Unaprol con il contributo del mondo universitario su: risonanza magnetica per caratterizzare geograficamente gli oli italiani ed i relativi territori di produzione; l'individuazione dei marcatori di qualità e gli effetti dell'irrigazione nella gestione del suolo; la qualità dell'offerta per quanto riguarda gli oli extra vergine di oliva e gli studi sull'analisi sensoriale e nutrizionale - unita alla identificazione e tipizzazione delle varie cultivar con la standardizzazione dei processi lavorazione biologica per il miglioramento delle olive da tavola - rappresentano un importante contributo di conoscenza.

Questo impegno per i temi della ricerca è in linea con gli obiettivi della regolamentazione comunitaria e contribuisce a rafforzare in Europa l'immagine di un Paese che ha voglia di progredire sul piano della conoscenza che soddisfa la richiesta delle imprese - che hanno fame di innovazione - e l'esigenza di trasparenza sui mercati da parte dei consumatori.

Unaprol che ha sempre sostenuto, con le risorse degli olivicoltori la ricerca scientifica, è grata a tutti i docenti ed esperti universitari che hanno condotto gli studi presentati in questo volume. Un grazie particolare al prof. Maurizio Servili dell'Università di Perugia che ha coordinato questo lavoro del sapere che è un piacere presentare nell'intento di agevolare il contatto tra la richiesta di informazione e l'offerta di conoscenza. Buona lettura a tutti.

Massimo Gargano
Presidente di Unaprol





La caratterizzazione degli oli di oliva in termini di cultivar, di provenienza geografica, di genuinità e di qualità è un argomento attuale molto dibattuto. Le caratteristiche peculiari di un olio, che ne determinano la qualità, sono il risultato di diversi fattori quali quello tecnologico (gramolatura, tipo di estrazione), agronomico (tipologia di impianto, pratiche colturali: irrigazione, concimazione), genetico (cultivar di provenienza), pedoclimatico (suoli e clima), ecologico (altimetria, luce esposizione) e anche l'annata di produzione. E' pertanto crescente la necessità di salvaguardare e valorizzare il prodotto nazionale facendo emergere le caratteristiche peculiari di oli provenienti da aree geografiche diverse. Tale esigenza nasce da una mutata concezione di qualità da parte del consumatore, che fa della qualità e della tipicità gli elementi imprescindibili per un olio extravergine di qualità.

In tal senso l'Unaprol, con questa azione, ha inteso supportare e tutelare le produzioni di alta qualità attraverso l'introduzione di sistemi di controllo del rispetto delle norme di autenticità e qualità. In particolare, nelle aree olivicole più vocate del territorio nazionale sono stati costruiti dei modelli di gestione e di verifica, basati su metodologie innovative e già acquisite dal mondo scientifico, al fine di verificare il rispetto delle norme di autenticità, qualità e commercializzazione dell'olio di oliva e delle olive da mensa immesse sul mercato.

In particolare, si registra un crescente interesse sulle olive da mensa da parte delle imprese, unitamente ed i notevoli margini di crescita che il settore potrebbe avere nei prossimi anni, ha portato l'Unaprol ad occuparsi in maniera più mirata della filiera olive da tavola Italiane. Tale attività si estrinseca attraverso la dotazione della filiera delle olive da tavola di sistemi di gestione e controllo del rispetto delle norme di qualità e commercializzazione delle olive da mensa immesse sul mercato. In tal senso, è stato messo a punto un disciplinare che regola ogni fase di produzione delle olive da tavola e che consente di ottenere un prodotto di Alta Qualità Italiano ed ancora di garantirne il rispetto delle norme di autenticità, qualità e commercializzazione delle olive da mensa immesse sul mercato.

Nei capitoli successivi sono riportate le sintesi dei risultati di questa attività triennale mirata alla realizzazione e gestione dei sistemi di controllo del rispetto delle norme di autenticità, qualità e commercializzazione dell'olio di oliva e delle olive da tavola.

In particolare, in merito alla filiera dell'olio di oliva, ai fini della caratterizzazione geografica del prodotto si sono rilevati interessanti i metodi basati sull'analisi di Massa Isotopica, Risonanza Magnetica Nucleare e alcuni Markers per la caratterizzazione genetica degli oli extra vergini di oliva italiani.

Relativamente alla filiera delle olive da tavola, il disciplinare di Alta Qualità Italiana delle olive da tavola, rappresenta la sintesi dei lavori rigorosi condotti dai vari partner scientifici, sia per la messa a punto delle tecniche di trasformazione, che delle norme di autenticità del prodotto.





FILIERA OLIVICOLA

Analisi di Spettrometria di Massa Isotopica e di Risonanza Magnetica Nucleare per la caratterizzazione geografica e la tracciabilità di oli extravergini di oliva italiani.

Tracciabilità geografica e caratterizzazione di oli extravergini di oliva italiani.

SUMMARY:

Sono stati analizzati 273 oli italiani delle stagioni 2009 e 2010. Le analisi IRMS hanno individuato una correlazione tra $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{18}\text{O}$ e latitudine, temperatura e pioggia, valutando anche l'effetto stagionale. I campioni del nord hanno una composizione isotopica più leggera di carbonio e ossigeno, quelli delle isole sono più arricchiti in entrambe le annate. Si sono distinte quattro aree geografiche: nord, isole, sud Tirreno e centro-sud Adriatico. Le analisi NMR hanno definito simili classi geografiche, hanno monitorato l'effetto stagionale e le variabili caratteristiche per ogni regione. Gli oli sardi mostrano una maggiore concentrazione di squalene e acido linoleico, gli oli toscani sono ricchi di terpeni 2 e 1, β sitosterolo e cere, gli oli calabresi mostrano valori di terpeni 2 e 3 più bassi rispetto agli altri campioni peninsulari. L'effetto stagionale si osserva nella diminuzione della concentrazione delle aldeidi tra il primo e il secondo anno in tutte le regioni tranne la Sicilia. In generale la differenza stagionale si nota per Toscana, Lombardia, Molise, Sicilia e Sardegna. Nel Lazio e nella Puglia la differenza è meno netta. Gli oli della Calabria sono gli unici che non mostrano alcun effetto stagionale. L'effetto delle cultivar è stato studiato da entrambe le tecniche.

1 Introduzione

L'olivo, *Olea europaea* L., è la più importante coltura per la produzione di olio nel bacino del Mediterraneo, l'Italia è uno dei più forti produttori insieme a Spagna e Grecia. La qualità dell'olio è influenzata dai fattori più diversi, quali tecniche agronomiche, condizioni stagionali, stato di salute delle drupe, stadio di maturazione, sistemi di raccolta e di trasporto delle olive, metodo e durata della conservazione, tecnologie di preparazione. L'analisi di tracciabilità della provenienza geografica degli alimenti rappresenta una condizione importante per tutelare i prodotti di origine controllata e protetta ai quali il consumatore è disposto ad accordare un valore aggiunto sul mercato.

Da diversi anni, accanto alle analisi convenzionali di legge che definiscono la qualità di un olio di oliva [1], vengono utilizzate la spettroscopia NMR (Risonanza Magnetica Nucleare) e la Spettrometria di Massa Isotopica (IRMS) le quali, insieme ad un'appropriate analisi statistica multivariata, permettono un'analisi più approfondita del prodotto in relazione alla propria origine geografica [2-11]. I rapporti isotopici nella sostanza organica vegetale hanno valori diversi a seconda dell'area di origine (latitudine, altitudine, distanza dal mare), del clima (temperatura, umidità, piovosità), delle caratteristiche geologiche, delle pratiche di concimazione adottate, della specie e della cultivar [7]. Tali variazioni naturali dell'abbondanza isotopica (frazionamento isotopico) sono conseguenza delle diverse proprietà chimico-fisiche degli isotopi di

Silvia Portarena¹, Marco Gobbino², Marco Lauteri¹, Luisa Mannina^{2,3}, Donatella Capitani², Enrico Brugnoli¹

¹CNR- Istituto di biologia Agroambientale e Forestale, I- 05010 Porano Terni

² CNR, Istituto di Metodologie Chimiche, Laboratorio di Risonanza Magnetica "Annalaura Segre", I-00015 Monterotondo S. (Roma)

³ Sapienza Università di Roma, Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, P.le Aldo Moro 5, I-00185 Roma

Corresponding author: Silvia Portarena, CNR- Istituto di biologia Agroambientale e Forestale, I- 05010 Porano (Terni), fax: 0763374980, email: silvia.portarena@ibaf.cnr.it

Parole chiave: tracciabilità, olio di oliva, NMR, IRMS.

Running title: NMR (Nuclear Magnetic Resonance), IRMS (Isotopic Ratio Mass Spectrometry), PCA (Principal Component Analysis), LDA (Linear Discriminant Analysis), ANOVA (ANALYSIS OF VARIANCE).



uno stesso elemento dovute alla loro differente massa e spin nucleare.

La distribuzione degli isotopi dell'ossigeno nell'acqua ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) in una qualsiasi posizione geografica è legata al ciclo idrologico del luogo, ai fenomeni atmosferici globali e al contenuto isotopico originale [8]. La distribuzione degli isotopi stabili del carbonio nel mondo vivente è invece determinata, in maniera preponderante, dal frazionamento isotopico durante la fissazione fotosintetica di CO_2 . [9] I recenti progressi nella spettrometria di massa isotopica accoppiata a gas-cromatografia consentono la misura dei rapporti isotopici di vari elementi leggeri e l'identificazione dell'origine geografica di prodotti agroalimentari quali l'olio extravergine di oliva. [8, 10-11]

I vantaggi che la Risonanza Magnetica Nucleare al protone ($^1\text{H-NMR}$) offre nell'analisi delle matrici alimentari riguardano principalmente la possibilità di ottenere informazioni sia qualitative che quantitative su gran parte dei composti costituenti la matrice alimentare, tramite una sola analisi. È possibile quindi individuare anche i componenti presenti in minor concentrazione quali composti volatili come aldeidi e terpeni o molecole di interesse salutistico come β -sitosterolo e squalene. L'analisi viene effettuata direttamente sull'olio senza la necessità di effettuare estrazioni, riducendo i tempi di analisi e gli errori. La tecnica $^1\text{H-NMR}$, unita ad un'analisi statistica multivariata, ha permesso da anni di studiare approfonditamente gli oli di oliva. In particolare si possono caratterizzare gli oli in relazione alla provenienza geografica o a tutti gli altri effetti che caratterizzano la composizione chimica dell'olio [2-6]. Infatti non solo parametri come il clima, il terreno e il tipo di varietà di pianta coltivata (cultivar) condizionano la composizione chimica dell'olio di oliva, ma anche le tecniche agronomiche e i fattori antropologici legati ad usi, tradizioni, modalità e tempi di raccolta. Ne risulta quindi una matrice chimica piuttosto complessa, ciò che generalmente si osserva negli spettri $^1\text{H-NMR}$ dei diversi oli è che il loro profilo risulta conservativo ovvero mostra qualitativamente gli stessi composti chimici per tutti i campioni analizzati, le differenze che si notano sono invece di tipo quantitativo, ovvero cambiano le concentrazioni delle varie specie presenti.

2 Materiali e metodi

2.1 Campionamento e conservazione dei campioni

Sono stati raccolti campioni di olio extravergine di oliva prodotti in diverse regioni italiane in successive annate di produzione. I campioni sono stati forniti dalle aziende agricole selezionate dall'UNAPROL. In particolare è stato raccolto un totale di 151 campioni di 8 regioni nella stagione 2009/10 e di 122 oli di 9 regioni nella stagione 2010/11. Allo stato attuale si sono cominciati ad analizzare anche i primi 28 campioni, di due regioni, raccolti della terza stagione di monitoraggio 2011/12. Il numero di campioni per ogni regione, le coordinate geografiche e i dati meteo (piovosità e temperatura) forniteci dall'Istituto di Scienze dell'Atmosfera e del Clima del CNR, sono riportati nella tabella 1.

Le bottiglie di olio sono state conservate in un locale al riparo dalla luce ad una temperatura compresa tra 10 e 15 °C. A queste temperature non si hanno fenomeni di solidificazione (presenti invece a basse T) e fenomeni di ossidazione (possibile ad alte T).

2.2 Analisi NMR:

Per l'analisi $^1\text{H-NMR}$ vengono prelevati 20 μl del campione di olio di oliva disciolti in 700 μl di cloroformio deuterato (CDCl_3) e 20 μl di dimetilsolfossido deuterato ($d_6\text{-DMSO}$). Gli spettri devono essere acquisiti immediatamente per evitare fenomeni degradativi. Gli spettri protonici sono stati acquisiti con uno spettrometro Bruker AVANCE AQS600 operante alla frequenza protonica di 600.13 MHz e dotato di un probe da 5 mm. I segnali residui dei solventi (CHCl_3 e DMSO non deuterato) a 7.260 ppm e a 2.526 ppm sono stati utilizzati per verificare la risoluzione dello spettro. I parametri di acquisizione utilizzati sono: time domain (TD)= 64 K; finestra spettrale (SW)= 18.5 ppm; $\text{O}1$ = 4580 Hz; receiver gain (RG)= 16; Impulso a 90 gradi calcolato per ogni spettro; delay (D1)= 0.5 s; acquisition time (AQ)= 2.96 s; numero di scansioni (NS)= 1024; dummy scans (DS)= 4; temperatura= 300 K. Gli spettri sono stati processati usando il

Tabella 1: Dati geografici (valori minimi e massimi di latitudine, longitudine su scala regionale) e meteorologici (valori medi, minimi e massimi di: millimetri di pioggia /anno e temperatura) relativi ai campioni delle prime due annate di raccolta.

Regioni	n°	Altitudine												
		LAT [deg]		LONG [deg]		[m slm]	T [°C]			mm PIOGGIA / anno				
		MIN	MAX	MEDIA	MAX	MEDIA	MEDIA	DS	MIN	MAX	MEDIA	DS	MIN	MAX
2009														
LOMBARDIA	2	45.6	45.6	10.1	10.6	310	9.9	0.3	9.5	10.1	1126.6	208.3	970.9	1394.3
TOSCANA	10	42.7	42.9	10.5	11.4	150	15.7	0.5	15.6	17.1	817.2	45.0	697.2	832.2
LAZIO	33	41.3	42.3	12.1	13.7	376	14.7	0.5	13.4	14.9	930.8	58.6	883.3	1095.0
MOLISE	18	41.6	41.9	14.7	15.0	310	16.1	0.5	14.9	17.0	784.0	62.0	755.6	930.8
PUGLIA	32	40.4	41.9	15.4	17.6	130	16.7	0.7	15.0	17.0	736.8	65.5	693.5	887.0
CALABRIA	25	38.3	41.7	12.7	16.6	272	16.4	1.0	14.2	17.8	787.1	112.9	631.5	1043.9
SICILIA	24	37.1	37.7	13.1	13.9	214	17.1	0.3	16.5	17.3	636.0	8.7	624.2	646.1
SARDEGNA	7	40.5	40.7	8.3	8.7	250	16.8	0.2	16.2	16.9	544.4	11.1	507.4	547.5
2010														
LOMBARDIA	6	45.5	46.1	9.3	10.7	225	8.8	0.2	8.6	9.1	1328.6	184.0	1200.9	1565.9
LIGURIA	10	43.7	44.3	7.9	10.4	189	13.1	1.5	10.0	15.1	1143.5	177.8	865.1	1430.8
TOSCANA	9	42.6	42.9	10.8	11.5	100	15.1	0.5	14.9	16.4	960.4	53.5	817.6	978.2
LAZIO	10	41.7	42.5	12.1	13.7	395	14.3	0.5	13.0	14.4	1064.7	24.5	1054.9	1131.5
MOLISE	10	39.3	41.9	14.7	15.5	397	15.7	0.5	14.4	16.8	707.7	124.2	649.7	985.5
PUGLIA	27*	40.4	42.0	15.0	17.6	160	16.3	0.7	14.7	16.7	668.5	62.3	598.6	784.8
CALABRIA	25	38.3	41.7	12.7	16.6	281	16.2	1.1	13.8	17.6	877.6	132.9	649.7	1054.9
SICILIA	8	37.3	37.6	13.1	14.1	224	17.5	0.7	16.5	18.4	596.8	15.5	580.4	624.2
SARDEGNA	13	39.4	40.7	8.5	9.2	198	15.9	0.2	15.7	16.5	699.7	32.2	613.2	715.4

* Non sono stati considerati i campioni della provincia di Lecce presenti solo nella seconda stagione per uniformare il database alla prima stagione.

programma TOPSPIN (vers. 1.3). I parametri utilizzati sono i seguenti: LB= 0.3 Hz (funzione esponenziale); SI= 64 K (zero filling); correzione manuale della fase; normalizzazione dello spettro sul segnale dovuto ai protoni metilenici in posizione 2 rispetto al carbonile (2.251 ppm) il quale viene posto ad un'intensità pari a 1000; correzione semimanuale della linea di base (Cubic Spline Baseline Correction); lettura automatica delle intensità.

In figura 1 è riportato lo spettro ¹H-NMR di un olio extra vergine di oliva. In tabella 2 sono ri-

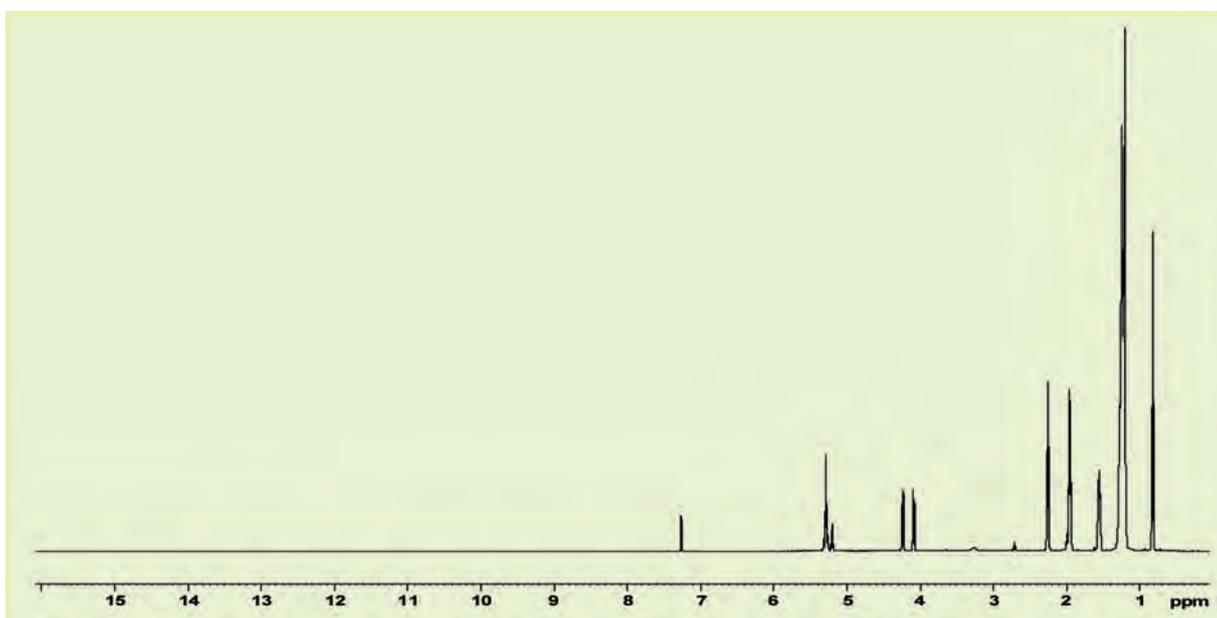


Figura 1: Spettro ¹H NMR di un olio di oliva



portati i chemical shift dei segnali che vengono utilizzati per l'analisi statistica e la loro assegnazione. Le risonanze scelte per la statistica hanno le seguenti caratteristiche:

- a) si trovano in un range spettrale accessibile
- b) sono relativi a composti che non vengono coinvolti in processi ossidativi o di decomposizione
- c) mostrano un intervallo di variazione nei diversi campioni
- d) sono indipendenti l'uno dagli altri.

Tabella 2: Segnali dello spettro 1H NMR le cui intensità vengono quantificate e utilizzate ai fini dell'analisi statistica.

Assegnazione del segnale NMR	Posizione nello spettro
	[ppm]
Esanale	9.704
<i>Trans</i> 2 esanale	9.454
Terpene 4	4.885
Terpene 3	4.661
Terpene 2	4.609
Terpene 1	4.541
Protoni metilenici in α degli <i>sn</i> 1,2 digliceridi	3.988
Protoni metilenici in α degli <i>sn</i> 1,3 digliceridi	3.636
Protoni diallilici dell'acido linolenico	2.746
Protoni diallilici dell'acido linoleico	2.710
Squalene	1.620
Protoni metilenici di tutte le catene insature	1.244
Protoni metilenici degli acidi palmitico e stearico (catene sature)	1.197
Cere	0.978
Metile dell'acido linolenico	0.910
Metile dell'acido linoleico	0.843
Metile in posizione 18 del β -sitosterolo	0.623

2.3 Analisi Isotopica

Le analisi isotopiche sono state effettuate tramite spettrometro di massa, (ISOPRIME, Elementar, UK). I campioni sono stati processati a seconda dell'isotopo da analizzare, mediante analizzatore elementare (Carlo Erba NA1500, Milano, Italy), o pirolizzatore (Europyro 3100, Eurovector, Italy) seguendo il protocollo tecnico per le analisi di spettrometria di massa degli isotopi stabili di Carbonio e Ossigeno, come riportato in precedenti lavori [11].

La composizione isotopica di un campione è espressa in δ per mille a partire dai rapporti isotopici dei campioni che vengono normalizzati rispetto a quelli degli standard internazionali. La formula applicata è:

$$\delta\text{‰} = (R_c / R_{st} - 1) \times 1000,$$

dove R_c e R_{st} sono i rapporti tra l'isotopo più pesante e quello più leggero rispettivamente del campione e dello standard.

Nel calcolo della composizione isotopica i rapporti isotopici dei campioni sono riferiti a quelli degli standard internazionali V-PDB per il carbonio e V-SMOW per l'ossigeno (IAEA, International Atomic Energy Agency). La deviazione standard di ripetibilità è di $\pm 0,1\text{‰}$ per le misure del $\delta^{13}\text{C}$ e di $\pm 0,2\text{‰}$ per quelle del $\delta^{18}\text{O}$.

2.4 Analisi Statistiche

2.4.1 Dati NMR

Le informazioni tecniche dei campioni, desunte dalle schede allegate ai campioni, sono state organizzate in fogli di calcolo e di catalogazione in maniera da rendere più efficiente la successiva interpretazione dei risultati. Le intensità dei segnali NMR normalizzate sono valori adi-

mensionati proporzionali alla concentrazione assoluta delle specie e vengono utilizzate sia a scopo investigativo che per l'analisi multivariata. Le analisi statistiche che sono state utilizzate sono l'Analisi delle Componenti Principali (PCA) e l'Analisi Discriminante Lineare (LDA). La PCA si propone di identificare, a partire dai dati a disposizione, delle "direzioni" privilegiate lungo le quali si concentra la massima informazione presente. In tal modo si ottengono nuove variabili astratte, dette appunto componenti principali (PC). Il numero di PC da utilizzare per descrivere i dati sarà significativamente minore del numero di determinazioni iniziali, riducendo perciò lo spazio dalle 17 dimensioni (il numero dei segnali NMR letti) a 2 o 3 dimensioni (usando le prime due o tre PC). Ogni componente principale infatti è una combinazione lineare delle 17 variabili sperimentali. Nello spazio individuato dalle componenti principali i campioni assumono coordinate dette scores, mentre le variabili assumono coordinate dette loadings. L'analisi dei loadings permette di interpretare i dati analitici e, in particolare, le relazioni tra le variabili valutandone l'influenza sulle componenti principali. La PCA punta a massimizzare la separazione tra gli oggetti, cioè tra i campioni, e non fra i gruppi, inoltre non si fa a priori nessuna assunzione sull'esistenza di gruppi. La LDA è un metodo di classificazione. I metodi di classificazione hanno l'obiettivo di costruire un modello in grado di individuare la classe di appartenenza di ciascun campione sulla base di un certo numero di variabili indipendenti. A differenza della PCA, i metodi di classificazione richiedono che le classi siano note a priori. La LDA è uno dei metodi di classificazione più semplici e più utilizzati. Essa fa uso di combinazioni lineari delle variabili originarie.

2.4.2 Dati Isotopici

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata usando il programma Statistica v 7. Per entrambi gli isotopi sono stati calcolati i seguenti parametri: media, deviazione standard, intervallo di confidenza al 95%, errore standard, massimo e minimo. Per valutare la possibilità di distinguere campioni di olio provenienti da regioni diverse nella stessa annata è stata eseguita l'ANOVA (one-way analysis of variance). Per valutare la possibilità di distinguere campioni di

Tabella 3: Media, errore standard (SE), minimo, massimo e intervallo di confidenza al 95% (CI) dei valori di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$ ottenuti per ogni regione.

Regione	N	year	$\delta^{13}\text{C}$					$\delta^{18}\text{O}$				
			mean	SE	min	max	CI	mean	SE	min	max	CI
Lombardia	2	2009	-30,08	0,28	-30,37	-29,81	-	21,45	1,35	20,09	22,80	-
Toscana	10	2009	-29,22	0,15	-30,02	-28,39	0,34	22,41	0,20	22,96	25,02	0,46
Lazio	31	2009	-29,83	0,10	-31,02	-28,51	0,21	22,90	0,10	23,31	25,82	0,21
Molise	18	2009	-29,90	0,22	-31,14	-27,99	0,47	22,24	0,13	22,61	24,47	0,27
Puglia	13	2009	-30,30	0,18	-31,30	-29,02	0,39	21,89	0,23	22,27	25,46	0,49
Calabria	24	2009	-29,96	0,16	-31,34	-28,86	0,32	23,29	0,19	22,52	26,54	0,39
Sardegna	6	2009	-29,12	0,22	-29,91	-28,36	0,57	24,12	0,15	25,05	26,07	0,39
Sicilia	23	2009	-29,30	0,10	-30,17	-28,49	0,21	24,52	0,24	22,74	27,92	0,50
Lombardia	6	2010	-31,63	0,13	-32,19	-31,34	0,32	19,06	0,13	20,28	21,09	0,33
Liguria	10	2010	-31,25	0,13	-31,62	-30,23	0,30	20,89	0,14	21,86	23,04	0,31
Toscana	9	2010	-29,86	0,20	-30,87	-29,13	0,46	22,30	0,12	23,32	24,39	0,27
Lazio	10	2010	-29,78	0,26	-31,35	-28,33	0,58	22,16	0,25	22,05	24,82	0,56
Molise	10	2010	-30,39	0,18	-30,88	-28,96	0,41	21,64	0,28	22,54	25,38	0,63
Puglia	30	2010	-29,92	0,11	-31,06	-28,78	0,23	21,96	0,10	22,40	24,80	0,21
Calabria	25	2010	-30,15	0,12	-31,22	-28,85	0,25	22,87	0,18	22,54	27,12	0,38
Sardegna	13	2010	-29,24	0,11	-29,93	-28,29	0,24	23,51	0,11	24,34	25,76	0,25
Sicilia	8	2010	-29,24	0,14	-30,00	-28,78	0,33	23,87	0,26	24,48	26,50	0,62
Toscana	15	2011	-28,47	0,13	-29,41	-27,72	0,28	23,61	0,11	22,91	24,68	0,24
Puglia	13	2011	-28,99	0,23	-30,45	-27,77	0,50	23,27	0,20	21,73	24,50	0,44



olio provenienti da stesse regioni, ma raccolti nelle diverse annate è stata eseguita la two-way ANOVA (two-way analysis of variance). La successiva valutazione dei risultati è stata eseguita effettuando il Post Hoc Fisher test. La probabilità $p < 0,05$ è stata considerata come significativa. Per valutare l'esistenza di una correlazione tra le composizioni isotopiche e i parametri climatici e geografici è stato calcolato il coefficiente di Pearson (r). I valori calcolati di questo parametro sono stati confrontati con un valore critico per un livello di confidenza pari al 95%, ossia la probabilità $p < 0,05$ è stata considerata come significativa.

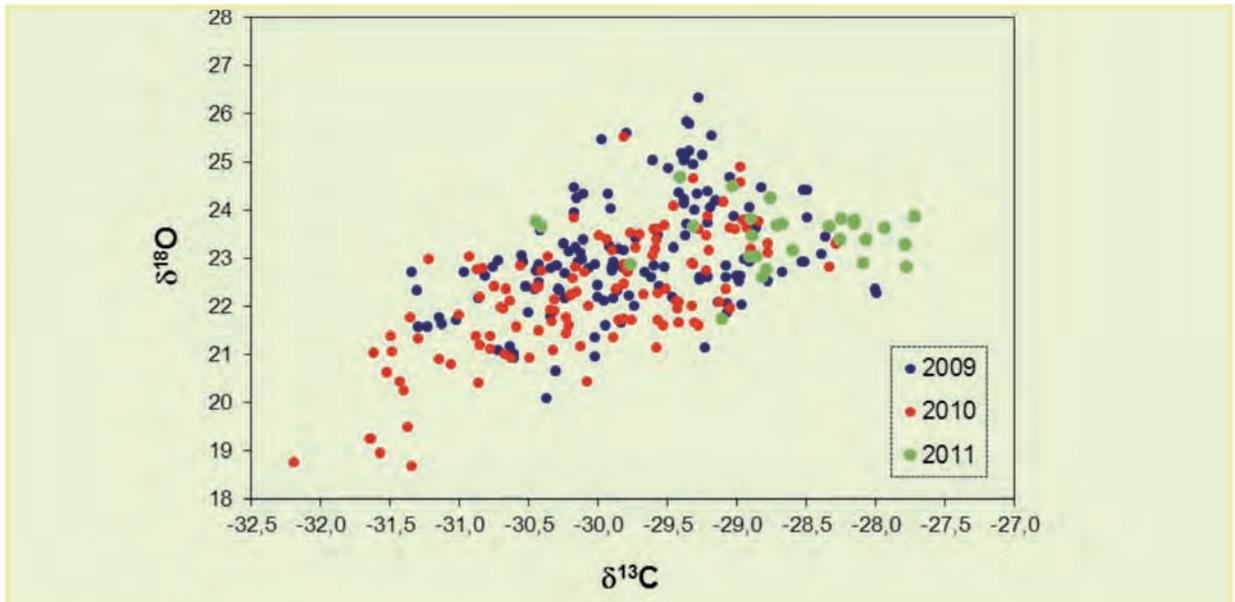


Figura 2: valori di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$ di tutti i campioni di olio extravergine di oliva differenziati per anno di produzione.

3 Risultati

3.1 Risultati IRMS – origine geografia su tutto il database nazionale

In tabella 3 sono mostrati i valori medi del $\delta^{13}\text{C}$ e del $\delta^{18}\text{O}$ di tutti i campioni di olio prodotti nelle diverse regioni di Italia, insieme all'errore standard, minimo, massimo e intervallo di confidenza calcolati per le annate di raccolta 2009, 2010 e, per i campioni della regione Toscana e Puglia, anche del 2011. In figura 2 sono mostrati i valori di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$ di tutti i campioni di olio delle diverse annate di raccolta 2009, 2010 e 2011.

La correlazione tra le due variabili è più alta per i campioni di olio dell'annata 2010 ($r = 0,68$) rispetto a quelli dell'annata 2009 ($r = 0,37$), ma in entrambi i casi risulta significativa. Esiste quindi almeno un parametro geografico che influenza entrambi i valori isotopici. La correlazione tra i dati del 2011 non è stata calcolata, essendo questi ultimi campioni provenienti dalle sole due province di Foggia e Grosseto. Le analisi statistiche relative all'intero database nazionale sono state effettuate quindi solamente per le prime due annate di raccolta. Per vedere se la distribuzione dei due parametri isotopici del 2009 e del 2010 è rappresentativa dell'anno di produzione è stata effettuata l'analisi della varianza a due vie (Two-way analysis of variance). Per questo tipo di analisi sono state prese in considerazione solamente le regioni per le quali sono stati raccolti i campioni in entrambe le annate. I risultati sono mostrati in tabella 4.

Come si osserva dalla tabella 4 per Puglia, Calabria e Sardegna le differenze tra le due variabili isotopiche non risultano significative. Per Lazio, Molise e Sicilia la differenza tra i valori isotopici delle due annate risulta significativa al 95% di confidenza solamente per il $\delta^{18}\text{O}$; per la Toscana le differenze risultano significative per i valori del $\delta^{13}\text{C}$. Le variabili risultano entrambe significativamente differenti solamente per i campioni della Lombardia. Per verificare l'esistenza di una correlazione statistica sia il $\delta^{13}\text{C}$ che del $\delta^{18}\text{O}$ sono stati confrontati coi parametri geografici e climatici relativi alle annate 2009 e 2010. I risultati sono riportati in Tabella 5.

Tabella 4 Risultati della varianza a due vie per il $\delta^{13}\text{C}$ e per il $\delta^{18}\text{O}$ relativi ai campioni delle diverse regioni. In rosso sono marcati i valori significativi di p-level per $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$ (Post Hoc Fisher test).

Regione	N. campioni		$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{18}\text{O}$
	2009	2010	p	p
Lombardia	2	6	0,003	0,000
Toscana	10	10	0,025	0,753
Lazio	33	9	0,808	0,007
Molise	18	10	0,048	0,046
Puglia	32	30	0,201	0,818
Calabria	25	25	0,288	0,055
Sardegna	7	13	0,729	0,093
Sicilia	24	8	0,807	0,023

Tabella 5: correlazione tra i parametri isotopici di carbonio e ossigeno e quelli geografici e climatici. Il valore r mostra la correlazione (coefficiente di Pearson) e p è il livello di significatività. I valori riportati in rosso mostrano l'esistenza di una correlazione significativa.

	$\delta^{13}\text{C}$		$\delta^{18}\text{O}$	
	r	p	r	p
$\delta^{13}\text{C}$	-	-		
$\delta^{18}\text{O}$	0,88	0,000	-	-
Latitudine	-0,64	0,006	-0,84	0,000
Longitudine	0,02	0,950	0,1	0,712
Altitudine	-0,04	0,876	0,00	0,995
t°C	0,68	0,003	0,79	0,000
mm pioggia	-0,74	0,001	-0,79	0,000

Per entrambi gli isotopi le correlazioni coi parametri analizzati sono significative ad eccezione della longitudine e dell'altitudine. In particolare risulta che il $\delta^{18}\text{O}$ è maggiormente correlato con i parametri di latitudine (r negativo), temperatura (r positivo) e pioggia (r negativo) rispetto al $\delta^{13}\text{C}$. In figura 3 vengono riportati i valori di $\delta^{18}\text{O}$ differenziati per regione e anno di produzione.

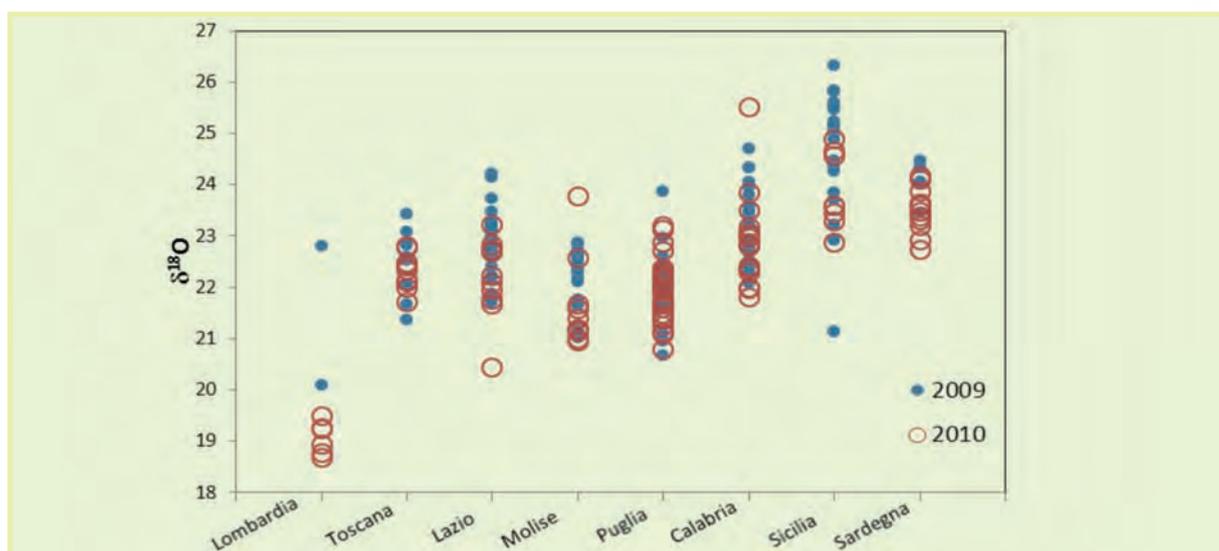


Figura 3: valori di $\delta^{18}\text{O}$ in funzione della regione di produzione, differenziati per anno di produzione.



Si osserva che i valori di $\delta^{18}\text{O}$ relativi ai campioni di olio dell'anno 2009 sono più positivi rispetto a quelli dell'anno 2010 che mediamente è risultato più freddo (vedi tabella 1). Nel grafico della figura 4 sono mostrate le composizioni isotopiche di carbonio e ossigeno di tutti i campioni di olio extravergine di oliva dell'annata 2010 (il campionamento relativo a questa annata è risultato più completo comprendendo anche gli oli delle regioni settentrionali di Lombardia e Liguria) differenziati per regione. Gli indicatori delle diverse regioni sono distinguibili per simbolo e colore.

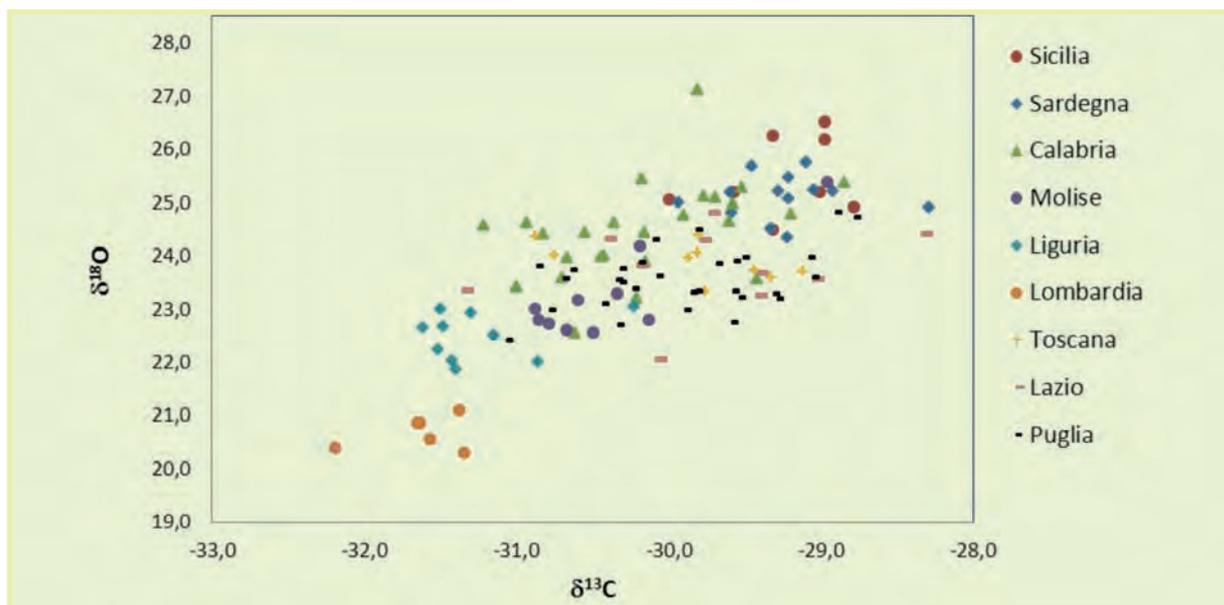


Figura 4: valori di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$ di tutti i campioni di olio extravergine di oliva dell'annata 2010 differenziati per regione.

Per valutare la possibilità di distinguere campioni di olio provenienti da regioni diverse nella stessa annata è stata eseguita l'ANOVA. La successiva valutazione dei risultati è stata eseguita effettuando il Post Hoc Fisher test. La probabilità $p < 0,05$ è stata considerata come significativa. I risultati sono mostrati nella tabella 6 e 7.

Tabella 6. Risultati dell'analisi della varianza per il $\delta^{13}\text{C}$ e per il $\delta^{18}\text{O}$ relativi ai campioni delle diverse regioni di raccolta dell'anno 2009. In rosso sono marcati i confronti significativamente diversi (Post Hoc Fisher test).

2009												
Regione	Toscana		Sardegna		Puglia		Lazio		Calabria		Molise	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{18}\text{O}$										
Toscana												
Sardegna	0,806	0,000										
Puglia	0,000	0,173	0,001	0,000								
Lazio	0,011	0,094	0,013	0,000	0,084	0,000						
Calabria	0,003	0,004	0,004	0,018	0,321	0,000	0,459	0,064				
Molise	0,010	0,581	0,011	0,000	0,225	0,335	0,724	0,005	0,759	0,000		
Sicilia	0,746	0,000	0,571	0,167	0,000	0,000	0,003	0,000	0,001	0,000	0,004	0,000

Tabella 7. Risultati della varianza per il $\delta^{13}\text{C}$ e per il $\delta^{18}\text{O}$ relativi ai campioni delle diverse regioni di raccolta dell'anno 2010. In rosso sono marcati i valori significativamente diversi (Post Hoc Fisher test).

2010																
Regione	Lombardia		Toscana		Sardegna		Lazio		Molise		Puglia		Calabria		Liguria	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{18}\text{O}$														
Lombardia																
Toscana	0,000	0,000														
Sardegna	0,000	0,000	0,013	0,000												
Lazio	0,000	0,000	0,747	0,639	0,027	0,000										
Molise	0,000	0,000	0,046	0,035	0,000	0,000	0,018	0,090								
Puglia	0,000	0,000	0,749	0,151	0,000	0,000	0,460	0,363	0,029	0,236						
Calabria	0,000	0,000	0,192	0,032	0,000	0,007	0,081	0,005	0,270	0,000	0,150	0,000				
Sicilia	0,000	0,000	0,026	0,000	0,990	0,236	0,048	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,000		
Liguria	0,198	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,014	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Come si vede dalla tabella 6 relativa al 2009, i campioni della Sicilia e Sardegna si separano significativamente dagli altri con entrambi gli isotopi, ad eccezione della Toscana che risulta indistinguibile dalle isole per il $\delta^{13}\text{C}$. Questa regione si distingue dalla Calabria con entrambi gli isotopi e da Puglia Lazio e Molise grazie al $\delta^{13}\text{C}$. La Puglia risulta indistinguibile dal Molise e dal Lazio. I risultati della varianza relativi al 2010 mostrano che i campioni della zona geografica settentrionale (Liguria e Lombardia) sono distinguibili da quelli del resto della penisola e, grazie al $\delta^{18}\text{O}$ anche tra di loro. Anche i campioni delle isole risultano significativamente diversi da quelli delle altre regioni, ma indistinguibili tra loro. La Calabria si distingue dal resto delle regioni con il $\delta^{18}\text{O}$ mentre il $\delta^{13}\text{C}$ non permette il suo diversificarsi da Toscana Lazio e Puglia. La Toscana risulta separata dal Molise e indistinguibile da Lazio e Puglia per entrambi gli isotopi. Il Molise si separa da Lazio e Puglia grazie al $\delta^{13}\text{C}$. Per mostrare meglio l'andamento delle composizioni isotopiche distribuito sulle diverse regioni italiane in figura 6 sono mostrate le medie, coi relativi errori standard dei valori del $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$ di ogni regione di campionamento, per l'annata 2010.

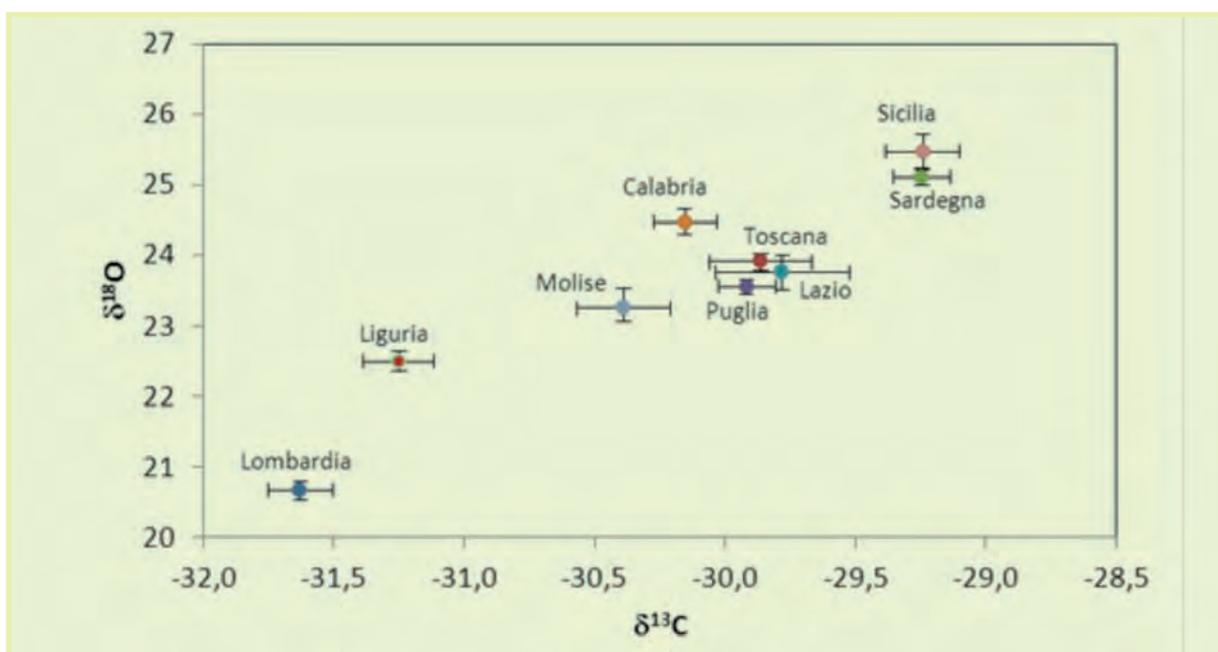


Figura 6: valori medi, coi rispettivi errori standard, di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$ di tutti i campioni di olio di oliva del 2010 differenziati per regione.

Come si vede dal grafico di figura 6, i campioni della zona geografica settentrionale (Liguria e Lombardia) sono caratterizzati da una maggiore concentrazione degli isotopi leggeri di carbonio e ossigeno, mentre quelli delle isole risultano più arricchiti in ^{18}O e ^{13}C rispetto a tutto il resto dei campioni della penisola.



E' stato possibile discriminare, grazie all'isotopo del carbonio, anche tra zone più vicine come le diverse province della regione Laziale; in particolare si riescono a distinguere gli oli di Viterbo, Roma e Rieti. Il risultato è mostrato graficamente in figura 7 dove sono riportati i valori di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$ dei campioni delle tre province. I campioni della provincia di Viterbo risultano più arricchiti in ^{13}C mentre quelli di Rieti sono più impoveriti.

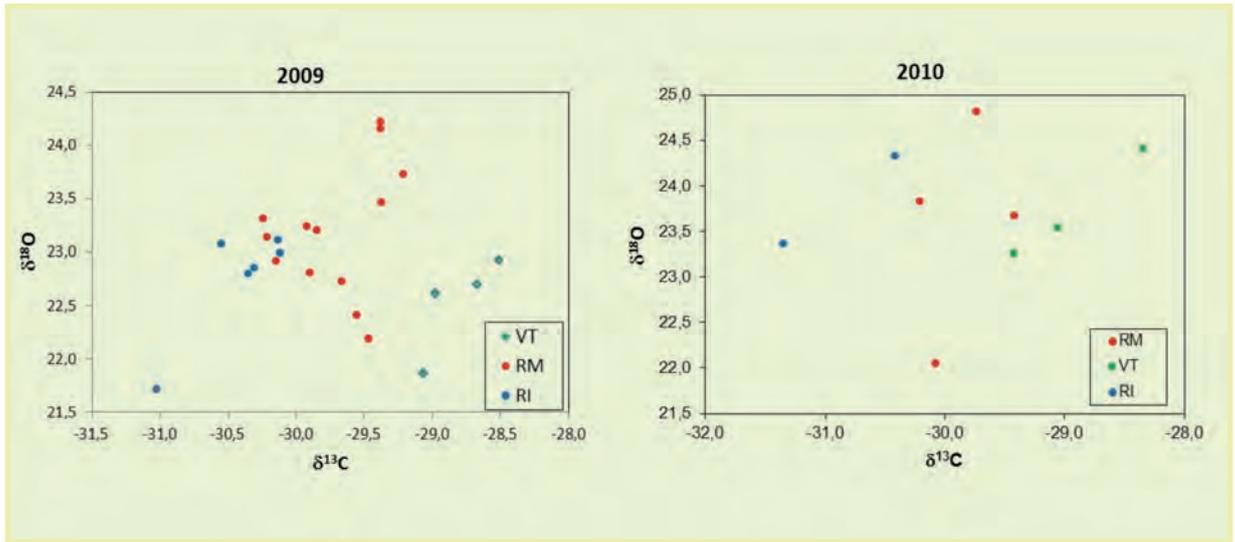


Figura 7: valori di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$ di tutti i campioni di olio extravergine di oliva differenziati per le diverse province laziali e anno di produzione.

3.2 Risultati IRMS – oli monovarietali

Per le regioni Calabria e Sicilia dove è stato campionato un numero di oli monovarietali sufficiente, è stata condotta un'analisi statistica per discriminare cultivar differenti provenienti da una stessa area geografica.

Sono stati analizzati 49 oli monovarietali provenienti dalla Calabria e dalla Sicilia, anche in questo caso è stata considerata separatamente la produzione delle due annate di raccolta confrontando differenti cultivar provenienti dalla stessa area di raccolta. In particolare è stato possibile confrontare per la Calabria 6 cultivar della provincia di Reggio Calabria (Sinopolese, Ottobratica, Carolea, Roggianella, Geracese, Nocellara) e 8 della provincia di Cosenza (Carolea, Roggianella, Frantoio, Leccino, Coratina, Tondina, Grossa di Cassano e Dolce di Rossano). L'analisi della varianza sui campioni calabresi del 2009 ha permesso di identificare due gruppi principali di Cultivar, infatti le varietà Carolea, Frantoio e Leccino si raggruppano tra loro e si distinguono significativamente dalle cultivar Roggianella, Tondina e Dolce di Rossano nella provincia di Cosenza. Invece nella provincia di Reggio Calabria le cultivar Ottobratica e Roggianella si distinguono significativamente dalle cultivar: Nocellara, Carolea e Geracese. Per i campioni monovarietali siciliani del 2009 risultano significativamente differenti le cultivar Biancolilla e Cerasuola. La stessa indagine condotta sui 33 campioni monovarietali del 2010 ha mostrato i seguenti risultati: per la Sicilia i valori isotopici dell'ossigeno della cultivar Cerasuola sono statisticamente differenti da quelli delle altre cultivar siciliane. Per la Calabria è risultato che i valori medi del $\delta^{13}\text{C}$ della cultivar Geracese risultano significativamente diversi da quelli delle cultivar: Rossanese e Tondina. Invece i valori del $\delta^{18}\text{O}$ permettono di discriminare la Geracese anche da Sinopolese e Ottobratica. I valori del $\delta^{18}\text{O}$ dalla cultivar Sinopolese risultano statisticamente diversi da quelli di tutte le altre cultivar ad eccezione dell'Ottobratica.

I risultati della spettrometria di massa isotopica hanno permesso di caratterizzare tutti gli oli delle prime due stagioni di campionamento. Il campionamento della raccolta del 2011/12 ha permesso di caratterizzare solo gli oli della provincia di Foggia e Grosseto. E' stata individuata una correlazione tra il $\delta^{13}\text{C}$ e il $\delta^{18}\text{O}$ e i parametri di latitudine, temperatura e pioggia. In particolare i campioni della zona geografica settentrionale (Liguria e Lombardia) risultano avere una composizione isotopica più leggera sia del carbonio che dell'ossigeno mentre i campioni

delle isole risultano arricchiti degli isotopi più pesanti per entrambe le variabili in entrambe le annate. Dall'analisi della varianza è risultato che, combinando le due composizioni isotopiche di carbonio ed ossigeno, si possono distinguere le diverse regioni di provenienza degli oli italiani. In particolare, con le analisi di spettrometria di massa isotopica, si possono ben distinguere quattro aree geografiche: il nord, le isole, il sud-Tirreno (Calabria) e il centro-sud Adriatico. I campioni di olio monovarietali provenienti dalla Sicilia e dalla Calabria sono stati caratterizzati isotopicamente anche per distinguere le differenti cultivar.

3.3 Risultati NMR database generale

L'analisi statistica applicata ai dati NMR consente una buona caratterizzazione chimica dei campioni che possono essere raggruppati per criteri di provenienza geografica, fattore genetico (cultivar) o caratteristiche agronomiche. Le stesse analisi permettono di individuare anche quali variabili, ovvero quali segnali NMR, sono maggiormente discriminanti andando di fatto a caratterizzare gli oli. Il presente lavoro ha riguardato un'analisi statistica riguardante inizialmente l'intero database dei primi due anni di campionamento al fine di evidenziare eventuali raggruppamenti di oli aventi simile composizione chimica su scala nazionale. Quindi le analisi statistiche sono state ripetute sui campioni delle singole regioni per la caratterizzazione geografica e di tutti gli altri parametri che è stato possibile desumere dalle schede tecniche allegiate agli oli. È stato anche effettuato un'analisi dell'effetto stagionale tra i campioni del primo e del secondo anno regione per regione. Le intensità dei segnali NMR sono state anche utilizzate come stima dell'andamento della concentrazione dei vari metaboliti presenti nei diversi campioni.

A livello nazionale, le analisi discriminanti lineari sia della prima che della seconda stagione di raccolta hanno permesso di valutare la possibilità di creare modelli per la tracciabilità dei campioni. La caratterizzazione geografica dovuta ai dati NMR è stata analizzata a vari livelli, definendo come classi di appartenenza dei campioni sia le singole regioni, sia aree geografiche più vaste. Quando vengono definite come classi di appartenenza degli oli le regioni si ottiene il risultato mostrato nella seguente figura 8.

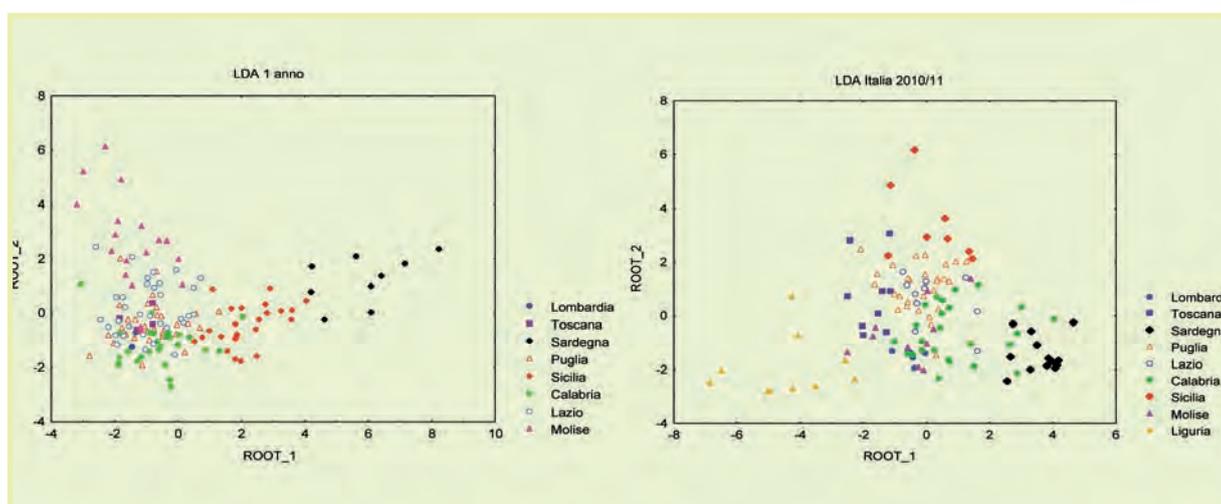


Figura 8: Analisi Discriminante Lineare sui campioni del primo anno (a sinistra) e del secondo anno (a destra), definendo come classi di appartenenza le regioni.

L'effetto più evidente è che i campioni delle due isole si separano dal resto della popolazione in entrambe le stagioni, nel primo anno anche i campioni molisani sono separati dagli altri. Nella seconda stagione i campioni liguri, non raccolti il primo anno, risultano i più separati. Questi risultati hanno suggerito di definire classi di appartenenza su scala geografica più vasta. Sono state quindi definite come classi di appartenenza le seguenti macroregioni: **NORD**: (Liguria) e Lombardia; **CENTRO**: Toscana, Lazio e Molise; **SUD**: Puglia e Calabria; **ISOLE**: Sardegna e Sicilia. I risultati grafici delle LDA sono mostrati nella seguente figura 9.



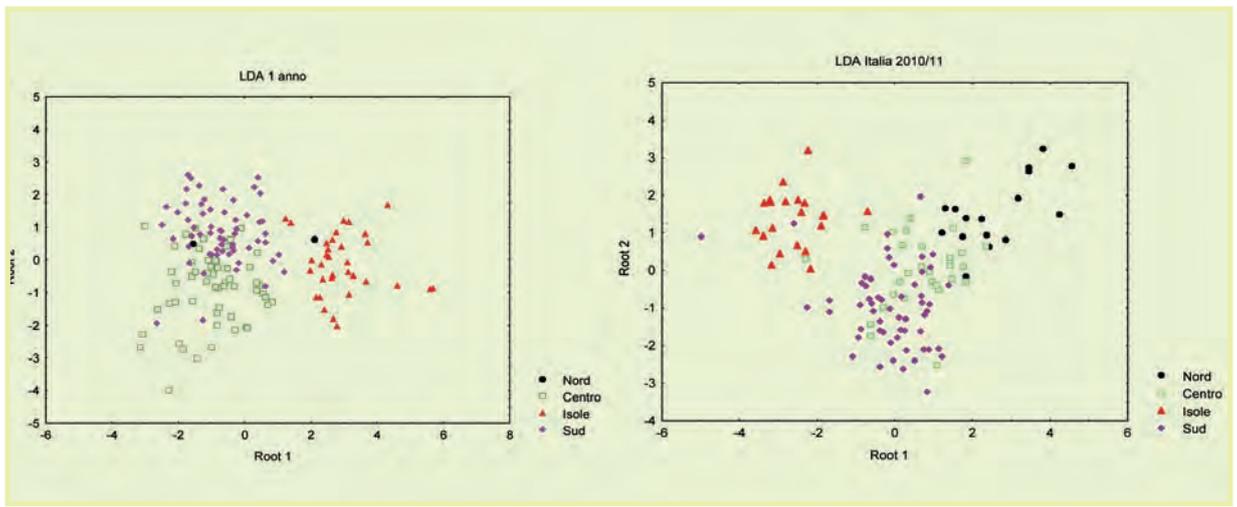


Figura 9: Analisi Discriminante Lineare sui campioni del primo anno (a sinistra) e del secondo anno (a destra), definendo come classi di appartenenza le macroregioni Nord, Centro, Sud e Isole.

L'esiguo numero di campioni del nord (2) del primo anno rende limitata l'analisi di questa zona nella prima stagione di raccolta che invece nella seconda è stata integrata con i campioni liguri e in questo caso si separano piuttosto nettamente dagli altri. Ancora una volta i campioni delle due isole risultano i più distinguibili andandosi a raggruppare tra loro e a separarsi dal resto degli oli. Gli oli del centro e del sud sono risultati separati nel primo anno di raccolta, mentre nella seconda stagione si nota una maggiore sovrapposizione. E' stato possibile quindi valutare quali variabili NMR caratterizzano gli oli in base a questa differenziazione per macroaree geografiche.

E' stato osservato in particolare che in entrambi gli anni i campioni del sud sono caratterizzati da un valore medio di cere (vedi figura 10) che è risultato il più basso rispetto a quello delle altre classi. I campioni delle isole presentano invece la massima concentrazione media di acido linoleico e squalene mentre sono caratterizzati dai minimi valori di terpene 1, vedi figura 11.

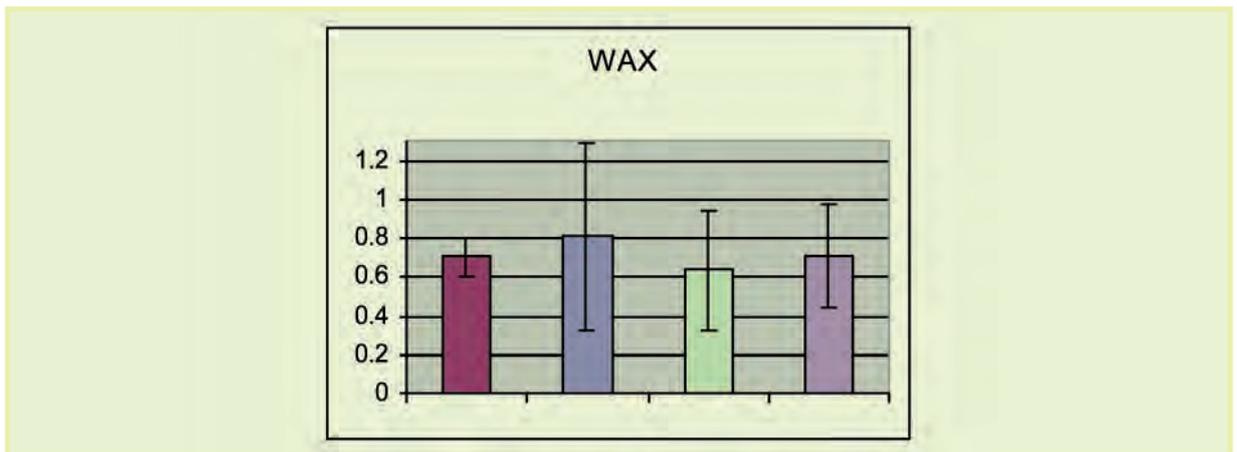


Figura 10: Valori medi intensità NMR delle cere 1 anno, rosso: nord, blu: centro, verde: sud, viola: isole.

L'andamento delle concentrazioni medie dei valori di acido linoleico risulta interessante in quanto questo parametro risulta più basso nei campioni del nord, per crescere in quelli del centro e ancor più in quelli del sud, fino ad assumere un valore massimo nei campioni delle isole. Questo accade in entrambe le annate di raccolta.

Un ulteriore lavoro ha riguardato la definizione di soli 3 classi di appartenenza geografica: Italia peninsulare, Sardegna e Sicilia, i risultati delle LDA sui due anni sono mostrati in figura 12. La separazione tra i tre gruppi è netta in entrambi gli anni. Le variabili che caratterizzano le tre classi in entrambe le campagne di raccolta sono: i terpeni 3 e 2 che risultano massimi

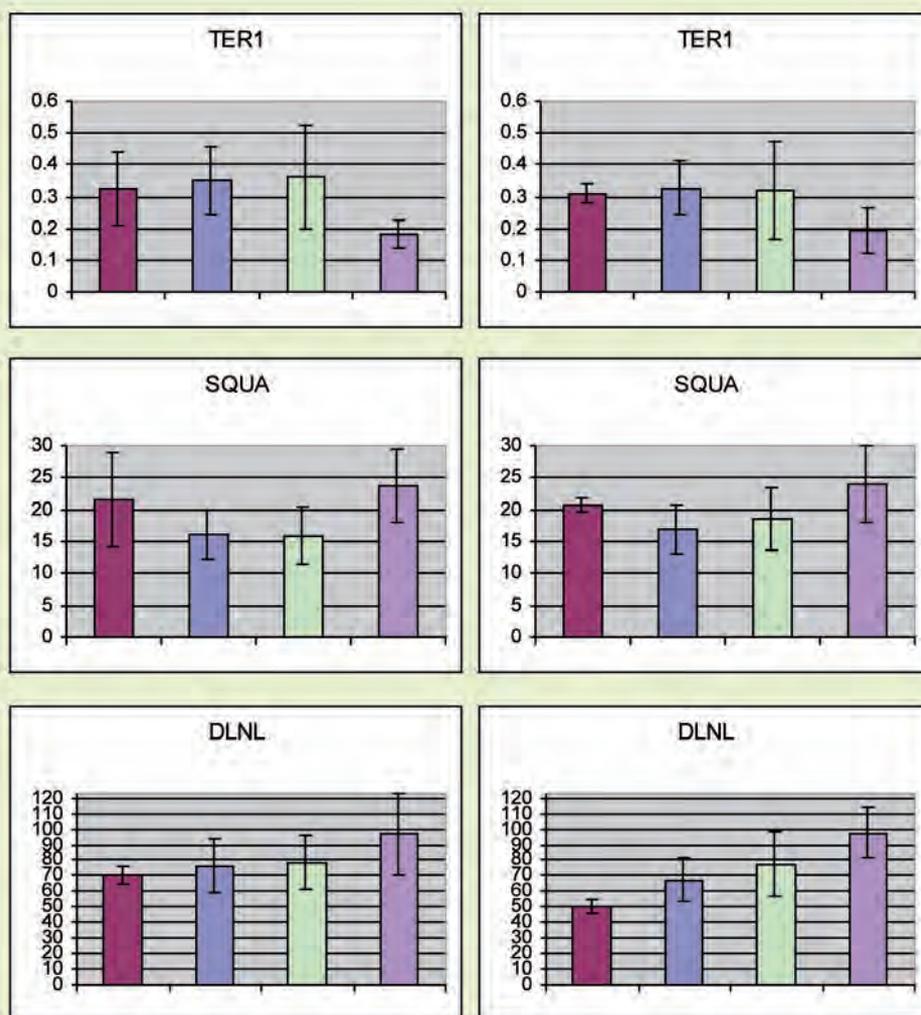


Figura 11: Valori medi delle intensità NMR di terpene1, squalene e protoni diallici dell'acido linoleico del 1 anno (a sinistra) e del secondo anno (a destra), rosso: nord, blu: centro, verde: sud, viola: isole.

in Sardegna e minimi in Sicilia, il terpene 1 che è minimo in Sicilia e massimo nei campioni dell'Italia peninsulare, ed infine l'acido linoleico e lo squalene che sono minimi in penisola e massimi in Sardegna, vedi istogrammi di figura 13. L'analisi su scala nazionale ha quindi permesso di definire classi di appartenenza geografica e di evidenziare caratteristiche nella composizione chimica degli oli analizzati relative alle prime due annate di campionamento.

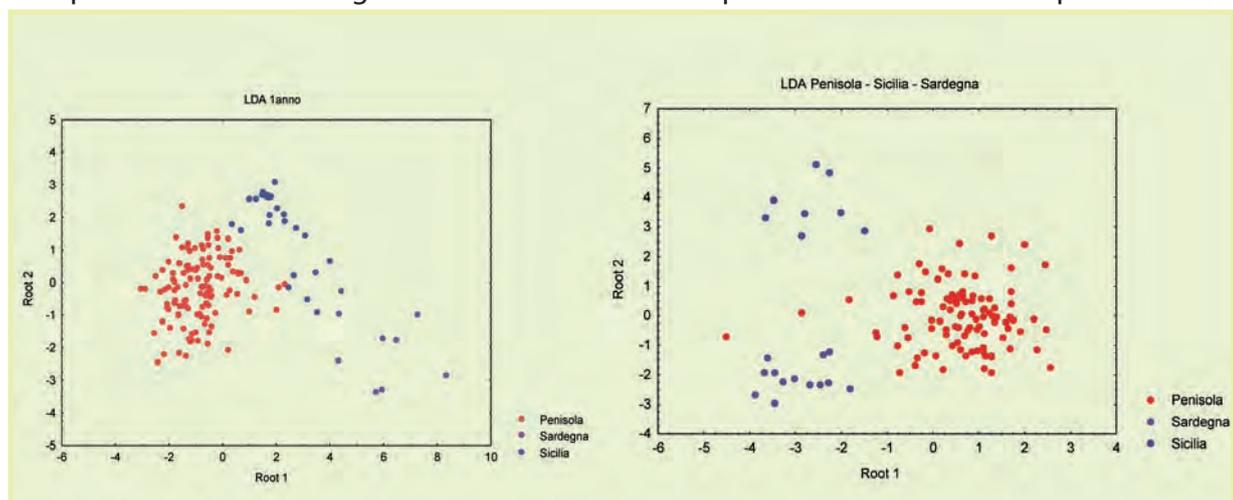


Figura 12: Analisi discriminante Lineare sui campioni del primo anno (a sinistra) e del secondo anno (a destra), definendo come classi di appartenenza: Italia peninsulare, Sicilia e Sardegna.



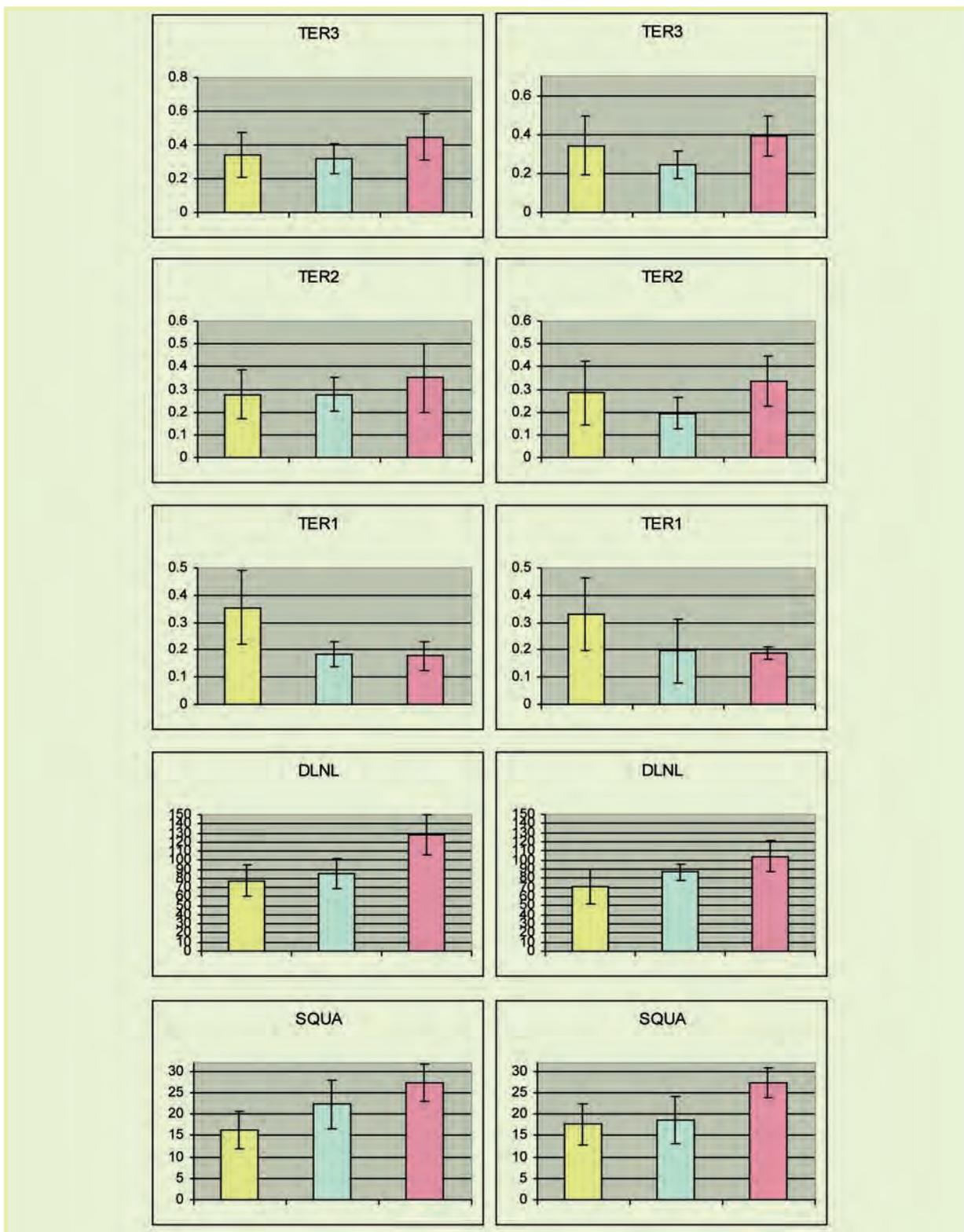


Figura 13: Valori medi delle intensità NMR di terpene 3, terpene 2, terpene 1, protoni diallici del linoleico e squalene del 1 anno (a sinistra) e del secondo anno (a destra), giallo: Italia peninsulare, celeste: Sicilia, rosa: Sardegna.

I parametri sopra discussi si sono infatti rivelati come elementi distintivi delle classi definite indipendentemente dall'eventuale effetto stagionale. Il monitoraggio della terza stagione di campionamento e l'ampliamento del database servirà a rafforzare e a definire meglio questi aspetti.

3.4 Caratterizzazione NMR oli delle singole regioni

Per ogni regione si sono prima caratterizzati i campioni di ogni singola annata di produzione e successivamente si è studiato l'effetto stagionale andando a valutarne la presenza o meno e le variabili NMR che hanno eventualmente risentito dei cambiamenti climatici.

3.4.1 SICILIA

I campioni analizzati nella prima annata sono 24, dei quali 22 provengono dalla provincia di Agrigento e 2 dalla provincia di Palermo. L'analisi NMR ha riguardato inizialmente una PCA (vedi figura 14) sulle cultivar.

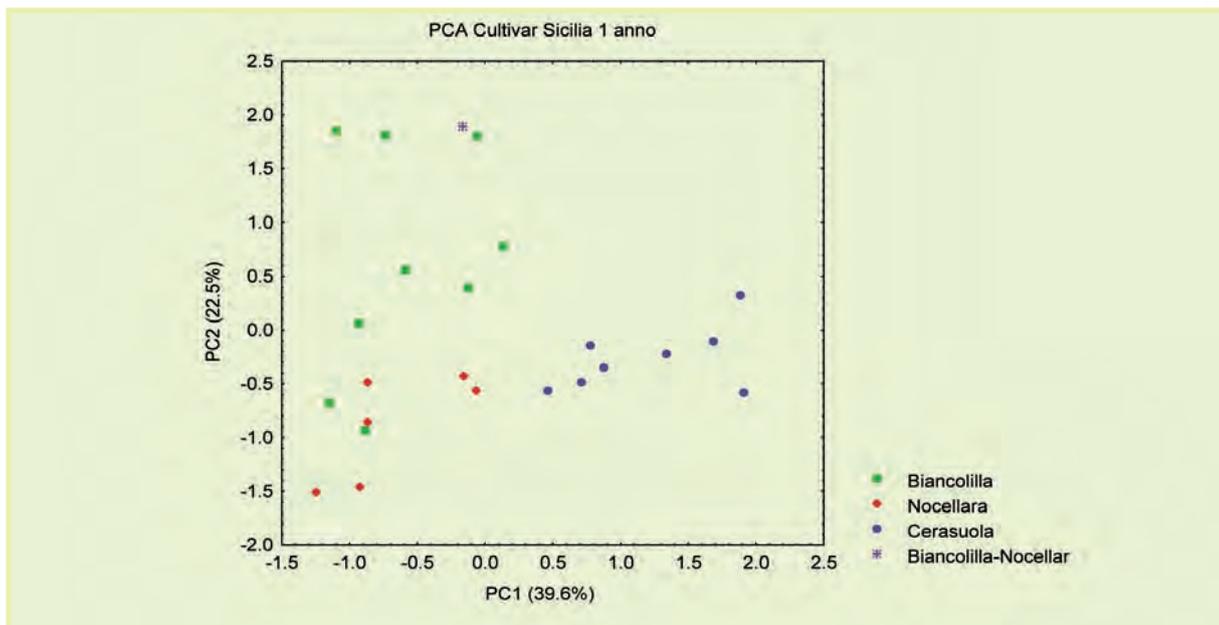


Figura 14: PCA dei campioni siciliani della prima annata etichettati per cultivar.

Gli oli caratterizzati dalla cultivar Cerasuola, ben distinti nella parte destra del grafico lungo la prima componente principale, presentano un contenuto particolarmente basso di squalene, di catene grasse sature e di terpeni 1 e 4, mentre è più alto il contenuto di catene grasse insature, terpeni 2 e 3, cere e β sitosterolo. Gli oli delle restanti due cultivar sono posizionati invece nella parte sinistra del grafico separati fra loro lungo la componente PC2. Dalle cultivar Biancolilla e Nocellara risultano infatti oli a più elevato contenuto di squalene e catene grasse sature. Gli oli della cultivar Biancolilla sono però caratterizzati anche da più alti livelli di terpene 1 e 4 e da quantità inferiori di catene grasse insature. Mentre gli oli di Nocellara presentano quantità più modeste di β sitosterolo, cere, terpeni 2 e 3 e acido linoleico.

Nella seconda stagione sono stati raccolti solamente 8 campioni, tutti della provincia di Agrigento. La PCA di figura 15 mostra come sia sempre il fattore genetico a caratterizzare questi oli.

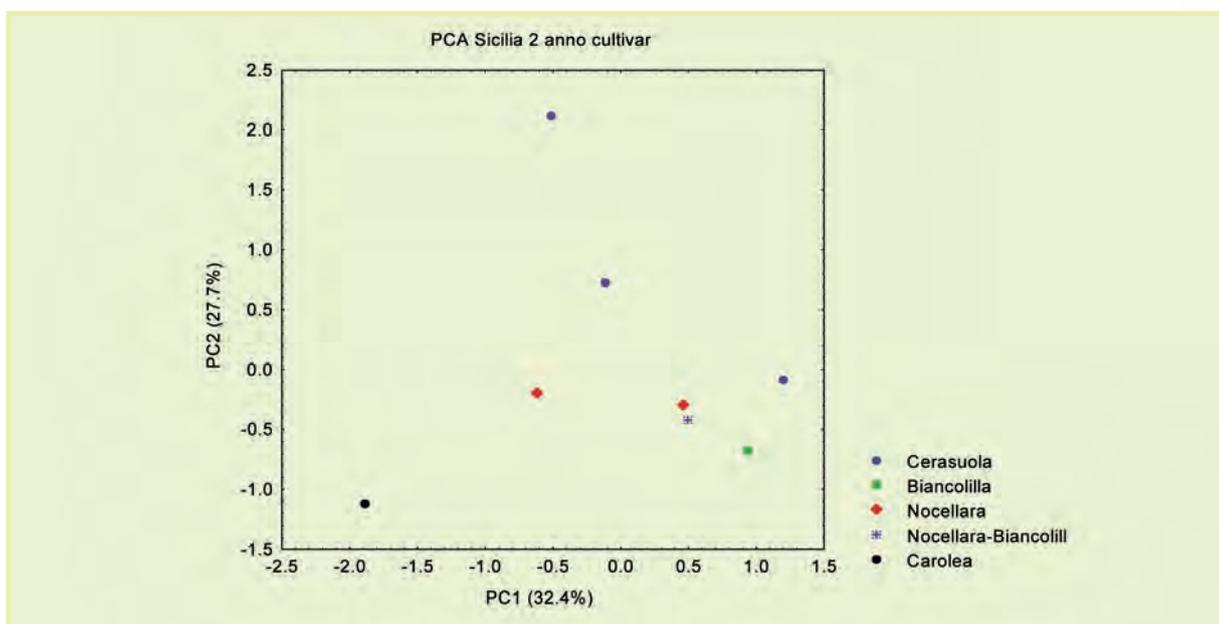


Figura 15: PCA dei campioni siciliani della seconda annata etichettati per cultivar.



Degli otto campioni analizzati solamente uno è stato ottenuto dalla miscela di due cultivar, mentre gli altri sono tutti monovarietali. I tre campioni di Sciacca sono oli monovarietali della cultivar Cerasuola e si caratterizzano per una più alta concentrazione terpene 3 mentre hanno una concentrazione minore, rispetto agli altri campioni siciliani, di squalene e acidi grassi saturi, confermando i dati del primo anno.

Dai dati meteo (vedi tabella 1) si può osservare che la seconda annata di campionamento è stata caratterizzata da una minore piovosità tanto che il valore massimo di mm pioggia annui registrato nella seconda annata risulta uguale al valore minimo registrato nella stagione precedente, per un totale medio di circa 40 mm di pioggia in meno. La temperatura ha subito invece una minore variazione, anche se l'anno 2010 è stato moderatamente più caldo. La PCA effettuata sui campioni di entrambe le annate mostra una separazione netta tra i due gruppi, vedi figura 16, a conferma che l'effetto stagionale ha influenzato le variabili NMR.

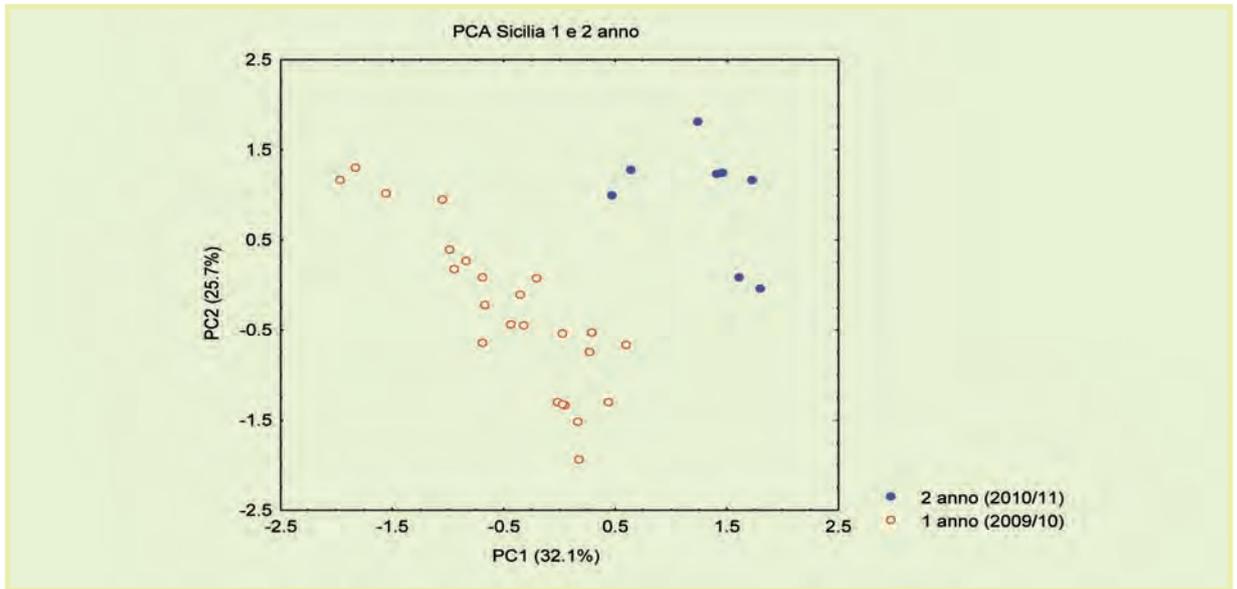


Figura 16: PCA dei campioni siciliani delle due annate.

Ma una più approfondita analisi dei dati consente di verificare quali parametri si sono rivelati sensibili ai cambiamenti climatici e quali invece non sono variati. Infatti si può osservare come i campioni di questa regione si caratterizzano sempre per bassi valori, rispetto alla media nazionale, di terpene 3 e per alti valori, rispetto alle altre regioni, di acido linoleico. Questi parametri quindi non risentono delle differenze climatiche registrate tra i due anni. I composti aldeidi invece non possono essere considerati variabili caratterizzanti per gli oli di questa regione avendo negli anni comportamenti sensibili all'effetto stagionale: nelle prime due annate di campionamento infatti questi composti aumentano dal primo al secondo anno, contrariamente a quanto accade nel resto d'Italia.

3.4.2 SARDEGNA

I campioni analizzati il primo anno sono 7, 5 provengono dalla provincia di Sassari e 2 dalla provincia di Cagliari. Quattro dei cinque oli della provincia di Sassari appartengono alla cultivar Bosana, il quinto è misto Bosana - Semidana; gli oli della provincia di Cagliari sono caratterizzati in un caso dalla cultivar Tonda di Cagliari, mentre nell'altro la cultivar è la Oliva da Olio. Le differenze riscontrate tra i due gruppi di oli sono dovute quindi sia al contributo della diversa origine geografica, sia a quello della diversa origine genetica, che è strettamente correlata al territorio. Nella PCA di figura 17 si osserva una netta separazione dei campioni lungo la PC1.

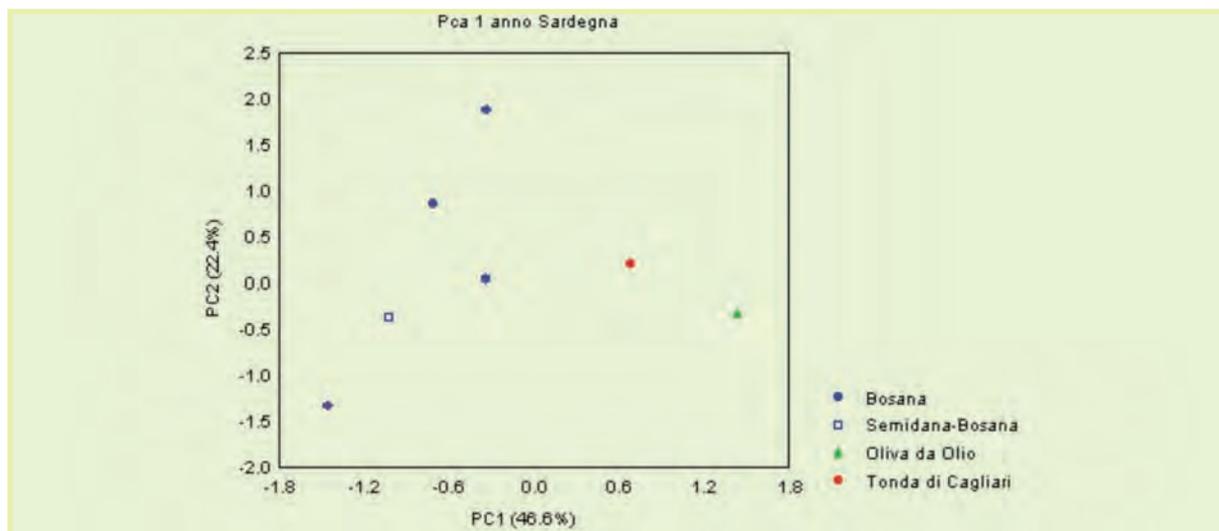


Figura 17: PCA dei campioni sardi della prima annata etichettati per province e per cultivar

variabili relative a squalene, acido linoleico, β sitosterolo, terpene 2 e 3 e acidi grassi saturi, sono localizzati i campioni della provincia di Cagliari. I campioni della provincia di Sassari e appartenenti alla cultivar Bosana si posizionano invece nella zona opposta del grafico risultando nettamente separati dagli oli di Cagliari.

Nella seconda stagione sono stati analizzati 13 campioni, 10 provenienti dalla provincia di Sassari e 3 dalla provincia di Cagliari. L'analisi delle componenti principali di figura 18, mostra una netta separazione tra i campioni delle due province lungo la PC1.

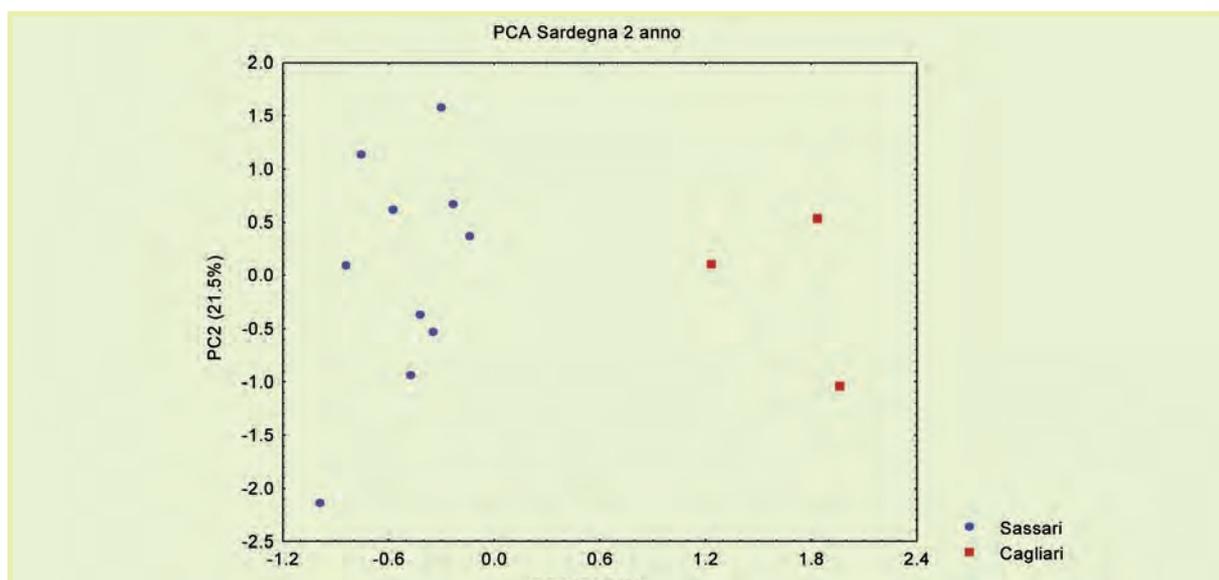


Figura 18: PCA dei campioni sardi della seconda annata etichettati per province.

Anche in questo caso la composizione in cultivar ricalca la provenienza geografica: tutti i campioni della provincia di Sassari contengono la cultivar Bosana, che invece non è mai presente negli oli dell'altra provincia. Gli oli contenenti monovarietali Bosana si separano nettamente dagli oli monovarietali Tonda che presentano una maggiore concentrazione di squalene, β sitosterolo, acidi grassi saturi e acido linoleico, mentre i campioni della provincia di Sassari, e quindi contenenti principalmente la cultivar Bosana, si caratterizzano per un contenuto leggermente più alto di terpene 4.

Dai dati meteo (vedi tabella 1) si può osservare che la seconda annata di campionamento è stata caratterizzata da una maggiore piovosità, per un totale medio di circa 150 mm di pioggia in più. La temperatura ha subito una diminuzione media pari ad 1°C. La PCA mostrata in figura 19 evidenzia un effetto stagionale per i campioni di entrambe le province sarde.

Gli oli del secondo anno di produzione, indicati in blu, si sono spostati verso valori più bassi



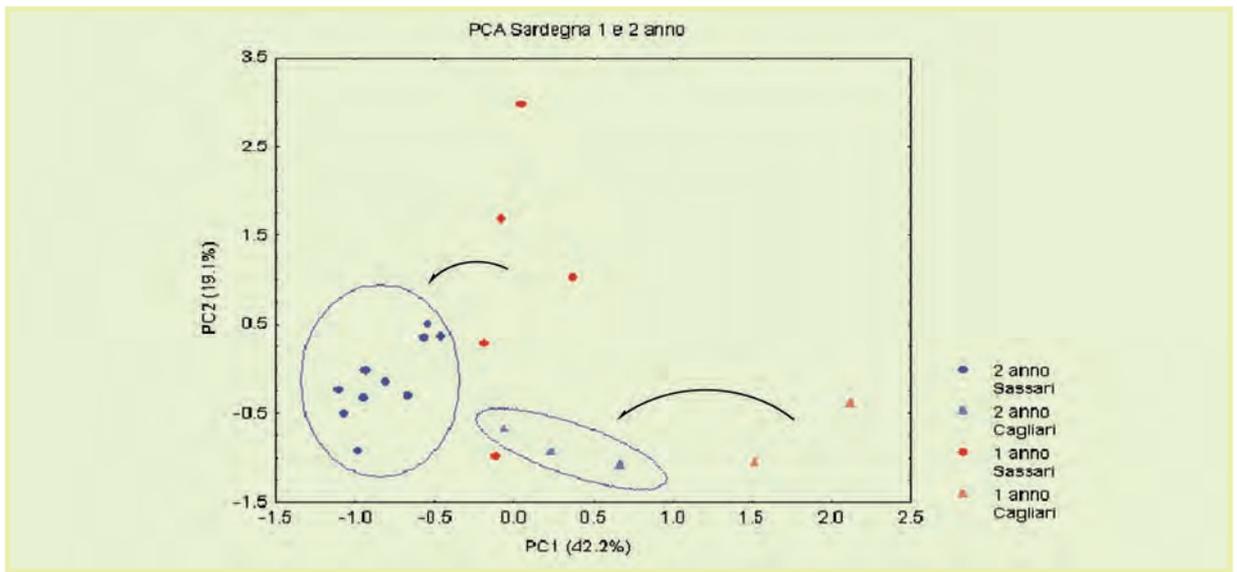


Figura 19: PCA dei campioni sardi delle due annate.

lungo la prima componente principale, pur rimanendo sempre separati fra loro per provenienza geografica. Le variabili che più hanno risentito dell'effetto stagionale sono state: i composti aldeidici, che al contrario della Sicilia diminuiscono dal primo al secondo anno, l'acido linoleico e le cere, le cui concentrazioni sono diminuite. Anche i composti terpenici risultano differenti: negli oli della provincia di Cagliari si osserva una forte diminuzione dei terpeni 3 e 4 passando dal primo al secondo anno di campionamento, mentre negli oli provenienti dalla provincia di Sassari a diminuire è solo il terpene 4 oltre agli acidi grassi insaturi. Si nota infine che i campioni della seconda stagione di raccolta risultano più raggruppati per provenienza geografica rispetto a quelli del primo anno che si disperdono maggiormente nello spazio delle prime due componenti principali. La concentrazione dell'acido linolenico invece non risente dell'effetto stagionale infatti gli oli sardi mostrano valori molto alti di questo parametro, ancora più elevati degli oli siciliani. Altre variabili caratterizzanti sono invece lo squalene, i terpeni 2, 3 e 4 che risultano in concentrazione molto elevata, mentre molto basso è il contenuto di terpene 1.

3.4.3 PUGLIA

Durante la prima annata di campionamento sono stati analizzati 32 oli: 17 provengono dalla provincia di Foggia e 15 dalla provincia di Taranto. L'analisi delle componenti principali con etichettatura dei campioni per provincia non evidenzia alcuna differenziazione su base geografica. L'analisi del fattore genetico sui soli oli monovarietali ha portato al risultato mostrato in figura 20.

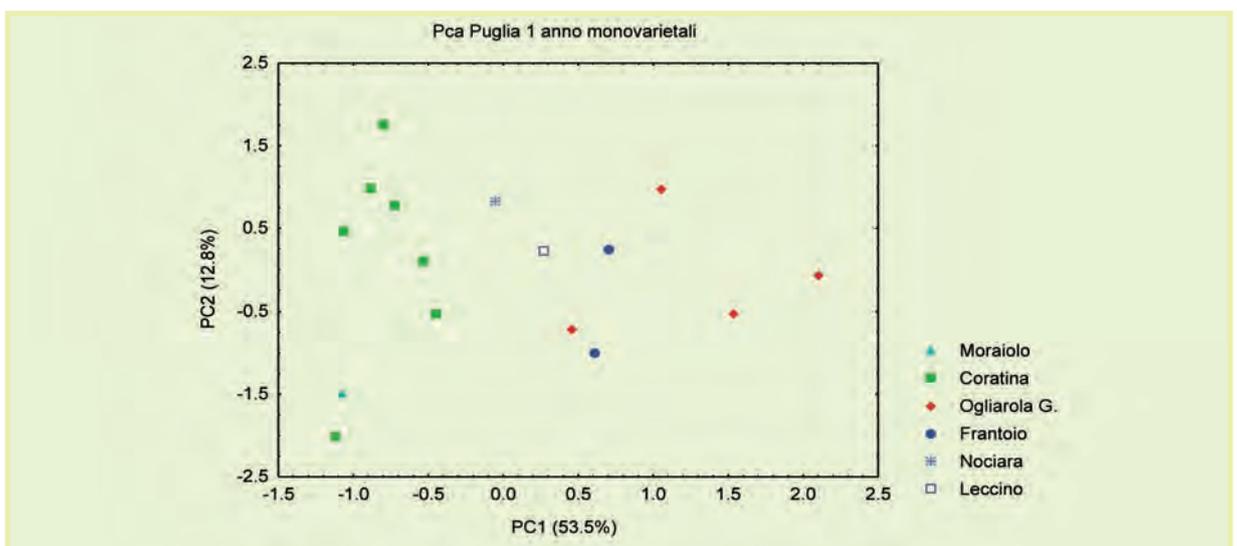


Figura 20: PCA dei campioni pugliesi monovarietali della prima annata etichettati per cultivar.

I due gruppi più numerosi, Coratina e Ogliarola, sono separati lungo la PC1. I campioni monovarietal Coratina sono caratterizzati da una presenza minore di terpene 3, terpene 1, β sitosterolo e acidi grassi saturi. D'altro canto gli oli monovarietal Ogliarola si distinguono per una presenza maggiore di composti quali trans-2-esenale, esenale, acido linoleico, cere e minore di squalene. I quattro campioni Ogliarola, indicati in rosso nella figura 20, sono accomunati oltre che dalla cultivar anche dalla provenienza dalla provincia di Foggia ed in particolare dalle stesse caratteristiche della composizione del terreno.

I campioni analizzati nella seconda annata sono 31, 14 provengono dalla provincia di Foggia, 13 dalla provincia di Taranto e 4 sono della provincia di Lecce. Gli oli della provincia di Taranto sono caratterizzati da alti valori di squalene e bassi valori di terpeni 1, 2 e 3, mentre gli oli della provincia di Foggia presentano alte concentrazioni di terpeni 1, 2 e 3 di acidi grassi saturi e di cere. Infine gli oli della provincia di Lecce hanno alti valori di composti aldeidici e di terpene 4, mentre la concentrazione delle cere risulta la più bassa della regione. Dei 31 oli pugliesi analizzati nel secondo anno, 18 sono monovarietal ed in particolare 9 della cultivar Coratina, 5 della cultivar Ogliarola, e un campione per ognuna delle seguenti varietà: Cellina, Leccino, Frantoio e Nocellara. Tutti gli altri oli sono multivarietal e ottenuti mescolando, da un minimo di due fino ad un massimo di quattro differenti cultivar sia di quelle sopra menzionate, sia di altre varietà tra le quali: Cima di Melfi, Peranzana, Santa Caterina e Picholine. E' stata effettuata quindi una PCA riguardante solo gli oli monovarietal, il cui risultato grafico è mostrato di figura 21. I campioni della cultivar Coratina si posizionano sempre verso valori minori lungo la PC1, ma risultano meno separati rispetto a quanto osservato nel primo anno.

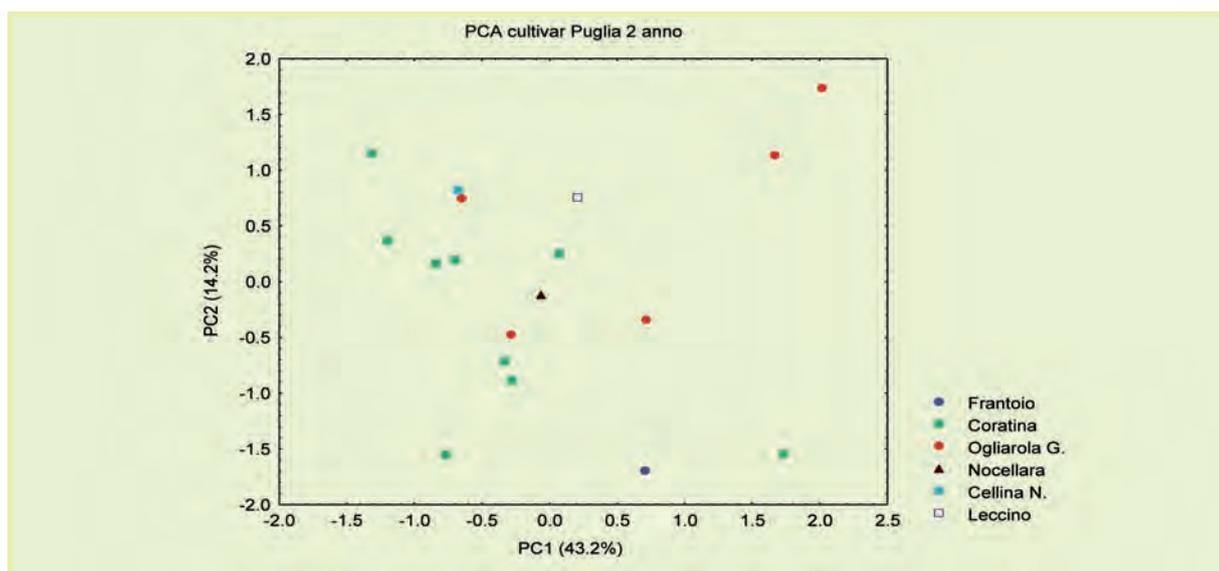


Figura 21: PCA dei campioni pugliesi monovarietal della seconda annata etichettati per cultivar.

Gli oli della cultivar Ogliarola risultano più ricchi di composti aldeidici, terpeni 1 e 2, di β sitosterolo e acido linoleico.

I campioni analizzati nella terza annata sono 13, tutti della provincia di Foggia. Si confermano i valori alti di terpeni 1, 2 e 3 in linea con i dati delle precedenti annate. Per quanto riguarda le cultivar, 7 oli sono monovarietal Ogliarola, mentre gli altri 6 non la contengono ma hanno la cultivar Peranzana come varietà unica o maggiormente abbondante. Nella PCA di figura 22 si nota una separazione tra i due gruppi differenziati per cultivar. Si confermano i valori mediamente più alti di composti aldeidici e terpeni 1 e 2 della cultivar Ogliarola rispetto agli altri campioni.

Dai dati meteo (vedi tabella 1) si può osservare che la seconda annata di campionamento è stata caratterizzata da una minore piovosità, per un totale medio di circa 65 mm di pioggia in meno. La temperatura ha subito invece una diminuzione di circa 0,4°C.



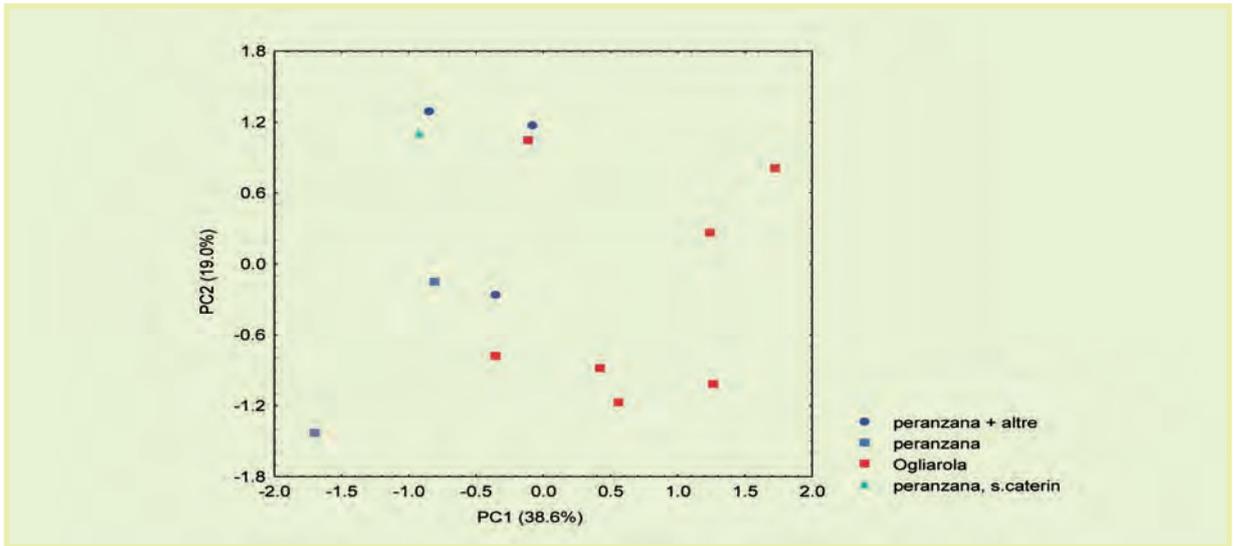


Figura 22: PCA dei campioni pugliesi della terza annata etichettati per cultivar.

Infatti l'effetto stagionale non è netto, si nota solo una parziale separazione lungo la PC2 dovuta alla maggior concentrazione di squalene e acidi grassi insaturi nei campioni della seconda stagione che risultano invece meno ricchi di composti aldeidici, terpene 4 e terpene 1, vedi figura 23 che mostra la PCA dei soli oli pugliesi il cui campionamento è stato ripetuto nelle due successive stagioni. L'introduzione nel database dei campioni del terzo anno, di cui non si hanno a disposizione i dati meteo, conferma l'assenza di un effetto stagionale netto come è mostrato dalla figura 24.

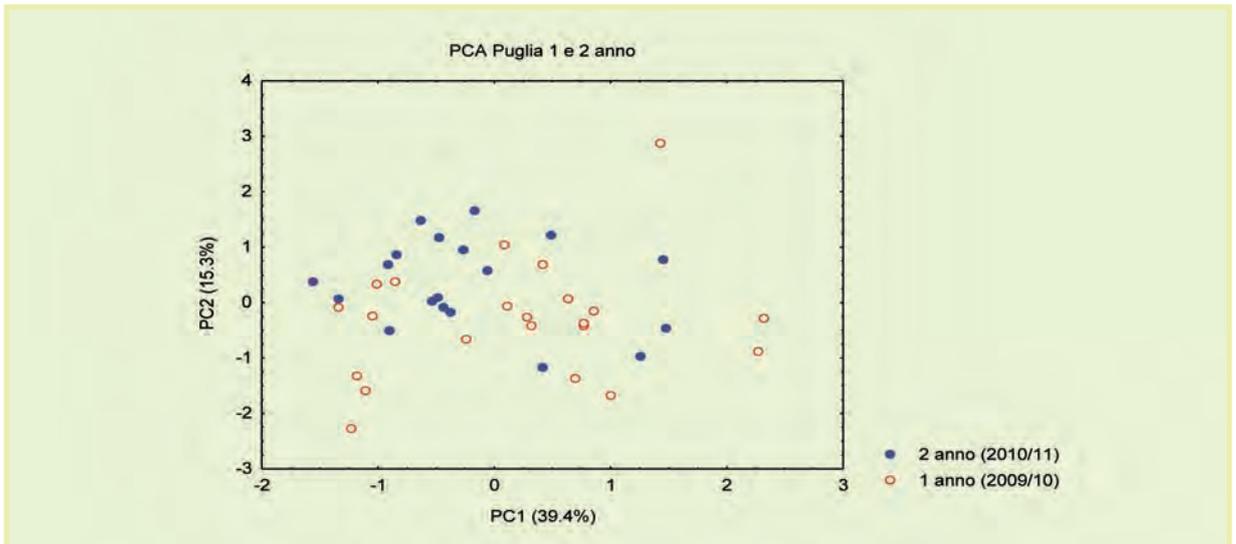


Figura 23: PCA dei campioni pugliesi delle due annate, esclusi i campioni di Lecce raccolti solo durante la seconda campagna di campionamento.

3.4.4 CALABRIA

Gli oli analizzati nella prima annata sono 25: 12 della provincia di Reggio Calabria e 13 della provincia di Cosenza. I dati NMR hanno permesso di effettuare una prima PCA, vedi figura 25, dove i campioni delle due province non risultano completamente separati, ad ogni modo i campioni della provincia di Reggio Calabria presentano maggior contenuto di composti aldeidici, acidi grassi saturi e β sitosterolo, mentre gli oli della provincia di Cosenza mostrano più alti valori di acidi grassi insaturi.

I due campioni della provincia di Reggio Calabria che nel grafico si discostano dagli altri della stessa provincia provengono entrambi da Caulonia. Questi due oli presentano i valori massimi, per questa regione, di acido linoleico. Anche etichettando i campioni per cultivar non si notano separazioni nette dei campioni.

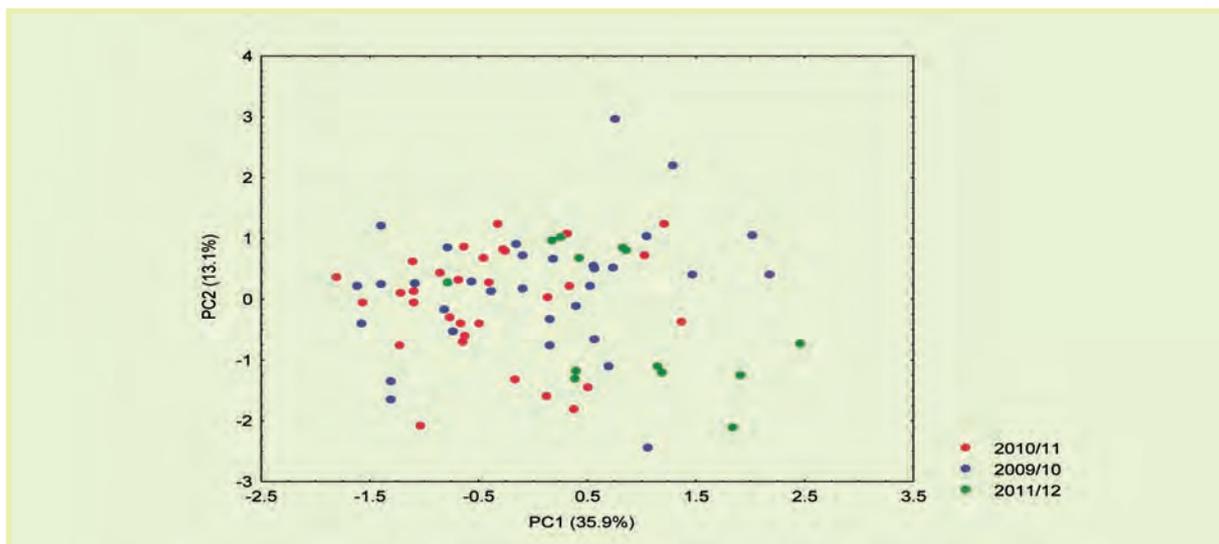


Figura 24: PCA dei campioni pugliesi delle tre annate, esclusi i campioni di Lecce della seconda campagna di campionamento.

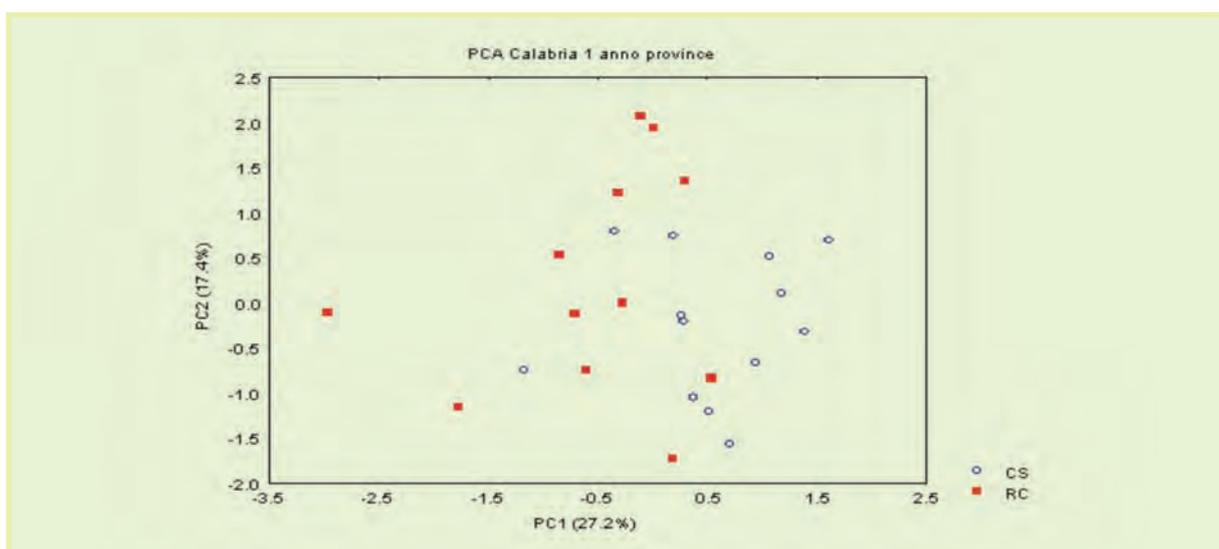


Figura 25: PCA Calabria 1 anno, campioni etichettati per province.

I campioni analizzati durante la seconda stagione sono 25: 17 della provincia di Reggio Calabria e 8 della provincia di Cosenza. La PCA di figura 26 mostra la provenienza geografica: solo tre oli della provincia di Reggio Calabria si separano nettamente dai campioni provenienti dalla provincia di Cosenza: sono i due oli di Caulonia della cultivar Geracese il campione di Stignano.

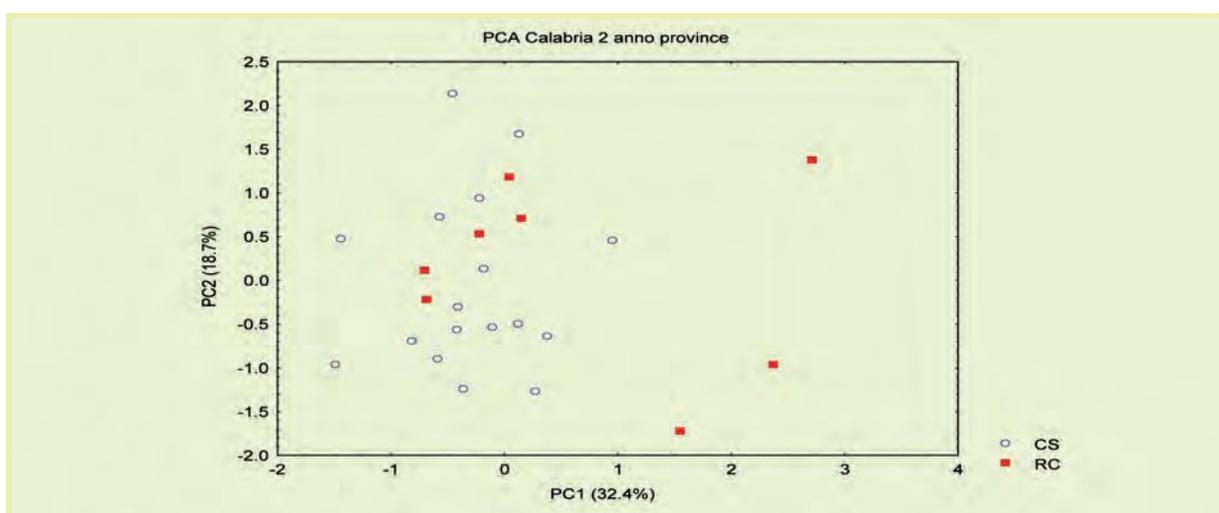


Figura 26: PCA Calabria 2 anno province.



Questi oli mostrano un contenuto elevato di acidi grassi saturi e terpene 1 e valori massimi di acido linoleico. La PCA di figura 27 mostra i campioni etichettati per cultivar. Si può notare come i due campioni di cultivar Geracese si separino nettamente da tutti gli altri, questi oli mostrano alti valori di Trans 2-Esenale, terpene 1 e 4, squalene e soprattutto acido linoleico. I campioni della cultivar Carolea sono caratterizzati in media da una più alta concentrazione di terpene 3, cere e da un minor contenuto di terpene 1, acido linoleico e acido linolenico e β sitosterolo, questa cultivar risulta separata dalla Rossanese che si caratterizza per i bassi valori di terpene 2 e 3, cere e alti valori di esanale.

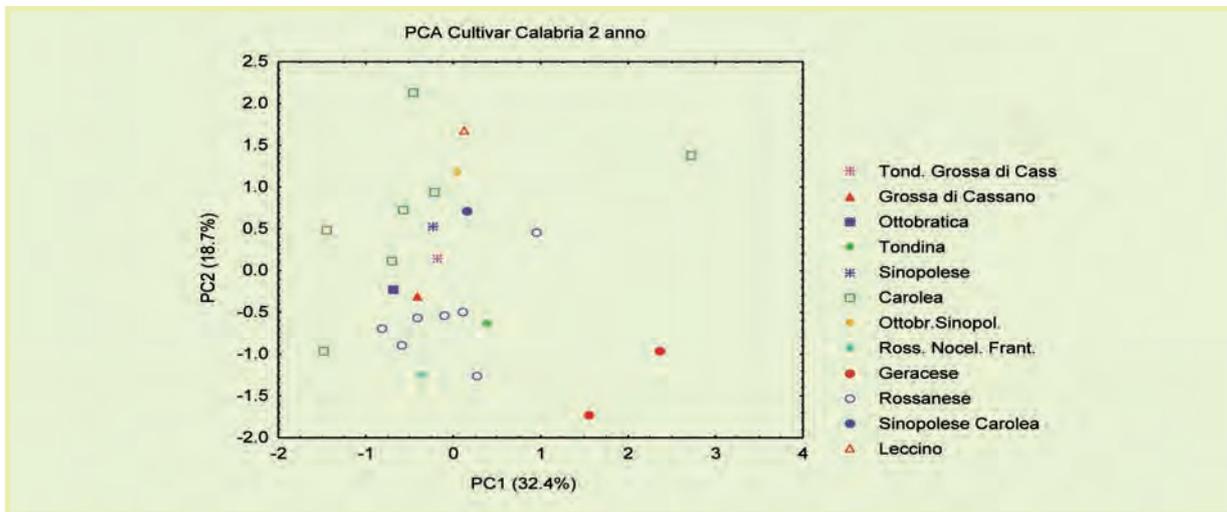


Figura 27: PCA dei campioni calabresi della seconda annata etichettati per cultivar.

Dai dati meteo (vedi tabella 1) si può osservare che la seconda annata di campionamento è stata caratterizzata da una maggiore piovosità, per un totale medio di circa 90 mm di pioggia in più. La temperatura è invece rimasta costante nelle due annate. I dati NMR, come indicato dal risultato della PCA mostrata in figura 28, non rilevano un effetto stagionale ed in effetti non ci sono variabili che cambiano in maniera sensibile tra le due annate.

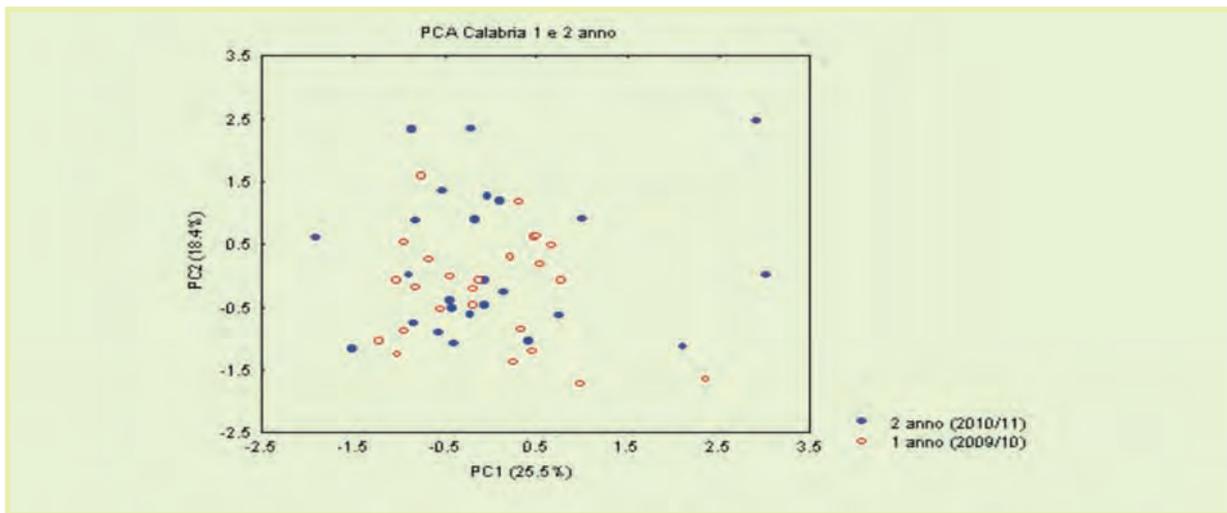


Figura 28: PCA dei campioni calabresi delle due annate.

3.4.5 LAZIO

I campioni del primo anno di raccolta sono 33: 13 della provincia di Roma, 6 della provincia di Rieti, 4 della provincia di Viterbo e 4 della provincia di Frosinone. La PCA di figura 29 mostra gli oli etichettati per provincia e per località di provenienza, mentre la figura 30 è relativa alle cultivar.

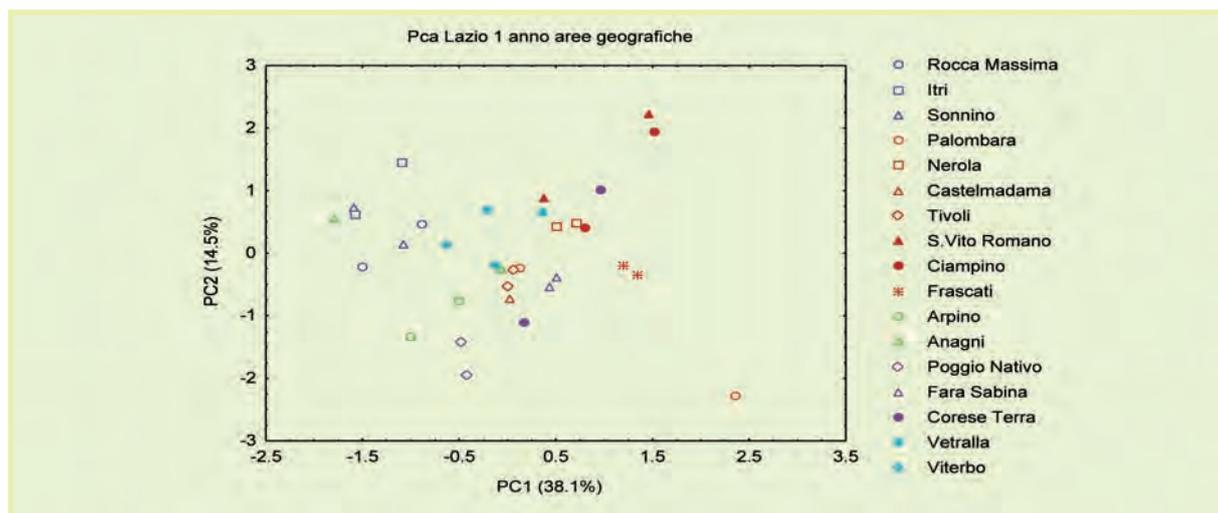


Figura 29: PCA degli oli laziali della prima annata etichettati per aree geografiche, gli oli della provincia di Latina sono indicati con simboli blu, Roma rossi, Frosinone verdi, Rieti viola e Viterbo azzurri.

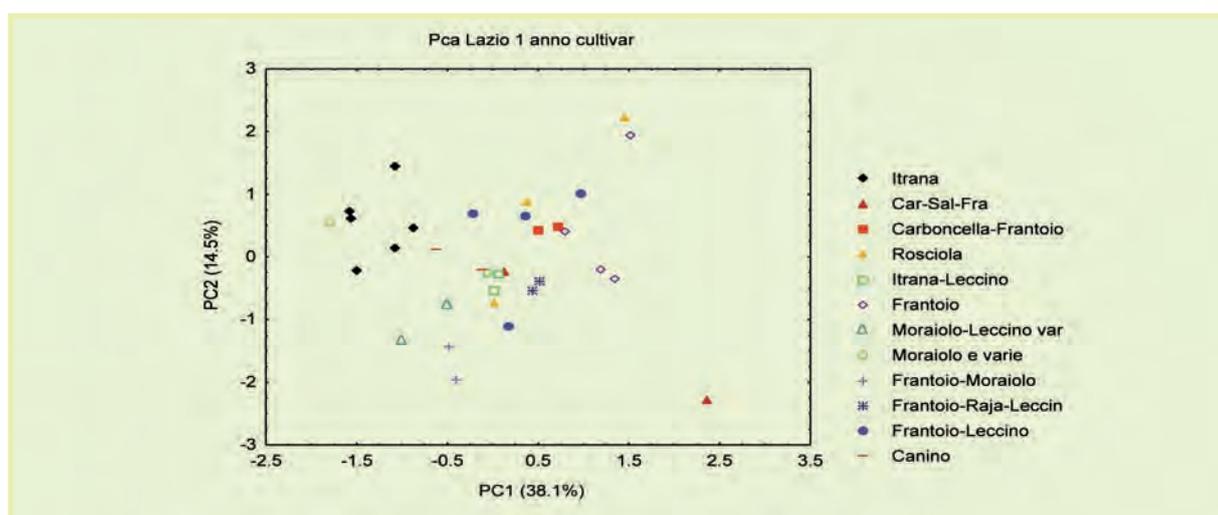


Figura 30: PCA degli oli laziali della prima annata etichettati per cultivar.

Gli oli di una stessa zona presentano anche caratteristiche simili per quanto riguarda la cultivar. I campioni della provincia di Latina sono tutti monovarietali Itrana, nel grafico delle PCA si ritrovano vicini e raggruppati nella parte sinistra e sono caratterizzati da un contenuto particolarmente basso di cere. Gli oli delle province di Roma e Rieti, caratterizzati principalmente dalla cultivar Frantoio, si raggruppano tra loro e mostrano quantità più elevate di β sitosterolo, cere e terpeni 3 e 2. Questi composti risultano invece meno abbondanti negli oli delle province meridionali di Frosinone e Latina. I quattro oli della provincia di Viterbo sono posizionati nella parte centrale del grafico della PCA e sono caratterizzati dalla presenza di quantità inferiori di cere, terpeni 2 e 3 e quantità elevate di terpene 1.

Gli oli campionati nella seconda stagione sono 10, di cui 4 della provincia di Roma, 3 della provincia di Viterbo, 2 provenienti dalla provincia di Rieti e 1 da quella di Latina. Una prima analisi delle componenti principali mostrata in figura 31, ha riguardato la provenienza geografica di questi campioni per province. Come nel primo anno anche in questo caso il campione di Latina (monovarietali Itrana) risulta differente dagli altri. I campioni di Roma non si raggruppano a causa della differente composizione varietale come si nota nella figura 32



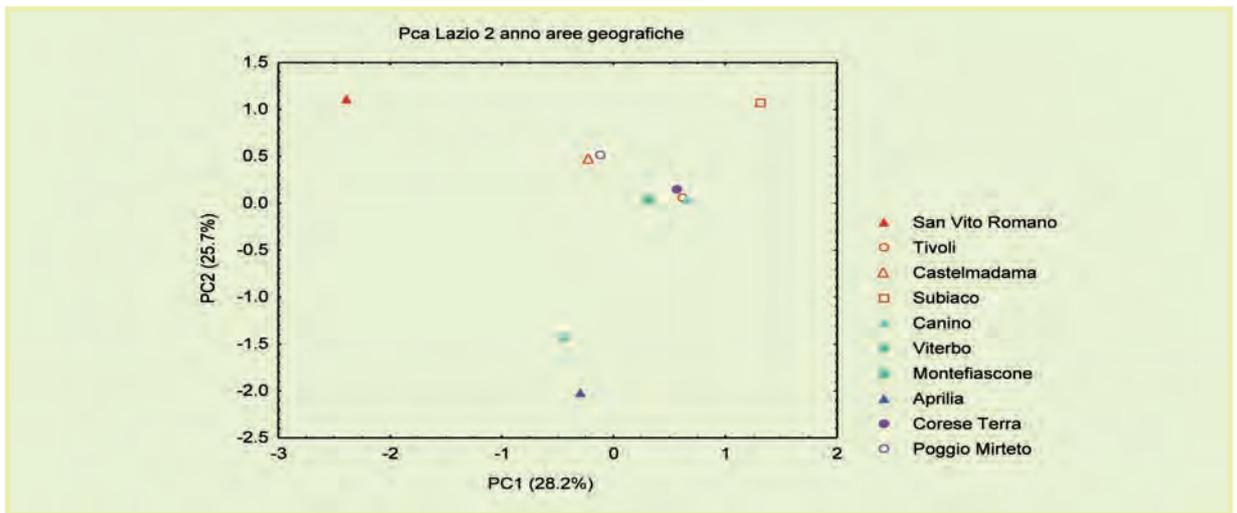


Figura 31: PCA degli oli laziali della seconda annata per aree geografiche, gli oli della provincia di Latina sono indicati con simboli blu, Roma rossi, Frosinone verdi, Rieti viola e Viterbo azzurri.

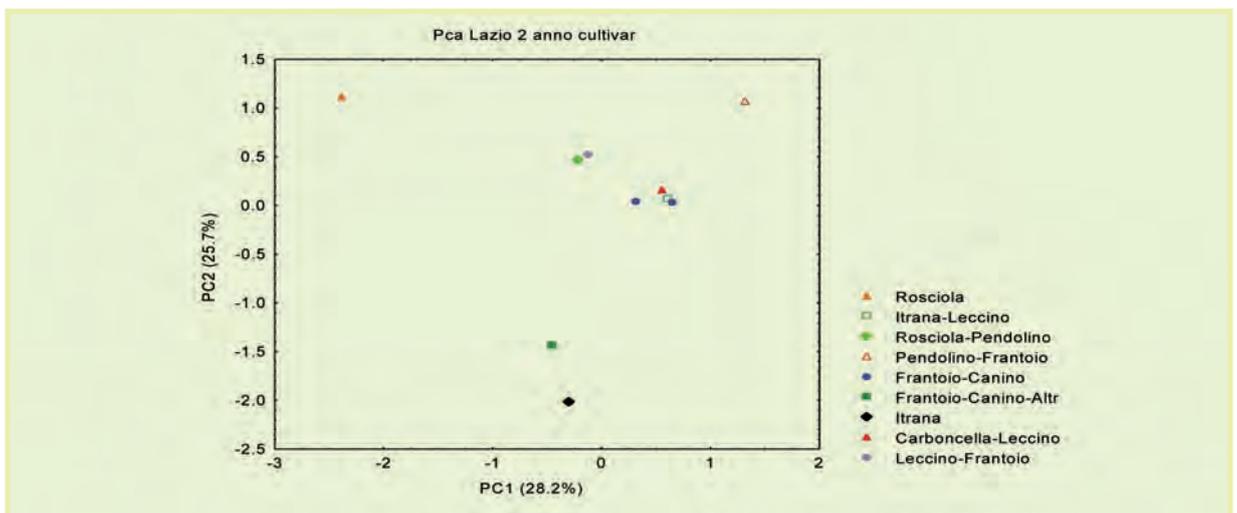


Figura 32: PCA degli oli laziali della seconda annata etichettati per cultivar.

Dai dati meteo (vedi tabella 1) si può osservare che la seconda annata di campionamento è stata caratterizzata da una maggiore piovosità, per un totale medio di circa 130 mm di pioggia in più. La temperatura è invece rimasta costante nelle due annate. L'analisi delle componenti principali relativa ai dati NMR su entrambe le annate non mostra un effetto stagionale, come mostrato in figura 33. I valori dei parametri misurati non variano infatti sensibilmente nelle due annate, con le uniche eccezioni nei campioni di Roma e Rieti, dove si nota una diminuzione di concentrazione di cere, composti aldeidici e terpene 3.

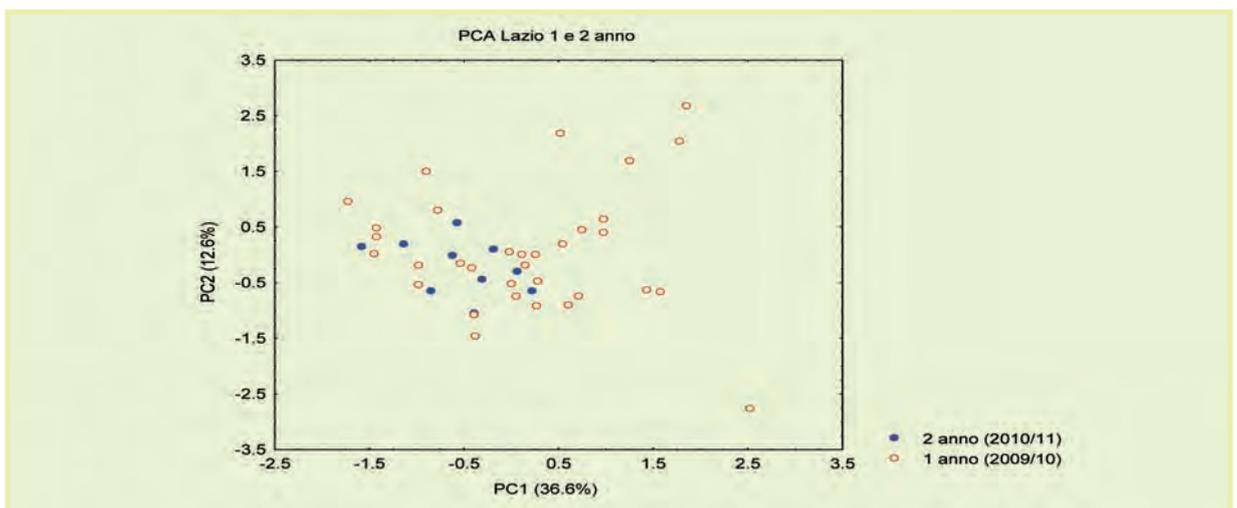


Figura 33: PCA dei campioni laziali delle due annate

3.4.6 MOLISE

I campioni della prima annata di raccolta sono 18, tutti della provincia di Campobasso e accomunati a due a due dalla stessa azienda di produzione e località di provenienza ma da date di raccolta differenziate di circa un mese. La PCA di figura 34 mostra una separazione tra le varie coppie confermando quindi che l'effetto geografico predomina su quello dovuto alla maturazione della drupa. I campioni di Guglionesi sono ricchi in sn 1,3 digliceridi, β sitosterolo, aldeidi e terpeni, mentre i campioni di Larino hanno bassi valori di tali composti. Gli oli di Montecifone, Ururi e S.Martino in P. hanno un contenuto basso di acido linolenico, squalene e sn 1,3 digliceridi. Gli oli di Campobasso e di Casacaleca sono caratterizzati da più alti valori di squalene e di un composto terpenico rispetto agli oli di Palata, più ricchi in acidi grassi saturi, cere e due composti terpenici.

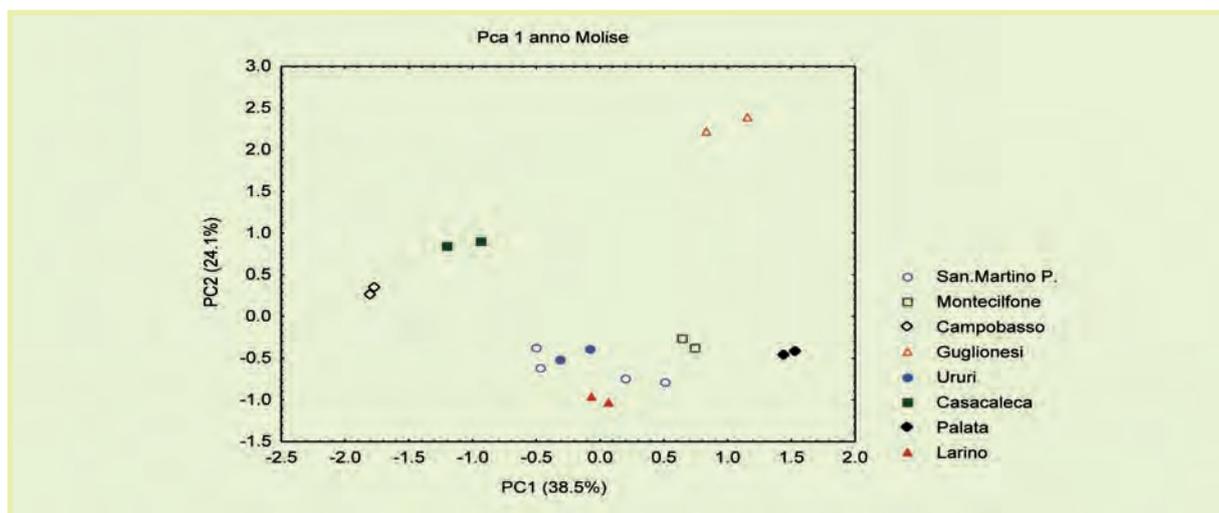


Figura 34: PCA dei campioni molisani della seconda annata etichettati per origine geografica.

L'effetto genetico (cultivar) è mostrato nel grafico della PCA di figura 35 (condotta sui soli 16 campioni di cui era disponibile tale informazione), si può notare che gli oli delle cultivar Gentile e mista Gentile-Leccino costituiscono il gruppo di campioni differenziati in basso a destra lungo la componente PC2 caratterizzati da un elevato contenuto di acido linoleico e basso di squalene.

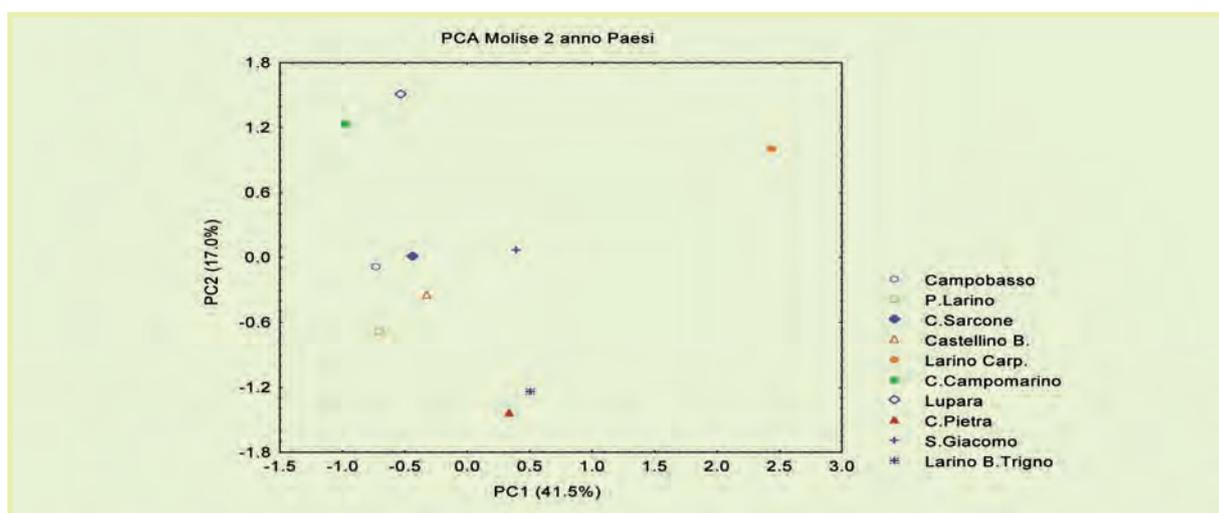


Figura 35: PCA dei campioni molisani della prima annata etichettati per cultivar.



I 6 campioni Gentile-Leccino presentano anche quantità maggiori di sn 1,2 digliceridi eccetto i due campioni di Palata che hanno in assoluto anche il contenuto più alto delle aldeidi. Queste ultime sono presenti in alte concentrazioni anche nei due campioni di Guglionesi della cultivar Leccino posizionati nella parte più alta del grafico. Gli altri due campioni della cultivar Leccino si ritrovano invece più vicini ai due campioni della cultivar Ogliarola ed insieme ad essi sono caratterizzati da quantità più elevate di squalene e più basse di acido linoleico, β sitosterolo, terpene 2. Sebbene distanziati nel grafico della PCA, anche per le ragioni della diversa altimetria precedentemente evidenziate, i quattro oli della cultivar Leccino sono comunque accomunati nella composizione da elevati livelli di terpene 4, oltre che di squalene, e da più bassi livelli di acido linoleico.

I campioni della seconda stagione di raccolta sono 10, tutti della provincia di Campobasso. La prima PCA effettuata ha riguardato la provenienza geografica per località di produzione, il risultato è mostrato in figura 36.

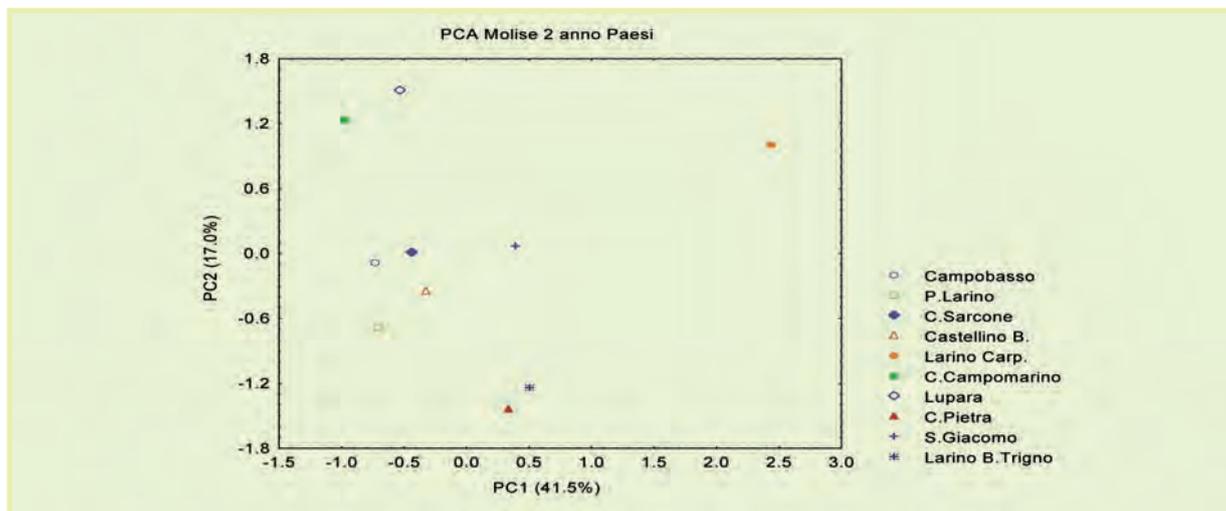


Figura 36: PCA dei campioni molisani della seconda annata etichettati per origine geografica.

Si nota come il campione proveniente da Larino di Carpineto risulti completamente diverso dagli altri, esso si posiziona infatti in una zona del grafico della PCA completamente isolata. Questo olio presenta valori molto alti di composti aldeidici e di terpeni 3 e 2, acido linoleico cere, mentre ha valori più bassi di squalene. I rimanenti campioni, pur non avendo in comune elementi come cultivar, altitudine o luogo di produzione, si distribuiscono a coppie, lungo la PC2. I 10 campioni molisani sono anche tutti differenti per composizione di Cultivar. Tre oli sono monovarietali rispettivamente di cultivar Leccino, Cipressini e Gentile di Larino, gli altri sette campioni sono ottenuti da miscele di due o più cultivar in composizione differente sia qualitativamente che quantitativamente. Il risultato della PCA con i campioni etichettati per cultivar è mostrato in figura 37: gli oli contenente la cultivar Leccino sembrano disporsi sul

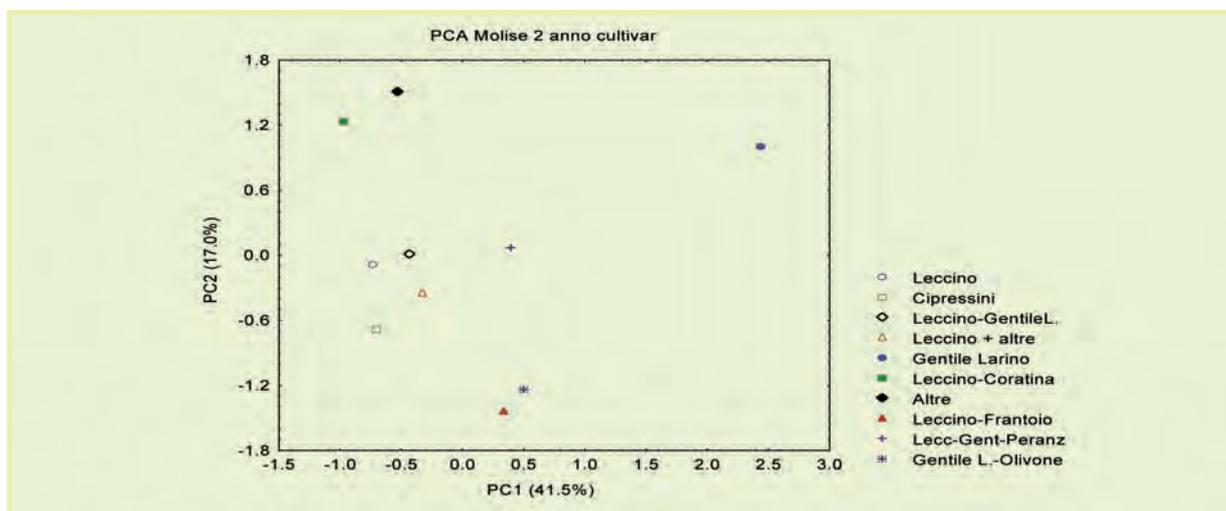


Figura 37: PCA dei campioni molisani della seconda annata etichettati per cultivar.

versante sinistro del grafico, mentre quelli nella cui composizione è presente a cultivar Gentile si dispongono sul versante destro.

L'effetto delle cultivar sembra essere predominante nella differenziazione di questi oli che si separano proprio per la differente composizione genetica; la vicinanza geografica, mostrata nella prima PCA infatti non mette in evidenza l'esistenza di raggruppamenti naturali dovuti a questo parametro, ricordiamo infatti che stiamo considerando oli distribuiti su una zona di territorio piuttosto ristretta.

Dai dati meteo (vedi tabella 1) si può osservare che la seconda annata di campionamento è stata caratterizzata da una minore piovosità, per un totale medio di circa 80 mm di pioggia in meno. La temperatura ha subito invece una diminuzione di circa $0,4^{\circ}\text{C}$. Dall'analisi delle componenti principali relativa all'effetto stagionale mostrata in figura 38 si nota come solo un campione della seconda stagione di raccolta, non risulta raggruppato con gli altri oli della stessa annata di produzione: si tratta dell'olio proveniente da Larino Bagni del Trigno.

Per il resto la separazione lungo la PC1 è piuttosto netta tra le due annate. In particolare i campioni della stagione 2009/10 risultano avere una concentrazione più alta dei composti aldeidici, degli acidi grassi saturi, dei terpeni 1, 2 e 3 e dell'acido linoleico, mentre i campioni del secondo anno, oltre ad avere concentrazioni molto più basse dei composti appena menzionati, sono caratterizzati da più alte concentrazioni di squalene e terpene 4. Facendo invece un confronto generale degli oli del Molise con quelli del resto del paese, si osserva nei primi un elevato contenuto di terpene 2 e 3 e cere.

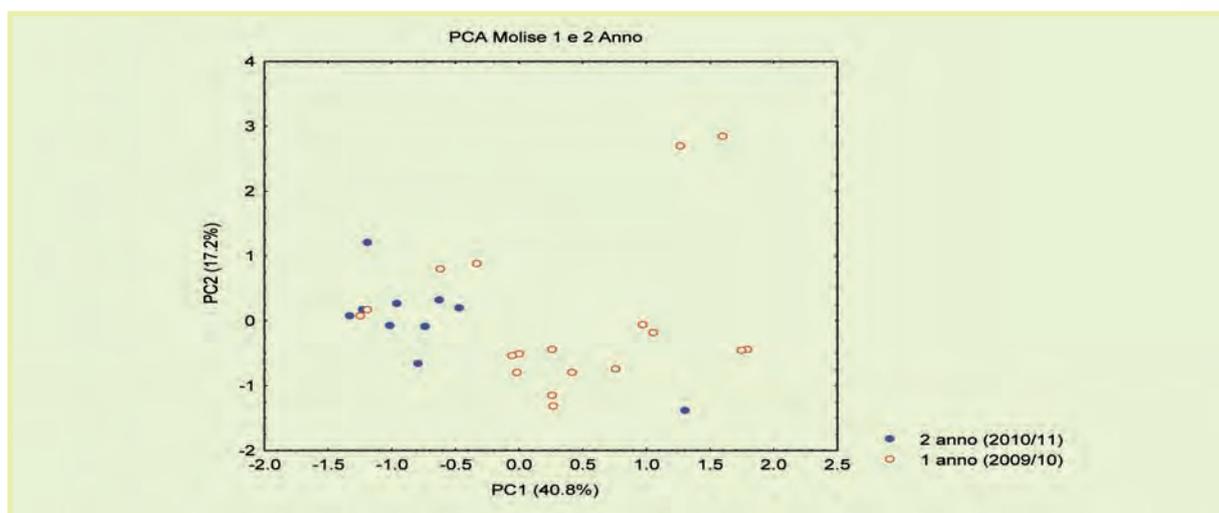


Figura 38: PCA dei campioni molisani delle due annate.



3.4.7 LOMBARDIA

I campioni del primo anno sono solamente 2, tutti della provincia di Brescia. Non è stato quindi possibile effettuare un trattamento statistico a causa dell'esiguo numero di oli.

Nella seconda campagna di raccolta sono stati campionati 6 oli, di cui 3 della provincia di Brescia (uno della zona del Lago di Garda), uno della provincia di Bergamo, uno della provincia di Lecco e uno della provincia di Como. L'analisi delle componenti principali, vedi figura 39, evidenzia come questi oli risultino piuttosto differenti tra loro.

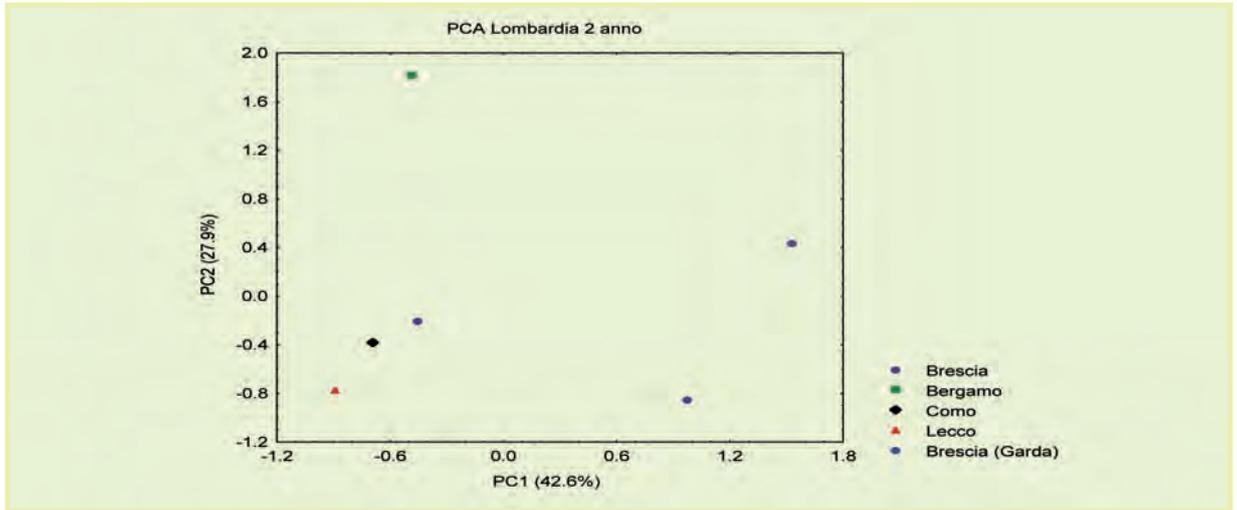


Figura 39: PCA dei campioni lombardi della seconda annata etichettati per origine geografica.

Il campione della provincia di Bergamo e quello proveniente dall'Alto Garda si collocano in due zone dello spazio molto distanziate tra loro e da tutti gli altri campioni. E' la composizione in cultivar a spiegare la separazione mostrata in PCA. Il numero esiguo di campioni analizzati in questa regione non ha consentito un'accurata caratterizzazione, ma la separazione tra gli oli monovarietali 100% Casaliva e gli altri è piuttosto netta, vedi figura 40.

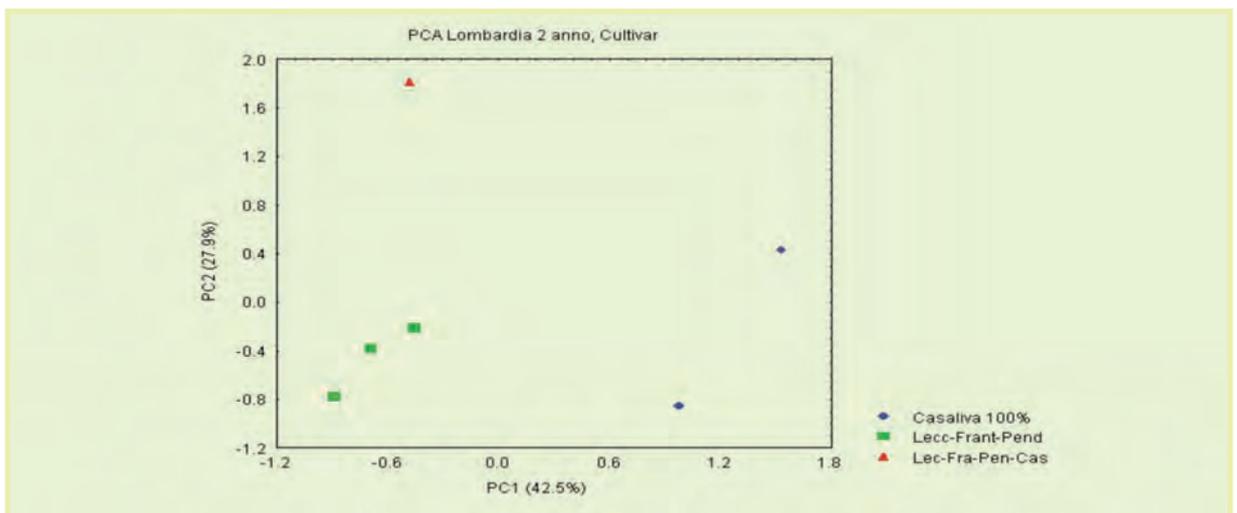


Figura 40: PCA dei campioni lombardi della seconda annata etichettati per cultivar.

I tre oli vicini nella parte bassa a sinistra del grafico sono quelli ottenuti per combinazione di tre cultivar: Leccino, Pendolino e Frantoio. Mentre i due oli che si separano lungo la PC1 sono i monovarietali Casaliva, accomunati da un maggior contenuto di esanale e terpeni 1, 2 e 3. Dai dati meteo (vedi tabella 1) si può osservare che la seconda annata di campionamento è stata caratterizzata da una maggiore piovosità, per un totale medio di circa 200 mm di pioggia in più. La temperatura ha subito invece una diminuzione di circa 1°C. Nei campioni lombardi si nota un chiaro effetto stagionale tra il primo e il secondo anno evidenziato sia dai dati NMR che IRMS come mostrato in figura 41. In particolare i campioni del secondo anno sono più ricchi in acidi grassi insaturi e cere, mentre hanno una minore concentrazione di composti al

deidici, terpeni 4, acido linoleico, linolenico e acidi grassi saturi.

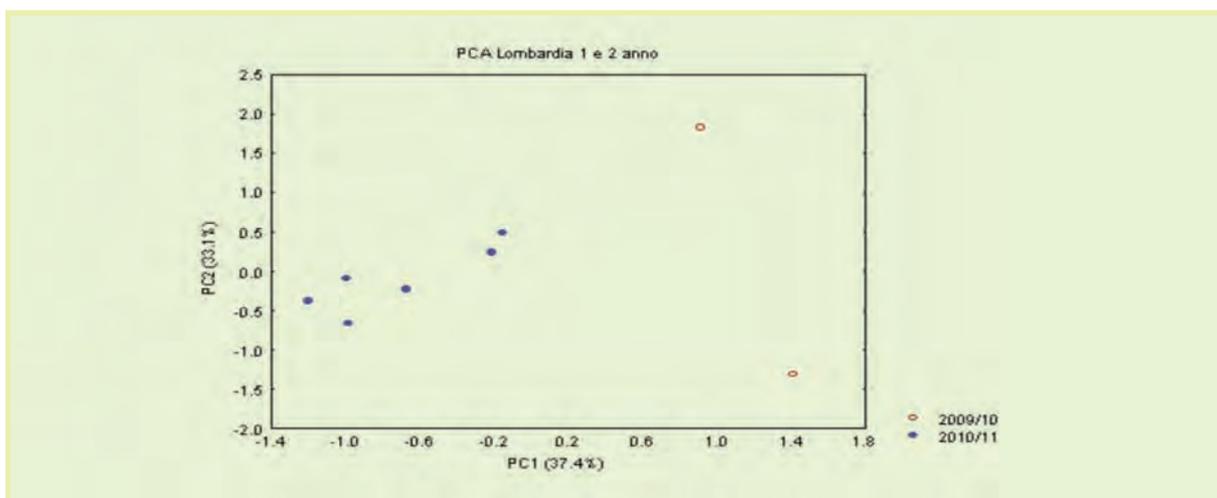


Figura 41: PCA dei campioni lombardi delle prime due annate.

3.4.8 TOSCANA

In tutte le tre annate di campionamento sono stati raccolti solo oli della provincia di Grosseto e della stessa composizione varietale. Per cui non si sono rilevate particolari differenze all'interno delle singole annate. Nel primo anno sono stati raccolti 10 oli, ma causa del mancato ricevimento di campioni doppi l'analisi NMR ha riguardato solo 5 campioni. Nel secondo anno i campioni analizzati sono stati 9 e nel terzo 15.

Dai dati meteo (vedi tabella 1) si può osservare che la seconda annata di campionamento è stata caratterizzata da una maggiore piovosità, per un totale medio di circa 143 mm di pioggia in più. La temperatura ha subito invece una diminuzione di circa 0.6°C . Nel confronto fra le prime due stagioni di raccolta, i campioni del secondo anno si separano da quelli del primo lungo la PC2, vedi figura 42 e risultano più ricchi di squalene, mentre hanno una minore concentrazione di trans 2 esenale, acido linoleico e acidi grassi saturi. La PCA di figura 43 consente una prima stima dei dati sulla terza stagione di raccolta, di cui non si hanno ancora in possesso i dati meteo. Si nota come i campioni della terza annata si sovrappongono soprattutto con quelli della prima stagione di raccolta. Dal confronto con le altre regioni emerge che gli oli toscani sono particolarmente ricchi di terpeni 1, 2 e 3 e β sitostero e poveri di squalene.

3.4.9 LIGURIA

Gli oli di questa regione sono stati tutti campionati nella sola seconda annata, quindi non è stato possibile analizzare l'effetto stagionale. I 10 campioni provengono 4 dalla provincia di Imperia, 2 dalla provincia di Genova, 2 dalla provincia di Savona e due dalla provincia di La

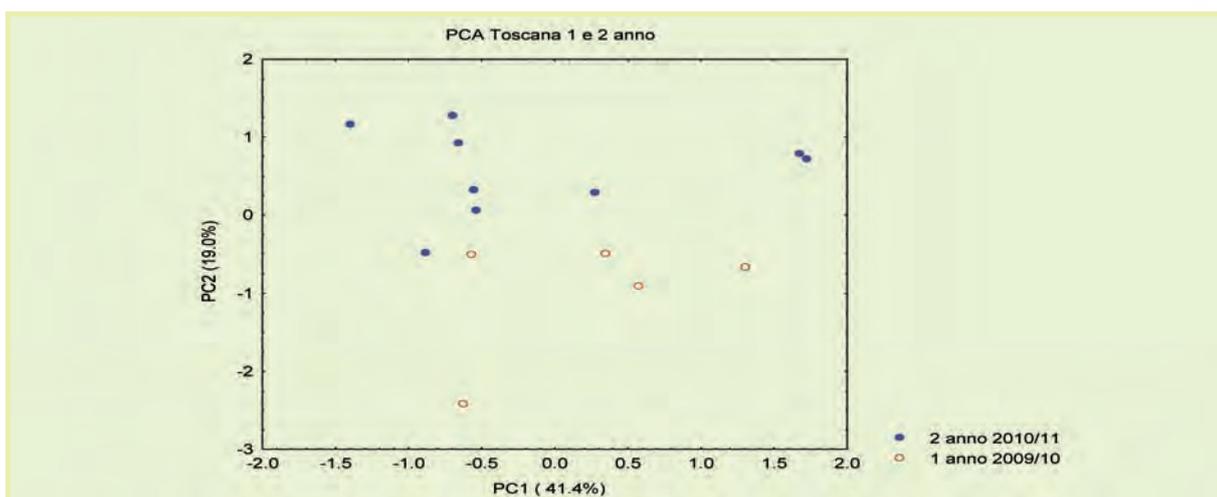


Figura 42: PCA dei campioni toscani delle due annate.



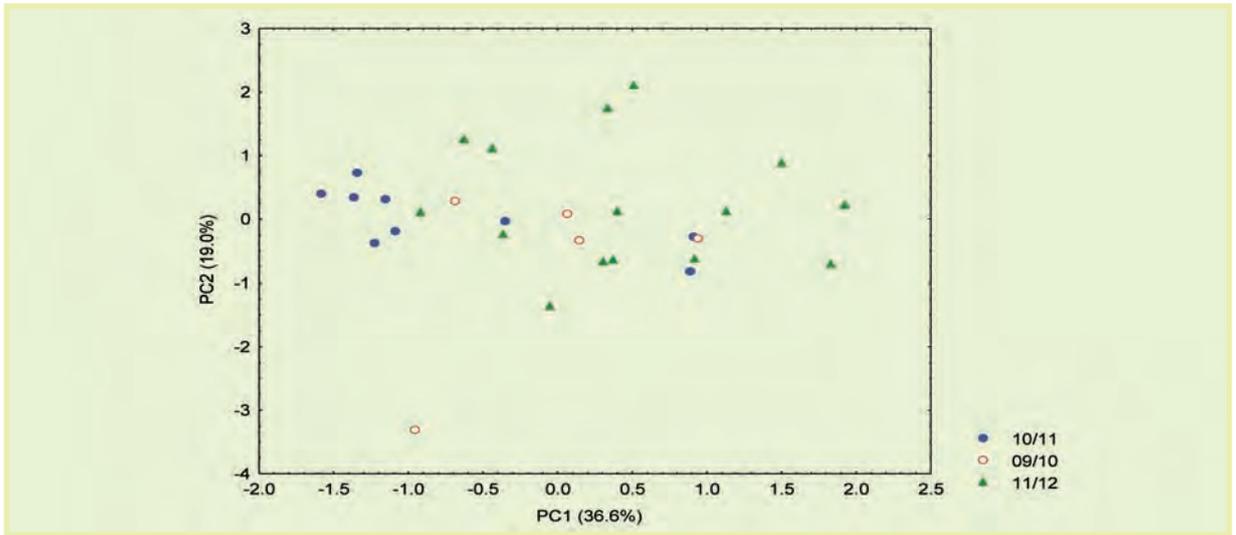


Figura 43: PCA dei campioni toscani delle tre annate.

Spezia. L'analisi delle componenti principali per criteri geografici è mostrata in figura 44. I due campioni della provincia di Genova sono caratterizzati dai valori più bassi, per questa regione, di acidi grassi insaturi e alti di β sitosterolo. I campioni della provincia di Imperia, escluso l'unico campione proveniente da Diano Marina, mostrano valori nettamente più alti, per questa regione, dei composti aldeidici. Anche in questo caso il fattore genetico sembra

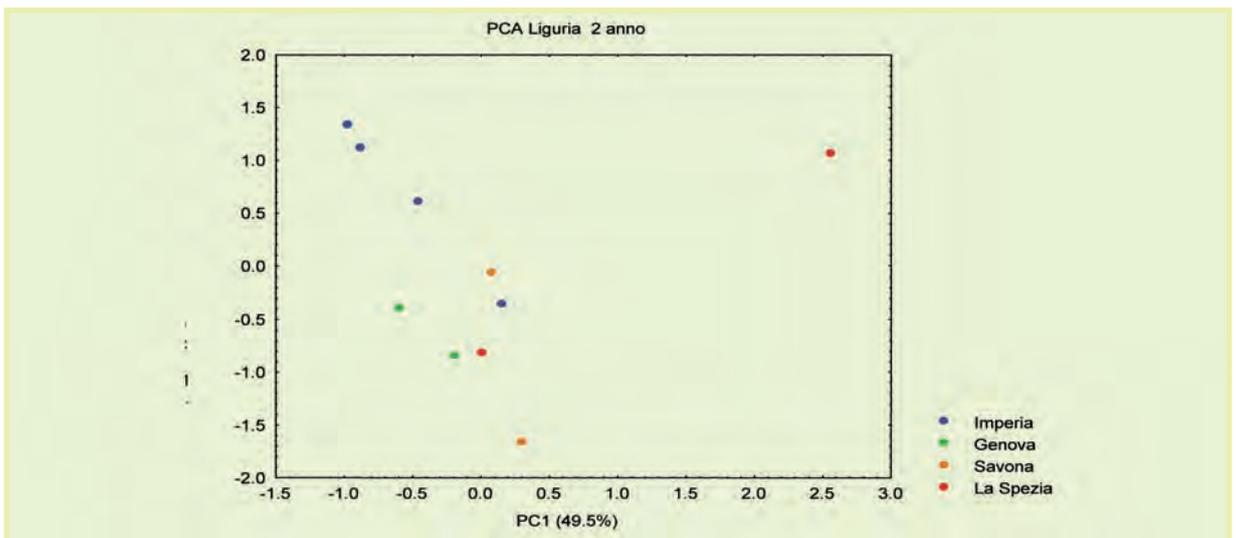


Figura 44: PCA dei campioni liguri della seconda annata etichettati per origine province.

spiegare maggiormente le differenze messe in evidenza dalla PCA. Andando infatti ad etichettare i campioni per cultivar, vedi figura 45, si nota come i campioni di Imperia e Savona (riviera di Ponente), ma anche uno di Genova, siano monovarietali Taggiasca 100%.

L'altro campione della provincia di Genova è invece caratterizzato maggiormente dalla cultivar Lavagnina, mentre un campione della provincia di La Spezia risulta prevalentemente composto dalla cultivar Razzola. Tutti questi oli hanno quindi cultivar caratteristiche della Liguria (Taggiasca, Lavagnina e Razzola) e si raggruppano nella zona sinistra del grafico. L'unico campione che non presenta queste cultivar caratteristiche della sola regione Liguria, ma solamente le cultivar Frantoio e Leccino, si separa invece nettamente lungo la PC1: è l'altro campione della provincia di La Spezia ed è caratterizzato da una composizione chimica nettamente differente rispetto agli altri oli liguri, in quanto ricco di β sitosterolo, acidi grassi saturi e insaturi e povero di cere, squalene, tutti i composti terpenici e aldeidici.

Sebbene gli oli della regione Liguria siano stati raccolti solo durante la seconda annata

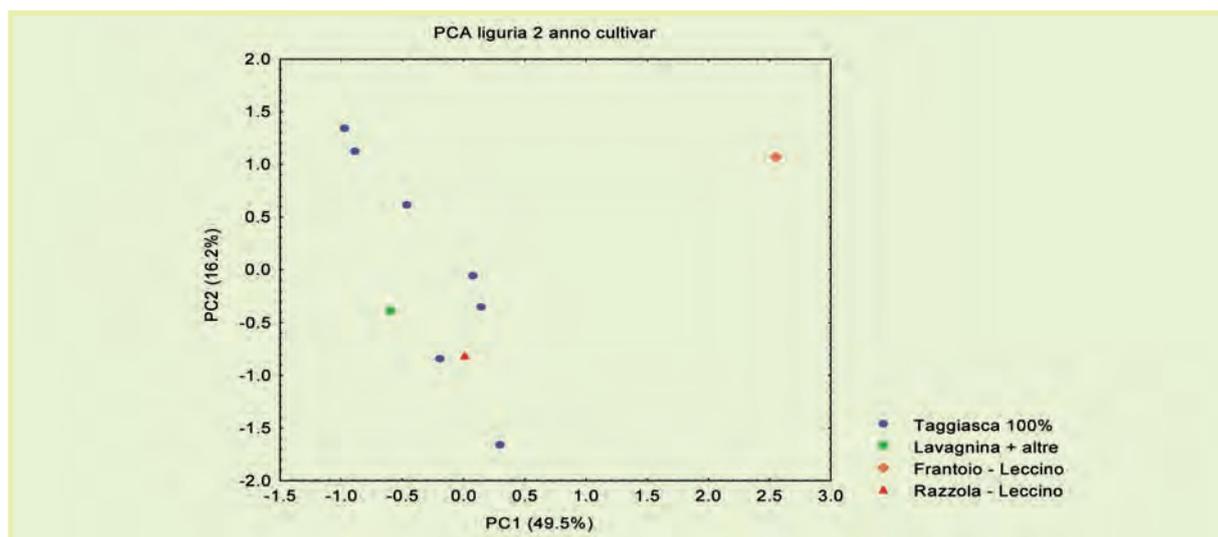


Figura 45: PCA dei campioni liguri della seconda annata etichettati per cultivar.

di monitoraggio, è possibile evidenziarne alcune caratteristiche che li differenziano dal resto dei campioni italiani. Infatti presentano una composizione alquanto differenziata da quelli di tutte le altre regioni relativamente alla sola seconda annata: in essi infatti si riscontra il contenuto più elevato di cere, aldeidi, terpeni 1,2 e 3 e acidi grassi insaturi, e il più basso contenuto di squalene e acidi grassi saturi, come pure basso è il livello di acido linoleico.

3.4.10 Conclusioni caratterizzazione NMR

L'analisi NMR applicata agli oli extravergini di oliva italiani ripetuta in annate successive, effettuando un campionamento il più possibile omogeneo, ha permesso di evidenziare sia l'influenza dell'effetto stagionale sulla composizione chimica degli oli, sia la presenza di variabili che, per ogni regione, risultano caratteristiche rappresentative senza risentire della variabilità dovuta alla stagione di raccolta. Per quanto riguarda le variabili che non risentono dell'effetto stagionale e che quindi possono essere considerate dei parametri caratterizzanti le singole regioni, i risultati più significativi che si sono osservati sono:

- gli oli sardi mostrano un maggior valore di squalene e acido linoleico rispetto al resto d'Italia, ma sono poveri, come i siciliani, di terpene 1.
- gli oli toscani sono ricchi di terpeni 2 e 1, β sitosterolo e cere, ma poveri di squalene
- gli oli calabresi mostrano valori sempre costanti dei composti aldeidici, terpeni 2 e 3, ovvero di quei parametri che di solito sono molto sensibili all'effetto stagionale nelle altre regioni, inoltre presentano un valore costante di acido linoleico e acidi grassi insaturi. In particolare i terpeni 2 e 3 hanno sempre la concentrazione più bassa rispetto a tutti gli altri campioni peninsulari.

L'effetto stagionale invece si osserva in particolare nella diminuzione della concentrazione delle aldeidi tra il primo e il secondo anno in quasi tutte le regioni a parte la Sicilia che mostra invece un andamento opposto. Anche i terpeni 2 e 3 risultano in molti casi diminuiti nel secondo anno, così come l'acido linoleico e le cere. Variabili come gli acidi grassi saturi e insaturi e il β sitosterolo invece risentono meno dell'effetto stagionale. Molto interessante è l'andamento della concentrazione dell'acido linoleico nel secondo anno di raccolta, questo valore risulta più basso come media nei campioni del nord (Lombardia e Liguria), per crescere in quelli del centro (Toscana, Lazio e Molise) e ancor più in quelli del sud (Puglia e Calabria), fino ad assumere un valore massimo nei campioni delle isole. Questo effetto è meno visibile nel primo anno di raccolta, caratterizzato peraltro da un numero limitato dei campioni del nord, in quanto non sono presenti oli liguri. In generale la differenza stagionale, relativa ai primi due anni, si nota in maniera evidente per i campioni delle regioni Toscana, Lombardia, Molise, Sicilia e Sardegna. Nel Lazio e nella Puglia la differenza è invece meno netta. Gli oli della Calabria invece



sono gli unici che non mostrano alcun effetto stagionale.

3.5 Conclusioni generali e futuri sviluppi dell'analisi

L'uso congiunto delle due tecniche analitiche ha consentito una caratterizzazione degli oli extravergini italiani mettendo in evidenza come la composizione chimica e isotopica dei campioni è influenzata da fattori geografici e climatici. E' stato possibile classificare gli oli per aree geografiche in base ai risultati ottenuti dalle diverse analisi. In particolare i dati isotopici individuano le seguenti macroaree geografiche: nord, isole, sud Tirreno e centro-sud Adriatico. Le analisi NMR definiscono le seguenti classi di appartenenza per simile composizione chimica: nord, centro, sud e isole. E' stato studiato anche l'effetto dovuto alle cultivar e l'effetto stagionale che ha permesso di individuare le variabili più sensibili ai cambiamenti climatici e anche quelle che caratterizzano gli oli delle singole regioni, indipendentemente dalle variazioni dei dati meteo. I futuri sviluppi del progetto prevedono un ulteriore ampliamento del database con i risultati del campionamento della terza stagione di monitoraggio in corso e un'analisi statistica congiunta delle variabili di entrambe le tecniche analitiche. Questo permetterà di ottenere una migliore classificazione e caratterizzazione degli oli extravergini di oliva italiani.

RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano per la fornitura dei campioni le aziende aderenti all'UNAPROL che hanno aderito al progetto; per le analisi IRMS: Luciano Spaccino del CNR-IBAF; per le analisi NMR: Raffaella Petroccione, Antonella Cerreto e Marco Costantini del CNR-IMC; per la collaborazione scientifica: Olga Gavrichkova, Paola Polleggioni, Michele Mattioni del CNR-IBAF e Anatoly P. Sobolev del CNR-IMC. Inoltre si ringrazia Marcello Cherubini, Giovanni De Simone e Carlo Calcapietra del CNR-IBAF, per l'organizzazione dei lavori.

BIBLIOGRAFIA

- [1] European Communities, Commission Regulation (EC) No 1989/2003 (6 November 2003) amending Regulation (EEC) No 2568/91.
- [2] L. Mannina, F. Marini, M. Gobbino, A. P. Sobolev, D. Capitani. NMR and chemometrics in tracing European olive oils: the case study of Ligurian samples. *Talanta*, 80, 2141-2148 (2010).
- [3] M. D'Imperio, M. Gobbino, A. Picanza, S. Costanzo, A. Della Corte, L. Mannina. Influence of harvest method and period on olive oil composition: an NMR and statistical study. *J. Agric. Food Chem.* 58, 11043-11051 (2010).
- [4] L. Mannina, M. Gobbino, C. Mariani, G. Bellan, V. Alessandri, D. Capitani, S. Di Ferdinando. Fingerprint of olive oils from Lazio using a widespread analytical protocol. *Riv. Ital. Sost. Grasse*. XXXVI, 15-23 (2009).
- [5] L. Mannina, M. Gobbino, V. Alessandri, D. Capitani. La risonanza magnetica nucleare e l'olio d'oliva: caratterizzazione degli oli in base all'origine geografica e alla cultivar. *Riv. Scienza dell'alimentazione*. 3, 1-13 (2008).
- [6] L. Mannina, M. Patumi, N. Proietti, D. Bassi, A. L. Segre. Geographical characterization of Italian extra virgin olive oils using high field ¹H-NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2687-2696 (2001)
- [7] P. Iacumin, L. Bernini, T. Boschetti. Climatic factors influencing the isotope composition of Italian olive oils and geographic characterisation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23, 448-454. (2009)
- [8] E. Brugnoli, M. Manieri. L'applicazione degli isotopi stabili per la rintracciabilità e la caratterizzazione geografica degli alimenti: il caso degli oli extra-vergini di oliva, Ed. CNR – GAL Trasimeno-Orvietano, (2007).
- [9] E. Brugnoli, G. D. Farquhar. Photosynthetic fractionation of carbon isotopes. In: Leegood RC, Sharkey TD and Von Caemmerer S (eds.) *Photosynthesis: physiology and metabolism*. Advances in Photosynthesis, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 399-434 (2000).
- [10] F. Angerosa, O. Bréas, S. Contento, C. Guillou, F. Raniero, E. Sada. Application of stable isotope ratio analysis to the characterization of the geographical origin of olive oils. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1013-1017 (1999)
- [11] F. Camin, R. Larcher, G. Nicolini, L. Bontempo, D. Bertoldi, M. Perini et al. Isotopic and Elemental.

Applicazione di alcuni markers di qualità per la caratterizzazione genetica e geografica degli oli extravergini di oliva italiani

ABSTRACT

Questo lavoro ha riguardato l'analisi di campioni di olio extravergine di oliva di origine italiana provenienti da diverse cultivar e zone geografiche al fine di individuare markers analitici capaci di caratterizzare i prodotti in funzione della loro origine genetica e geografica, ad implementazione di ciò che viene certificato attraverso la rintracciabilità documentale.

L'analisi statistica condotta sui dati raccolti dalle indagini sulla composizione chimica (composizione in acidi grassi, polifenoli e sostanze volatili, in particolare) ha permesso di definire alcuni parametri caratterizzanti i prodotti analizzati.

I rapporti tra i derivati dell'oleuropeina e del ligustorside e tra i lignani, nonché la composizione volatile sono stati i maggiori responsabili di tale discriminazione.

La costruzione di un set di dati molto ampio ha permesso, inoltre di individuare attraverso l'applicazione di modelli statistici specifici, le sostanze che più delle altre caratterizzavano una specifica zona di provenienza italiana.

INTRODUZIONE.

Oggi, la protezione del made in Italy in tutti i settori del food si basa sulla ricerca di un rapporto adeguato tra l'importanza della certificazione documentale e quella strumentale riferita all'origine genetica e/o geografica dei prodotti alimentari. Tale combinazione può risultare vincente, soprattutto per il caso "olio extravergine di oliva di alta qualità di origine italiana". I soli metodi basati sulla rintracciabilità documentale infatti, seppure utili a collocare le produzioni in zone piuttosto circoscritte, non sono in grado di assicurarne la qualità oggettiva e di garantirne l'assenza di frodi relative ad aggiunte di oli di diversa origine nazionale nell'olio 100% Italiano. In ogni caso, le metodologie strumentali atte a soddisfare gli obiettivi suddetti, pur avendo avuto un notevole sviluppo nell'ultimo ventennio, non sono in grado di offrire al momento, soluzioni esaustive ai problemi di tutela dell'origine varietale e geografica nell'ambito degli oli extravergini di oliva nazionali. A tale riguardo le metodologie proposte hanno compreso tecniche basate sull'utilizzo della risonanza magnetica (NMR) (1-4), l'analisi del DNA (5) o, più recentemente l'uso degli isotopi stabili del carbonio e dell'ossigeno (6, 7). Quest'ultima metodica applicata con successo in campo enologico, sembra avere un certo riscontro anche nella discriminazione dell'origine geografica degli oli in particolare, se combinata con l'analisi dei microelementi ma resta pur sempre una tecnica di cui potranno avvalersi solo gli organismi di controllo (6, 7).

E' bene pertanto, rivolgersi anche ad altre strumenti innovativi come NIR, FT-IR, sensori ad ossidi di metallo semiconduttori o PTR-MS, applicabili anche on-line, che potranno in ogni caso dare informazioni in termini di discriminazione degli oli per gruppi di provenienza geografica e/o genetica (8-15).

Questi metodi strumentali in combinazione con tecniche analitiche tradizionali comprovate, dovrebbero essere in grado di evidenziare le appartenenze delle produzioni a determinate cultivar e/o a aree di origine, facendo riferimento a dei range definiti e legati alle caratteristiche delle produzioni specifiche.

Servili M., Esposito S., Urbani S., Di Maio I., Taticchi A., Sordini B., Veneziani G., Selvaggini R.
Dipartimento di Scienze Economico-Estimative e degli Alimenti, Sezione di Tecnologie e Biotecnologie degli Alimenti, Università di Perugia, Via San Costanzo 1, 06126, Perugia, Italia.

Running title: Rintracciabilità analitica dell'olio extravergine italiano

Parole chiave: alta qualità italiana, origine genetica e geografica, markers chimici, composti fenolici e volatili



A tale riguardo si dovrà porre l'attenzione su alcuni componenti degli oli extravergini di oliva che, in accordo con quanto riportato in letteratura, evidenziano una buona potenzialità nella differenziazione dei prodotti sulla base dell'origine genetica o geografica (11-14).

Questo lavoro permetterà di "costruire" un database di valori di specifici markers analitici risultanti sia da analisi molecolari sia da metodi tradizionali (es. composizione acidica, fenolica, volatile ecc...) che consentano, una volta affiancati alla rintracciabilità documentale, di validare la qualità e l'origine delle produzioni di olio 100% Italiano.

Al fine di costruire tale set di dati, la selezione dei suddetti markers dovrebbe essere effettuata mettendo a punto dei protocolli operativi che, a livello strumentale, permettano di avere conformità delle produzioni ottenute in una particolare zona olivicola nazionale, mediante il confronto con campioni di olio di origine certa, estratti da olive ottenute dalla stessa area ed in condizioni controllate.

In questo modo, con il susseguirsi delle campagne olearie, la banca dati permetterebbe di garantire l'origine geografica e genetica degli oli extravergini di alta qualità certificati ed allo stesso tempo, rappresenterebbe una buona base per la validazione delle produzioni tipiche.

SCOPO.

Con la seguente attività si sono analizzati alcuni importanti markers strumentali dell'olio extravergine come gli acidi grassi, ma soprattutto le sostanze fenoliche e volatili, che oltre ad avere un forte impatto sulla qualità salutistica e sensoriale, vedono nell'origine genetica/geografica del frutto, una grande influenza sulla loro composizione quali-quantitativa nel prodotto finale (11-14).

La loro analisi avrà lo scopo pertanto, di conferire robustezza e spessore ai sistemi di tracciabilità documentale già operanti sulla base dei disciplinari di produzione dell'olio 100% Italiano e delle diverse D.O.P.

Materiali e Metodi

Oli extravergini di oliva

I campioni di oli extravergini di oliva di produzione nazionale sono stati scelti in funzione dell'importanza produttiva delle aree geografiche di provenienza e poi, implementati durante il secondo anno di attività (Tabella 1).

I campioni sono stati prelevati dal personale tecnico di UNAPROL ed in parte procurati dal personale del Dipartimento di Scienze Economico-Estimative e degli Alimenti dell'Università di Perugia.

Standards

L'idrossitirosolo (3,4-DHPEA) veniva acquistato da Cayman Chemicals Ltd. (Ann Arbor, MI) e il tirosolo (p-HPEA) da Janssen Chemical Co. (Beerse, Belgio).

Le forme dialdeidiche dell'acido elenolico legate a 3,4- DHPEA e p-HPEA (3,4-DHPEA-EDA e p-HPEA-EDA, rispettivamente), l'isomero dell'oleuropeina aglicone (3,4-DHPEA-EA), i lignani (+)-1- acetossipinoresinolo e (+)-pinoresinolo venivano estratti dall'olio usando una procedura precedentemente pubblicata (15). In breve, i polifenoli venivano estratti usando metanolo/acqua 80:20 v/v. Dopo evaporazione e purificazione dell'estratto crudo ottenuto dall'olio, la separazione dei composti avveniva tramite cromatografia liquida semipreparativa (HPLC), usando una colonna semipreparativa 9.4 mm i.d. x 500 mm Whatman Partisil 10 ODS. La fase mobile era composta da acido acetico 0.2% in acqua (pH 3.1) (A)/metanolo (B) ad un flusso di 6.5 mL/min. La valutazione dei polifenoli era effettuata usando un detector a fotodiodi (DAD) (16).

La purezza di tutte le sostanze ottenute dalla estrazione diretta veniva testata attraverso HPLC, e la loro struttura chimica era verificata tramite NMR usando le stesse condizioni riportate in

lavori precedenti (16).

Gli standard analitici puri dei composti volatili valutati erano acquistati da Fluka e Aldrich (Milano, Italia).

Tabella 1. Quantità di campioni di olio extravergine per regione.

Regione	Campagna 2009/2010	Campagna 2010/2011
Lombardia	21	10
Liguria	-	2
Veneto	-	2
Toscana	-	1
Umbria	8	1
Lazio	13	41
Marche	-	19
Abruzzo	-	18
Molise	7	1
Campania	-	19
Basilicata	-	3
Puglia	12	26
Calabria	13	25
Sicilia	5	13
Sardegna	1	7

ANALISI SUGLI OLI EXTRAVERGINI DI OLIVA

Composti fenolici

Estrazione dei composti fenolici. L'estrazione della frazione fenolica dall'olio è stata eseguita secondo quanto riportato da Montedoro et al., (17) e Selvaggini et al. (18), rispettivamente.

In breve, l'estrazione della frazione fenolica avveniva secondo questa procedura: 45 grammi di olio venivano omogeneizzati (per 2 volte). Seguiva una centrifugazione a 5000 rpm per 10 minuti (per 2 volte). Seguiva l'evaporazione completa del solvente. Successivamente si effettuava la solubilizzazione del residuo con 5 ml di metanolo. Il solvente veniva fatto evaporare completamente e l'estratto veniva mantenuto a -20°C fino al momento dell'iniezione in HPLC.

Dosaggio dei composti fenolici. L'estratto fenolico proveniente dall'olio prima dell'analisi HPLC, veniva ripreso con 1 ml di metanolo e poi filtrato. L'analisi dei composti fenolici veniva eseguita per HPLC secondo quanto riportato in Montedoro et al., (17) con l'unica differenza introdotta nell'utilizzo di una colonna separativa Spherisorb ODS1 250 x 4,6 mm con diametro delle particelle di 5 µm termostata a 25°C (Phase Separation Ltd., Deeside, U.K.).

Per la valutazione dei lignani si usava sempre la colonna sopra riportata.

Per quanto concerne la strumentazione HPLC, veniva usato il sistema mod 1100 (Agilent Technologies) composto da pompa quaternaria completa di degasatore, autocampionatore, comparto colonne termostatato, rivelatore a fotodiodi UV-Vis e rivelatore di fluorescenza, il tutto controllato dal sistema operativo "ChemStation 2" (Palo Alto CA. USA), con il quale è stata eseguita anche l'elaborazione dei dati cromatografici.

Il dosaggio dei composti fenolici veniva effettuato iniettando 20 µL di campione. La fase mobile era composta da acido acetico 0.2% (pH 3.1) in acqua (solvente A)/metanolo (solvente B) ad un flusso di un 1 mL/min. Il gradiente veniva modificato come di seguito: 95% A/5% B per 2 min, 75% A/25% B per 8 min, 60% A/40% B per 10 min, 50% A/50% B per 16 min, e 0% A/100% B per 14 min. Tale composizione veniva mantenuta per 10 minuti poi ritornava a



un'iniziale condizione di equilibrio per 13 min; il tempo totale di corsa era di 73 minuti. I lignani venivano valutati con fluorimetro operante ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 280 nm e di emissione di 339 (18), mentre gli altri composti venivano valutati tramite detector a fotodiodi ad una lunghezza d'onda di 280 nm (18).

Composti volatili

La composizione in sostanze volatili degli oli veniva effettuata tramite analisi gascromatografia applicata alla spettrometria di massa (GC/MS) attraverso campionamento dello spazio di testa con Microestrazione in Fase Solida (SPME).

L'elenco dei composti volatili valutati qualitativamente e quantitativamente con questa tecnica è riportato in Tabella 2.

Microestrazione in fase solida (SPME). Il campionamento SPME veniva eseguito esponendo la fibra in carboxen/divinilbenzene/polidimetilsilossano (50/30 µm di spessore, 1 cm di lunghezza (Supelco, Inc., Bellefonte, PA, U.S.A.) per 30 minuti, nello spazio di testa del campione mantenuto a 35 °C. I composti adsorbiti venivano fatti poi desorbire ponendo la fibra per 5 minuti nell'iniettore, mantenuto costantemente a 250 °C (20).

Analisi gascromatografica applicata alla spettrometria di massa (GC/MS). Le analisi venivano condotte con un GC/MS mod. 4000 GC/MS/MS (Varian, Walnut Creek, CA, U.S.A.) composto da iniettore PTV mod. CP-1079 (Varian, Walnut Creek, CA, U.S.A.), munito di inserto per SPME con diametro interno di 0.75 mm, ed autocampionatore mod. CP-8410 termostato (Varian, Walnut Creek, CA, U.S.A.). Per la separazione dei composti si usava una colonna capillare in silice fusa DB-Wax-ETR avente una lunghezza di 50 m, un I.D. di 0,32 mm ed uno spessore del film di 1mm (J & W Scientific, Folsom, CA, U.S.A.). Come gas di trasporto veniva utilizzato elio ad un flusso di 1.7 mL/min, mantenuto costante durante il tempo di analisi, tramite un dispositivo di controllo elettronico del flusso (EFC). La temperatura del forno GC era impostata secondo il seguente programma: temperatura iniziale 35 °C, mantenuta per 8 min, poi aumentata fino a 45 °C con un incremento di 1,5 °C/min, aumentata ulteriormente fino a 150 °C con un incremento di 3 °C/min, aumentata ancora fino a 180 °C/min con un incremento di 4 °C/min ed infine portata a 210 °C, con un incremento di 3,6 °C/min e mantenuta su questi livelli per 14,51 min; con tali condizioni, il tempo totale dell'analisi era di 80 min. La temperatura dell'analizzatore a trappola ionica dello spettrometro di massa era 150 °C mentre quella della transfer line era di 170 °C. La ionizzazione era di tipo elettronico. Lo spettro di massa veniva registrato con un'energia di ionizzazione di 70 eV, nell'intervallo di massa 25-350 a.m.u. con una frequenza di 1,27 Hz. L'iniettore veniva impostato ad una temperatura di 250 °C.

L'identificazione dei composti volatili veniva effettuata confrontando gli spettri di massa ed i tempi di ritenzione così ottenuti con quelli di standards analitici puri, quando disponibili, e con gli spettri della libreria NIST-05; altrimenti il confronto veniva eseguito solo tra gli spettri dei suddetti composti e quelli della citata libreria (19).

Composizione acidica

La valutazione di acidità libera, numero di persossidi, costanti spettrofotometriche e degli acidi grassi (espressi come percentuale sul totale) è stata effettuata secondo quanto indicato dal metodo ufficiale UE n.1989/03 (20).

L'analisi sensoriale è stata condotta secondo quanto riportato dal vigente Regolamento UE e dal Consiglio Oleicolo Internazionale (C.O.I.) (21, 22).

Ad eccezione della composizione acidica, i dati delle altre analisi suddette sono stati esclusivamente utilizzati nell'elaborazione statistica tramite PCA (Analisi delle Componenti Principali).

Analisi FT-IR

I campioni venivano analizzati mediante uno spettrofotometro di assorbimento infrarosso a trasformata di Fourier (FT-IR) Bruker modello IF 28 (Bruker OptiK GMBH, Ettingen Germany), acces-

Tabella 2. Lista dei composti volatili dell'olio vergine di oliva campionati tramite SPME.

<u>ALDEIDI</u>	<u>ALCOLI</u>	<u>CHETONI</u>	<u>ESTERI</u>
esanale	Metanolo	3-pentanone	etil acetato
2-pentnale	Etanolo	1-penten-3-one	esil acetato
4-pentnale	1-propanolo	6-metil-5-epten-2-one	3-esenil acetato
eptanale	2-metil-1-propanolo	acetofenone	4-esenil acetato (c)
3-esenale (c)	3-pentanolo	2-ottanone	2-esenil acetato (f)
2-esenale (t)	1-butanolo	3,5-ottadien-2-one	metil salicilato
ottanale	1-penten-3-olo		etil caprilato
2-eptenale (f)	2-metil-1-butanolo		etil caprato
nonanale	3-metil-1-butanolo	<u>IDROCARBURI</u>	
2-ottanale (f)	1-pentanolo	benzene	<u>FENOLI</u>
2,4-eptadienale (f, t)	2-penten-1-olo (t)	3-etil-1,5-ottadiene	fenolo
decanale	2-penten-1-olo (c)	3-etil-1,5-ottadiene (i)	
benzaldeide	1-esanolo	toluene	
2-nonenale (f)	3-esen-1-olo (f)	1,1-dimetil-2-(1-metil-2-propenil)-ciclopropano	<u>COMPOSTI ALOGENATI</u>
pentanale	3-esen-1-olo (c)	1,1-dimetil-2-(2-metil-2-propenil)-ciclopropano (i)	cloroformio
2,4-eptadienale (i)	2-esen-1-olo (t)	etilbenzene	tetracloroetilene
1,2-cicloesano-dicarbossilaldeide	2-esen-1-olo (c)	p-xilene	
etilbenzaldeide	1-eptanolo	o-xilene	
	2-etil-1-esanolo	m-xilene	
<u>COMPOSTI ETEROCICLICI</u>	1-ottanolo	1,2,4-trimetilbenzene	
<u>CONTENENTI OSSIGENO</u>	1-esen-3-olo	1-decene	
tetraidrofurano	alcool benzilico	1,3,7-ottatriene	
2-pentilfuran	alcool fenil-etilico	stirene	
benzofurano	fenolo	1,2,3-trimetilbenzene	
5-etildiidro-2(3H)-furanone		limonene	
2-metilbenzofurano		2,4-nonadiene (f,t)	
<u>ACIDI LIBERI</u>		p-cimene	
acido acetico		dietossietano	
acido formico		(2-metil-1-propenil) benzene	
acido propionico		(2-metil-1-propenil) benzene (i)	
acido butirrico		1 (cicloesilmetil)-4-isopropilcicloesano	
		alfa-farnesene	
		naftalene	

soriato di sfera di rifletenza con ATR ricoperta da cristalli di seleniuro di zinco. Le misure venivano condotte sui campioni di olio tal quale in rifletenza nel range spettrale 600-400 cm⁻¹ con una risoluzione spettrale di 1 cm⁻¹. I dati di rifletenza ottenuti dalle misurazioni sono stati convertiti in assorbanze (23).

Analisi statistica

I risultati analitici della parte più rappresentativa degli oli extravergini di oliva campionati, sono stati elaborati mediante l'analisi statistica multivariata ed in particolare l'Analisi delle Componenti Principali (PCA) utilizzando il pacchetto chemiometrico "SIMCA-P+v.12.0.1" (Umetrics, Umeå, Svezia). Per il modellamento di alcune variabili, esse sono state preventivamente trasformate logaritmicamente per ottenere delle distribuzioni che si avvicinassero il più possibile a quella gaussiana. Successivamente, tutte le variabili sono state normalizzate, mediante sottrazione della media dai valori, e scalate alla varianza unitaria, dividendo questi risultati per la deviazione standard (Autoscaling). I risultati del modello PCA sono presentati in forma grafica: lo score plot dei campioni mostra la similarità (cluster) o dissimilarità degli oggetti (campioni di olio extravergine); invece il loading plot delle variabili mostra la loro rilevanza e correlazione nelle componenti.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Composizione fenolica

L'analisi dei composti fenolici è stata condotta in quanto, come premesso, è ben noto che il contenuto fenolico del frutto dell'oliva e dei relativi oli è fortemente influenzato da variabili di natura genetica ed agroambientale.

Le frazioni fenoliche, analizzate tramite HPLC, erano i fenil alcoli 3,4-DHPEA e p-HPEA, i derivati



dei secoiridoidi glucosidi oleuropeina, demetiloleuropeina e ligustroside (3,4-DHPEA-EDA, 3,4-DHPEA-EA e p-HPEA-EDA) ed i lignani ((+)-pinosresinolo e (+)-1-acetossipinosresinolo).

I risultati analitici a riguardo permettono di fare alcune considerazioni circa la caratterizzazione degli oli prodotti: i primi dati ottenuti, non hanno permesso di indicarli come potenziali markers dell'origine, data la forte variabilità a livello tecnologico con cui questi oli venivano prodotti (Tabelle 3 e 4, Figura 1). Un elemento di sicuro interesse è invece rappresentato dalla valutazione dei lignani (+)-pinosresinolo e (+)-1-acetossipinosresinolo, sia in termini di concentrazioni assolute che di rapporti percentuali tra le due forme. Questi composti sono stati studiati come indice discriminante l'origine varietale da alcuni ricercatori spagnoli (24, 25) ed il loro rapporto è stato proposto per la caratterizzazione delle loro principali cultivar dato che sono molecole alquanto stabili e scarsamente influenzate da variabili agronomiche, come maturazione del frutto o irrigazione e/o variabili tecnologiche adottate in frangitura, gramolatura o durante l'estrazione propriamente detta (Tabelle 3 e 4, Figura 1).

I risultati ottenuti durante un primo screening, evidenziano anche per i nostri campioni, una sensibile variabilità in base all'origine genetica e geografica del prodotto. Il rapporto tra (+)-pinosresinolo e (+)-1-acetossipinosresinolo discrimina infatti, gli oli "siciliani" da quelli del centro-nord Italia e dagli oli "pugliesi" (Tabelle 3 e 4, Figura 2).

Al fine di approfondire questo aspetto, su altri campioni provenienti dalle stesse aree e da altre zone italiane prodotti durante la campagna olearia 2010/2011, è stato effettuato lo stesso screening, rielaborando i dati anche attraverso i rapporti.

A conferma di quanto detto sopra, i valori delle frazioni fenoliche di 3,4-DHPEA-EDA, 3,4 DHPEA-EA e p-HPEA-EDA mostrati nelle Tabelle 5 e 6, evidenziano una forte differenziazione anche tra campioni provenienti dallo stesso areale, sottolineando che i derivati dei secoiridoidi non pos-

Tabella 3. Variabilità della composizione fenolica (mg/kg) degli oli extravergini di oliva provenienti da diverse aree geografiche (campagna olearia 2009/2010)^z.

†	Lombardia	Umbria		Lazio	Molise	
	Casaliva	Moraiolo	Peranzana	Itrana	Peranzana	Leccino
3,4-DHPEA ^z	2,9 ± 0,1	0,3 ± 0,0	5,1 ± 0,8	0,6 ± 0,05	11,0 ± 0,6	6,9 ± 0,6
p-HPEA	5 ± 0,4	2,6 ± 0,1	10,0 ± 1,6	2,8 ± 0,1	18,0 ± 1,1	4,5 ± 0,3
3,4-DHPEA-EDA	262,8 ± 6,8	284,7 ± 11,5	175,6 ± 11,5	143,6 ± 4,2	187,2 ± 7,9	194,6 ± 8,2
p-HPEA-EDA	132,9 ± 3,3	161,6 ± 19,8	60,9 ± 9,3	26,1 ± 0,9	43,1 ± 2,2	54,6 ± 2,7
3,4-DHPEA-EA	206,7 ± 9,2	253,6 ± 6,0	12,4 ± 0,1	82,2 ± 3,2	10,1 ± 0,4	10,6 ± 0,4
(+)-1-acetossipinosresinolo	14,9 ± 0,8	14,4 ± 0,1	21,5 ± 1,1	15,6 ± 1,4	13,5 ± 0,5	14,2 ± 0,6
(+)-pinosresinolo	10,1 ± 0,8	16,7 ± 9,5	70,7 ± 8,4	29,9 ± 1,1	88,4 ± 5,3	105,9 ± 6,4
Somma frazioni fenoliche	635,3 ± 11,9	733,3 ± 25,5	356,1 ± 17,2	300,9 ± 5,8	371,5 ± 9,8	391,4 ± 10,8

^z Le cultivar indicate sono quelle prevalenti del blend; gli oli lombardi provengono dalla provincia di Brescia, gli umbri dalla provincia di Perugia, i laziali dalla provincia di Latina, i molisani dalla provincia di Campobasso. I valori medi sono la risultante della determinazione su tre campioni ciascuno replicato in doppio ± la deviazione standard.

Tabella 4. Variabilità della composizione fenolica (mg/kg) degli oli extravergini di oliva provenienti da diverse aree geografiche (campagna olearia 2009/2010)^z.

	Puglia			Calabria		Sicilia		
	Coratina	Ogliarola	Peranzana	Carolea 1	Carolea 2	Nocellara	Biancolilla	Cerasuola
3,4-DHPEA ^z	4,6 ± 0,3	3,4 ± 0,3	3,8 ± 0,3	10,1 ± 0,3	4,0 ± 0,03	1,5 ± 0,2	0,7 ± 0,1	3,0 ± 0,3
p-HPEA	8,8 ± 0,6	7,5 ± 0,7	5,7 ± 0,5	16,0 ± 0,2	9,1 ± 0,1	8,8 ± 0,5	1,9 ± 0,3	8,6 ± 0,7
3,4-DHPEA-EDA	373,3 ± 33,3	90,0 ± 8,0	63,2 ± 6,2	159,4 ± 6,0	139,7 ± 4,7	204,9 ± 4,7	103,0 ± 3,7	202,9 ± 5,8
p-HPEA-EDA	233,7 ± 20,4	67,2 ± 5,9	44,7 ± 4,4	44,6 ± 1,2	35,0 ± 0,3	52,4 ± 4,8	41,7 ± 3,2	83,8 ± 6,5
3,4-DHPEA-EA	256,1 ± 21,4	185,7 ± 16,6	135,0 ± 13,4	79,1 ± 3,1	113,7 ± 1,6	76,7 ± 6,8	64,4 ± 4,2	106,0 ± 8,8
(+)-1-acetossipinosresinolo	14,3 ± 0,7	15,7 ± 1,4	16,2 ± 1,4	21,7 ± 0,5	23,3 ± 0,4	31,7 ± 2,1	46,6 ± 3,3	29,9 ± 2,2
(+)-pinosresinolo	21,2 ± 1,1	27,3 ± 2,4	22,6 ± 2,0	79,1 ± 3,1	28,7 ± 0,3	119,2 ± 7,5	103,1 ± 6,5	165,2 ± 10,1
Somma frazioni fenoliche	912,0 ± 44,6	396,7 ± 19,6	291,2 ± 15,6	409,9 ± 7,6	353,5 ± 5,0	495,2 ± 12,3	361,3 ± 9,8	599,5 ± 16,6

^z Le cultivar indicate sono quelle prevalenti del blend; gli oli lombardi provengono dalla provincia di Brescia, gli umbri dalla provincia di Perugia, i laziali dalla provincia di Latina, i molisani dalla provincia di Campobasso. I valori medi sono la risultante della determinazione su tre campioni ciascuno replicato in doppio ± la deviazione standard.



Figura 1. Rapporto tra i derivati dell'oleuropeina (somma di 3,4-DHPEA, 3,4-DHPEA-EDA e 3,4-DHPEA-EA) e del ligustroside (somma di p-HPEA e p-HPEA-EDA) (campagna olearia 2009/2010).

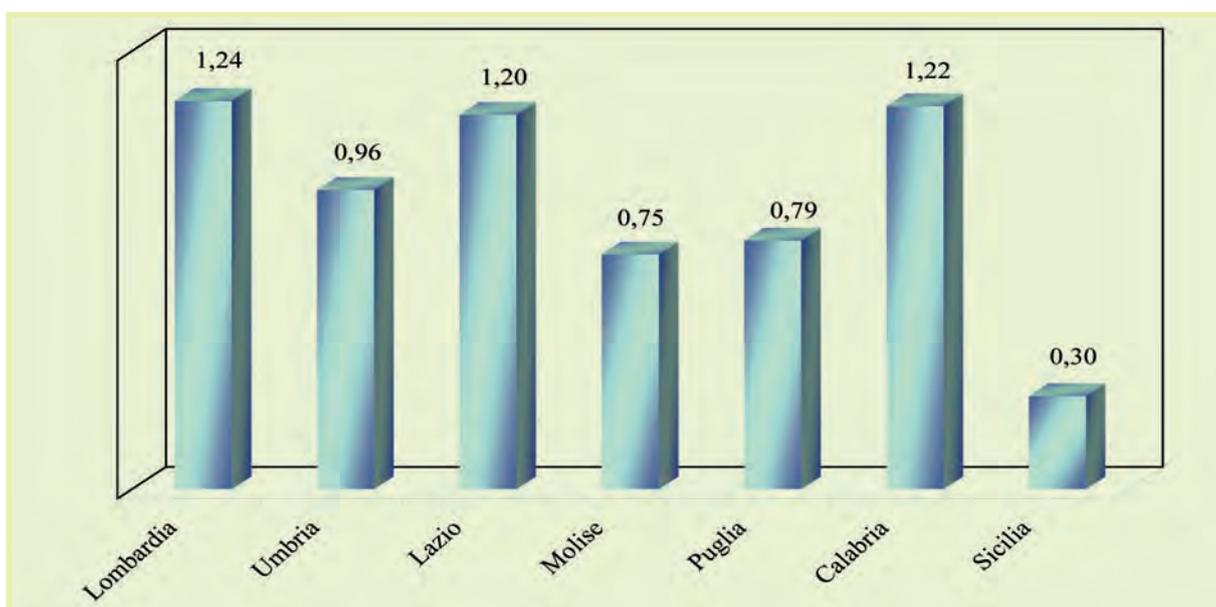


Figura 2. Rapporto tra i lignani (+)-1-acetossipinoresinolo e (+)-pinoresinolo (campagna olearia 2009/2010).

sono essere considerati un valido indice dell'origine geografica del prodotto, data la notevole variabilità che queste sostanze manifestano al variare di condizioni genetiche, pedo-climatiche, agronomiche e tecnologiche (Tabelle 5 e 6).

Tuttavia come evidenzia la Figura 3 il rapporto tra i derivati dell'oleuropeina e quelli del ligustroside, ci permette di individuare delle interessanti differenze da attribuire, in parte, alla diversa provenienza geografica degli oli, seppure tali differenziazioni dovranno essere ulteriormente approfondite attraverso l'analisi delle forme isomeriche dei sopracitati composti. Grazie alle importanti e significative premesse ottenute analizzando gli oli della campagna 2009/2010 (Tabelle 3 e 4 e Figura 2), si è focalizzato l'analisi sui lignani degli oli extravergini di oliva della nuova campagna (Tabelle 5 e 6) ed in particolare, sui rapporti tra i due composti (Figura 4).

A conferma di quanto detto precedentemente, la valutazione di (+)-pinoresinolo e (+)-1-acetossipinoresinolo, sembra rappresentare un valido mezzo di discriminazione del prodotto in funzione della sua origine geografica: il contenuto di questi, infatti in termini di rapporto tra i due composti, è piuttosto simile tra gli oli "siciliani" ed i "sardi" e molto diverso tra questi e gli oli



provenienti da centro e nord Italia. Tale rapporto risulta essere sensibile per discriminare anche gli oli lombardi, marchigiani e laziali da quelli provenienti dalle altre regioni italiane, quali Puglia, Calabria e Campania (Figura 4).

Tabella 5. Variabilità della composizione fenolica (mg/kg) degli oli extravergini di oliva provenienti da diverse aree geografiche (campagna olearia 2010/2011)^z.

	Lombardia	Marche		Lazio			Abruzzo		
	Brescia	Ancona	Macerata	Latina	Rieti	Roma	Frosinone	Teramo	Pescara
3,4-DHPEA	3,0 ± 3,1	0,5 ± 1,0	8,0 ± 0,3	19,4 ± 0,4	3,8 ± 0,0	9,3 ± 0,2	1,2 ± 1,3	12,6 ± 0,7	2,0 ± 0,1
p-HPEA	7,1 ± 1,9	1,5 ± 1,0	5,7 ± 0,2	16,9 ± 0,2	8,2 ± 0,0	12,2 ± 0,3	2,5 ± 0,2	9,5 ± 0,6	3,5 ± 0,1
3-4 DHPEA-EDA	246,1 ± 2,8	104,4 ± 1,0	135,4 ± 8,3	280,3 ± 12,3	163,0 ± 2,6	232,3 ± 6,5	107,4 ± 3,7	232,3 ± 6,5	113,2 ± 5,5
p-HPEA-EDA	72,4 ± 2,3	33,1 ± 1,0	35,5 ± 0,4	53,0 ± 0,7	31,6 ± 0,7	36,6 ± 0,2	20,3 ± 1,1	47,0 ± 0,7	30,5 ± 0,6
3-4 DHPEA-EA	159,2 ± 3,7	41,5 ± 1,0	71,9 ± 1,3	138,6 ± 4,8	119,0 ± 4,3	177,2 ± 5,5	82,1 ± 3,7	260,3 ± 9,6	74,3 ± 3,6
(+)-1-acetossipinoresinolo	21,1 ± 0,3	9,7 ± 0,9	20,9 ± 3,4	26,1 ± 0,4	29,7 ± 2,2	41,0 ± 0,3	15,9 ± 0,9	39,5 ± 1,2	14,5 ± 0,4
(+)-pinoresinolo	17,0 ± 0,7	5,6 ± 0,7	14,4 ± 0,7	37,3 ± 0,7	21,5 ± 0,3	25,2 ± 0,3	13,9 ± 0,3	21,7 ± 0,3	7,4 ± 0,2
Somma delle frazioni fenoliche	526,1 ± 7,0	196,3 ± 2,7	291,7 ± 12,3	571,6 ± 18,1	376,9 ± 6,2	533,8 ± 10,7	243,2 ± 6,7	622,8 ± 13,4	245,4 ± 8,7

^z I risultati rappresentano la media di 10 campioni per la Lombardia, 10 per le Marche, 20 per il Lazio e 13 per l'Abruzzo, ciascuno analizzato in doppio ± la deviazione standard.

Tabella 6. Variabilità della composizione fenolica (mg/kg) degli oli extravergini di oliva provenienti da diverse aree geografiche (campagna olearia 2010/2011)^z.

	Campania		Puglia		Calabria		Sicilia	Sardegna		
	Benevento	Salerno	Barletta-Andria-Trani	Taranto	Lecce	Cosenza	Catanzaro	Agrigento	Sassari	Cagliari
3,4-DHPEA	10,1 ± 0,0	10,1 ± 0,1	9,2 ± 0,3	2,9 ± 0,1	3,4 ± 0,3	6,4 ± 0,9	16,7 ± 0,9	9,0 ± 0,5	9,4 ± 0,6	0,9 ± 0,0
p-HPEA	21,0 ± 0,1	21,0 ± 0,1	15,9 ± 0,4	4,5 ± 0,1	6,5 ± 0,2	8,0 ± 1,1	13,9 ± 1,3	12,5 ± 0,6	31,9 ± 0,1	3,1 ± 0,0
3-4 DHPEA-EDA	298,0 ± 6,2	298,0 ± 3,5	430,2 ± 10,5	239,0 ± 2,2	222,2 ± 2,8	214,9 ± 14,0	151,6 ± 6,0	109,9 ± 6,3	124,2 ± 3,5	81,8 ± 2,8
p-HPEA-EDA	49,3 ± 1,7	49,3 ± 0,3	165,2 ± 3,1	53,3 ± 0,4	58,5 ± 0,5	68,1 ± 0,1	26,5 ± 1,3	29,3 ± 1,4	51,2 ± 1,1	39,3 ± 0,4
3-4 DHPEA-EA	135,7 ± 2,4	135,7 ± 1,0	321,1 ± 4,7	171,2 ± 4,9	165,8 ± 4,2	38,1 ± 2,9	51,4 ± 0,9	14,7 ± 1,0	6,3 ± 0,9	7,0 ± 0,1
(+)-1-acetossipinoresinolo	26,7 ± 1,5	26,7 ± 0,2	49,2 ± 4,4	13,1 ± 0,3	20,5 ± 0,4	20,7 ± 0,4	22,0 ± 1,3	28,2 ± 0,8	13,9 ± 0,8	18,5 ± 0,1
(+)-pinoresinolo	11,6 ± 1,2	11,6 ± 0,1	23,1 ± 0,5	20,1 ± 0,7	16,9 ± 0,5	126,6 ± 5,4	131,7 ± 5,4	62,6 ± 5,5	76,1 ± 1,9	50,5 ± 0,6
Somma delle frazioni fenoliche	552,3 ± 9,5	552,3 ± 5,0	1013,8 ± 16,6	504,1 ± 5,8	493,9 ± 5,9	482,8 ± 20,8	413,9 ± 10,3	266,2 ± 10,6	313,1 ± 5,5	201,2 ± 4,1

^z I risultati rappresentano la media di 10 campioni per la Campania, 17 per la Puglia, 10 per la Calabria, 8 per la Sicilia e 6 per la Sardegna, ciascuno analizzato in doppio ± la deviazione standard.

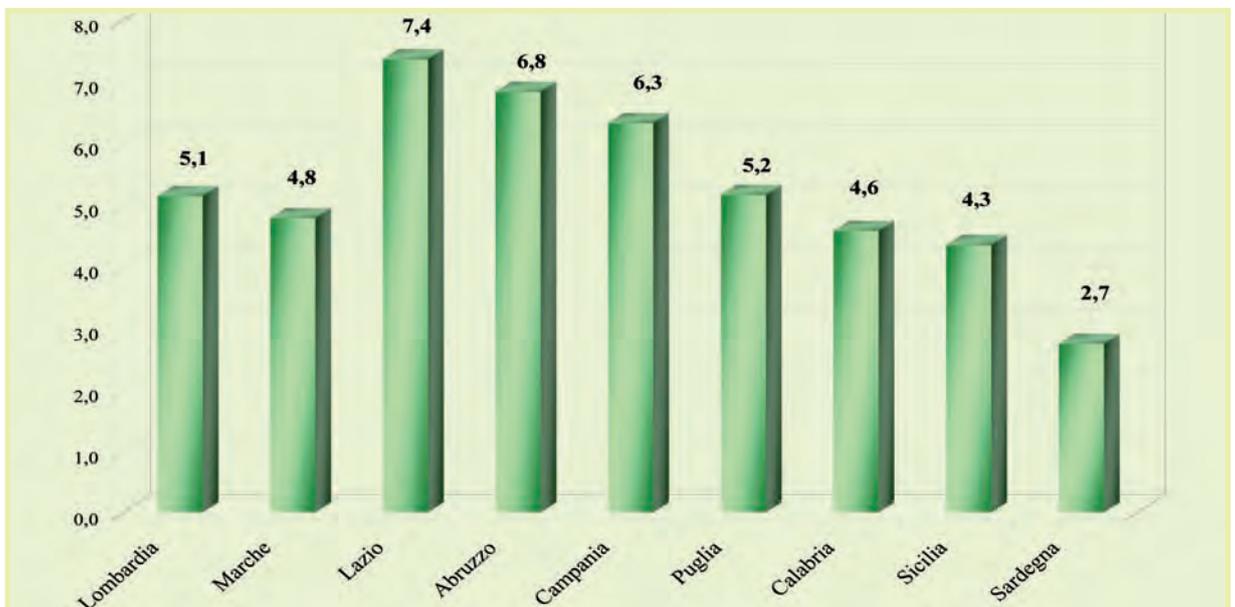


Figura 3. Rapporto tra i derivati dell'oleuropeina (somma di 3,4-DHPEA, 3,4-DHPEA-EDA e 3,4-DHPEA-EA) e del ligustroside (somma di p-HPEA e p-HPEA-EDA) (campagna olearia 2010/2011).

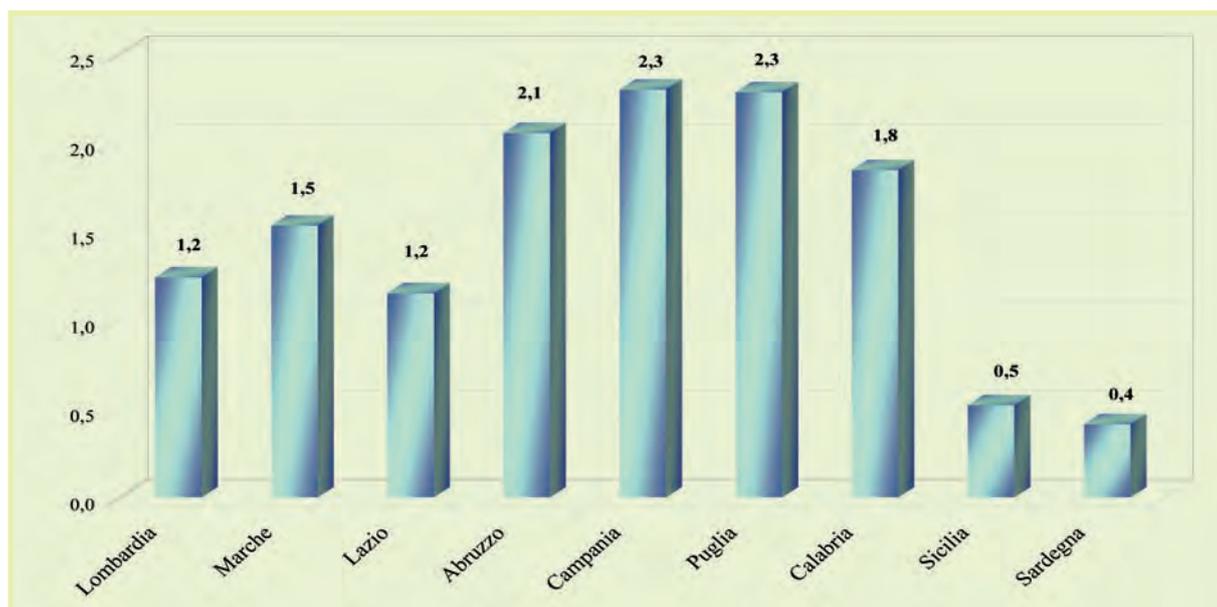


Figura 4. Rapporto tra i lignani (+)-1-acetossipinoresinol e (+)-pinoresinol (campagna olearia 2010/2011).

Composizione acidica

Gli acidi grassi dell'olio extravergine di oliva, oltre ad avere un'importante funzione salutistica (26) scaturiscono interesse anche dal punto di vista della caratterizzazione genetica e geografica. L'acido oleico (acido grasso a 18 atomi di carbonio con un solo punto di insaturazione, con riconosciute funzioni nutrizionali) è il componente più importante sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo. La percentuale su totale, oscilla tra il 56% e l'85%, in funzione di peculiari condizioni climatiche e varietali: è cosa nota, ad esempio, che gli oli provenienti da zone a clima caldo presentino contenuti in acido oleico inferiori a quelli di aree geografiche caratterizzate da climi freddi (14, 26).

A tale scopo è stata effettuata un'ampia indagine sulla composizione acidica dei campioni a disposizione provenienti da zone eterogenee del territorio italiano, attraverso la quale si è potuto constatare che i diversi acidi grassi e principalmente gli acidi oleico, palmitico e linoleico, mostrano ottime potenzialità nel discriminare i campioni in relazione all'origine delle drupe, ed ancor più se si considerano i prodotti di certa origine monovarietale; nel caso in cui si era di fronte a miscele, invece tale peculiarità è risultata meno evidente (Tabelle 7 e 8).

L'analisi statistica sulla composizione acidica valutata come somma degli acidi grassi saturi (SFA), monoinsaturi (MUFA), polinsaturi (PUFA) e acido oleico singolarmente, permette di valutare me-

Tabella 7. Variabilità della composizione acidica (%) degli oli extravergini da diverse cultivar ed aree geografiche^z.

	Lombardia	Umbria		Lazio			Molise	
	Casaliva	Peranzana	Moraiolo	Itrana	Canino	Blend	Peranzana	Leccino
Acido tridecanoico	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Acido miristico	0,07 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Acido cis -10-pentadecenoico	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,07	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,05 ± 0,08	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,00 ± 0,00
Acido palmitico	12,74 ± 0,33	13,37 ± 1,20	13,90 ± 0,26	12,83 ± 0,28	14,17 ± 1,06	15,67 ± 2,80	14,37 ± 1,20	13,67 ± 0,89
Acido palmitoleico	1,27 ± 0,32	1,11 ± 0,25	0,79 ± 0,16	0,71 ± 0,02	1,14 ± 0,16	1,62 ± 0,38	1,21 ± 0,25	1,28 ± 0,12
Acido margarico	0,04 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,15 ± 0,23	0,11 ± 0,17	0,11 ± 0,02	0,04 ± 0,03
Acido eptadecenoico	0,10 ± 0,01	0,08 ± 0,03	0,08 ± 0,02	0,08 ± 0,00	0,08 ± 0,03	0,10 ± 0,00	0,07 ± 0,03	0,08 ± 0,00
Acido stearico	1,87 ± 0,09	1,93 ± 0,01	1,80 ± 0,11	1,92 ± 0,08	1,93 ± 0,09	1,81 ± 0,16	1,83 ± 0,01	1,86 ± 0,11
Acido oleico	76,54 ± 0,21	75,30 ± 2,30	74,99 ± 1,22	77,35 ± 1,33	75,19 ± 1,05	70,56 ± 4,68	91,66 ± 2,30	75,30 ± 2,27
Acido linoleico	6,06 ± 0,57	6,93 ± 1,10	6,93 ± 0,51	5,71 ± 0,12	5,93 ± 0,54	8,87 ± 1,76	7,27 ± 1,10	6,41 ± 1,20
Acido linolenico	0,61 ± 0,00	0,51 ± 0,07	0,74 ± 0,02	0,73 ± 0,05	0,61 ± 0,07	0,61 ± 0,08	0,41 ± 0,07	0,61 ± 0,04
Acido arachico	0,33 ± 0,04	0,31 ± 0,05	0,30 ± 0,04	0,36 ± 0,04	0,31 ± 0,03	0,32 ± 0,08	0,33 ± 0,05	0,28 ± 0,00
Acido eicosenoico	0,30 ± 0,07	0,21 ± 0,00	0,27 ± 0,03	0,24 ± 0,01	0,31 ± 0,07	0,28 ± 0,04	0,22 ± 0,00	0,25 ± 0,01
Acido behenico	0,07 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,12 ± 0,07	0,05 ± 0,04	0,11 ± 0,02	0,07 ± 0,00

^z Le cultivar indicate sono quelle prevalenti del blend: gli oli lombardi provengono dalla provincia di Brescia, gli umbri dalla provincia di Perugia, i laziali dalla provincia di Latina, i molisani dalla provincia di Campobasso. I valori medi sono la risultante della determinazione su tre campioni ciascuno replicato in doppio ± la deviazione standard.



Tabella 8. Variabilità della composizione acidica (%) degli oli extravergini da diverse cultivar ed aree geografiche^z

	Puglia			Calabria		Sicilia		
	Coratina	Ogliarola	Peranzana	Carolea 1	Carolea 2	Nocellara	Biancolilla	Cerasuola
Acido tridecanoico	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Acido miristico	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Acido cis -10-pentadecenoico	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Acido palmitico	12,98 ± 0,65	14,20 ± 0,71	12,87 ± 0,64	14,11 ± 2,02	13,44 ± 0,02	15,59 ± 1,09	16,94 ± 1,19	15,22 ± 1,07
Acido palmitoleico	0,50 ± 0,03	0,51 ± 0,03	0,49 ± 0,04	1,30 ± 0,21	1,33 ± 0,00	0,36 ± 0,03	1,28 ± 0,09	0,89 ± 0,00
Acido margarico	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,06 ± 0,00
Acido eptadecenoico	0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,24 ± 0,10	0,23 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,08 ± 0,01
Acido stearico	2,20 ± 0,11	1,48 ± 0,07	2,00 ± 0,20	2,17 ± 0,26	1,93 ± 0,00	3,13 ± 0,22	3,11 ± 0,22	2,89 ± 0,20
Acido oleico	75,94 ± 3,80	72,13 ± 3,61	73,70 ± 3,85	73,45 ± 0,52	73,03 ± 1,01	69,58 ± 5,57	69,20 ± 5,54	71,51 ± 5,72
Acido linoleico	6,63 ± 0,33	10,20 ± 0,51	9,20 ± 0,66	7,08 ± 2,05	8,31 ± 0,01	9,56 ± 0,67	7,80 ± 0,55	7,90 ± 0,52
Acido linolenico	0,72 ± 0,04	0,63 ± 0,03	0,76 ± 0,04	0,76 ± 0,10	0,83 ± 0,00	0,63 ± 0,04	0,84 ± 0,06	0,74 ± 0,02
Acido arachico	0,40 ± 0,02	0,41 ± 0,03	0,39 ± 0,02	0,35 ± 0,04	0,34 ± 0,00	0,45 ± 0,03	0,44 ± 0,03	0,41 ± 0,02
Acido eicosenoico	0,39 ± 0,02	0,32 ± 0,02	0,35 ± 0,02	0,26 ± 0,01	0,29 ± 0,00	0,41 ± 0,03	0,16 ± 0,01	0,25 ± 0,02
Acido behenico	0,13 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,13 ± 0,04	0,11 ± 0,00	0,14 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,00

^z Le cultivar indicate sono quelle prevalenti del blend: gli oli pugliesi provengono dalle province di Bari e Foggia, i calabresi dalla provincia di Cosenza, i siciliani dalla provincia di Palermo. I valori medi sono la risultante della determinazione su tre campioni ciascuno replicato in doppio ± la deviazione standard.

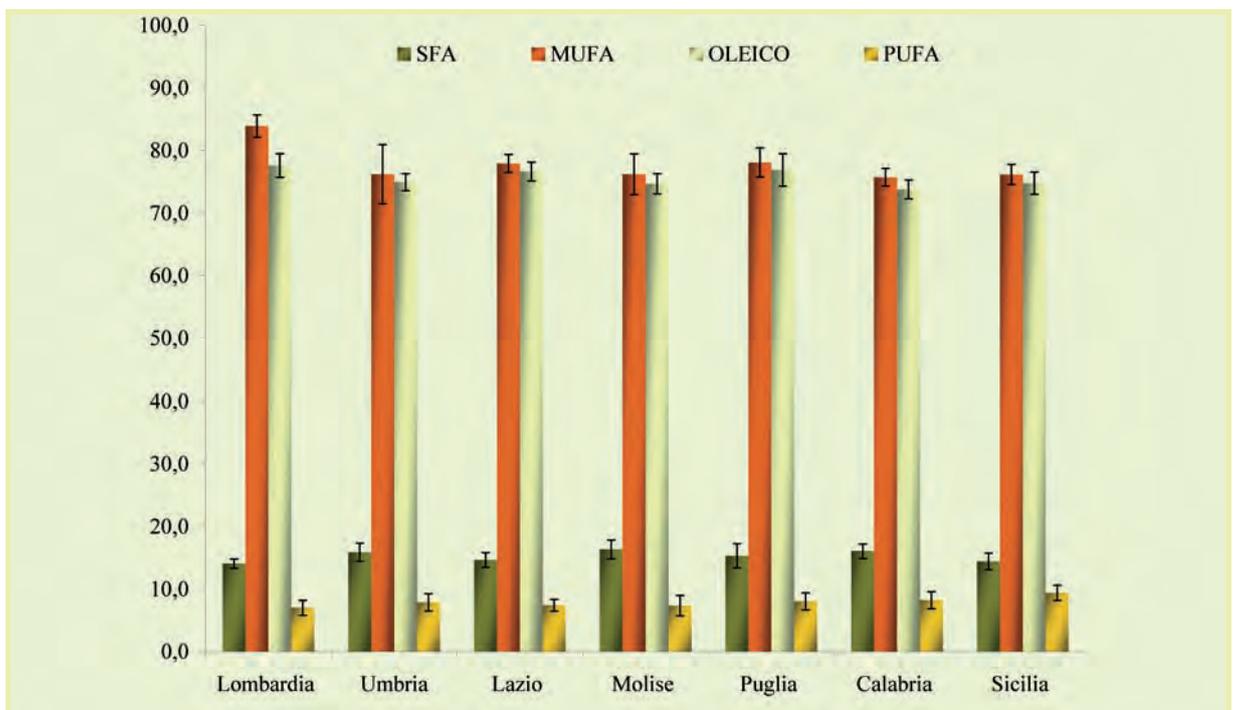


Figura 5. Composizione acidica valutata sui campioni di olio extravergine di oliva provenienti da diverse regioni italiane.

glio la potenzialità di queste sostanze nel differenziare i prodotti in relazione all'origine geografica (Figura 5). Questo è vero soprattutto per quel che riguarda il contenuto in MUFA, mostrando una sensibile differenza tra oli lombardi e calabresi, ad esempio, variazione questa che, valutando unicamente i rapporti tra derivati del ligustroside e dell'oleuropeina, soprattutto negli oli della prima campagna olearia, non era risultata così evidente.

Da questo screening analitico si evince che, diverse sono le componenti chimiche da prendere in considerazione per avere una visione più ampia della differenza qualitativa degli oli extravergini italiani in base alla loro origine genetica e/o geografica.

Composti volatili

Non meno importanti per il nostro lavoro, sono le componenti volatili che caratterizzano l'aroma dell'olio extravergine di oliva. Esse sono principalmente aldeidi, alcoli ed esteri a 5 e 6 atomi di carbonio che prendono origine dall'attività (sugli acidi grassi di membrana linoleico e linolenico) degli enzimi del pool della lipossigenasi i cui livelli sono geneticamente definiti, ma le loro attività

e di conseguenza, la produzione delle sostanze suddette, sono fortemente influenzate dalla cultivar, da peculiari condizioni pedoclimatiche, nonché da numerosi fattori tecnologici.

Diversi lavori scientifici condotti dal nostro gruppo di ricerca in merito, hanno evidenziato che il più importante contributo alla diversità aromatica è apportato dalla cultivar di appartenenza e, data la differenziata distribuzione varietale delle nostre aree produttive, tali sostanze possono rappresentare un valido marker dell'origine genetica del prodotto (11, 12). Nella Tabella 9 si riportano le valutazioni quali-quantitative dei composti volatili dello spazio di testa di alcuni oli extravergini di oliva provenienti dal Sud-Italia.

Come si può osservare, anche nell'ambito dello stesso areale, si ha una discreta variabilità da attribuire alla cultivar di appartenenza. Questo aspetto è ancora più evidente negli istogrammi di Figura 6 dove oltre a notare una sensibile differenza nei contenuti di aldeidi, alcoli ed esteri anche tra varietà dello stesso areale, come ad esempio la maggiore quantità di aldeidi degli oli extravergini di oliva di Cv. Coratina rispetto a quello delle Cv. Ogliarola e Peranzana, da un confronto tra i due istogrammi riferiti agli oli pugliesi (a) e a quelli siciliani (b), si può notare anche una certa influenza geografica da ricondurre alla presenza esclusiva dell'aldeide 3-Esenale (Z) in tutte e tre le varietà dei prodotti siciliani, e che molti autori hanno associato alla tipica sensazione olfattiva di pomodoro (27), che risulta totalmente assente nei prodotti pugliesi (a).

Tabella 9. Variabilità della composizione volatile ($\mu\text{g}/\text{kg}$) degli oli extravergini provenienti dalla Puglia e dalla Sicilia^z.

	Puglia			Sicilia					
	Coratina	Ogliarola	Peranzana	Nocellara	Biancolilla	Cerasuola			
ALDEIDI									
Esanale	931,0 \pm 56.8	1897,8 \pm 93.8	1626,7 \pm 70.3	691,3 \pm 84.4	651,8 \pm 71.2	226,1 \pm 40.0			
2-Pentenale (E)	185,7 \pm 22.04	71,5 \pm 5.7	80,7 \pm 3.0	174,6 \pm 14.6	169,2 \pm 27.0	80,6 \pm 16.9			
2-Esenale (E)	102338,3 \pm 1096.0	19636,7 \pm 722.5	30523,3 \pm 762.6	7771,8 \pm 3645.0	7832,3 \pm 966.5	7539,8 \pm 716.8			
3-Esenale (Z)	-	-	-	594,8	296.4	798,4	59.9	172,7	25.9
ALCOLI									
1-Penten-3-olo	523,8 \pm 30.7	364,2 \pm 9.5	848,2 \pm 38.4	616,2 \pm 52.9	784,1 \pm 74.8	442,5 \pm 46.4			
1-Pentanolo	25,8 \pm 12.1	50,5 \pm 2.9	39,0 \pm 1.1	192,0 \pm 34.4	318,9 \pm 36.4	299,6 \pm 28.9			
2-Penten-1-olo (E)	381,7 \pm 22.5	331,0 \pm 6.6	562,7 \pm 22.6	605,0 \pm 64.8	715,7 \pm 104.5	602,9 \pm 75.1			
1-Esanolo	3400,0 \pm 57.0	2951,7 \pm 199.3	1704,8 \pm 59.2	5932,7 \pm 864.3	3775,7 \pm 358.2	7144,3 \pm 549.2			
3-Esen-1-olo (E)	11,3 \pm 19.8	12,2 \pm 1.2	12,0 \pm 1.4	126,0 \pm 18.6	148,2 \pm 17.0	113,0 \pm 7.7			
3-Esen-1-olo (Z)	328,3 \pm 21.5	181,2 \pm 7.5	1103,8 \pm 42.6	11671,0 \pm 2573.8	9857,2 \pm 952.5	4984,9 \pm 345.7			
2-Esen-1-olo (E)	4572,8 \pm 93.4	4795,5 \pm 504.3	2520,7 \pm 48.4	6040,7 \pm 323.5	4895,9 \pm 612.3	9712,4 \pm 543.5			
ESTERI									
Esil acetato	12,9 \pm 7.1	22,5 \pm 3.8	1927,5 \pm 41.5	16,6 \pm 25.7	28,3 \pm 0.0	946,4 \pm 236.2			
3-Esenil acetato (Z)	29,8 \pm 2.6	7,3 \pm 1.4	3064,0 \pm 169.1	487,1 \pm 33.3	983,4 \pm 52.9	743,2 \pm 36.0			

^z Le cultivar indicate sono quelle prevalenti del blend: gli oli pugliesi provengono dalle province di Bari e Foggia, e i siciliani, dalla provincia di Palermo. I valori medi sono la risultante della determinazione su tre campioni ciascuno replicato in doppio \pm la deviazione standard.



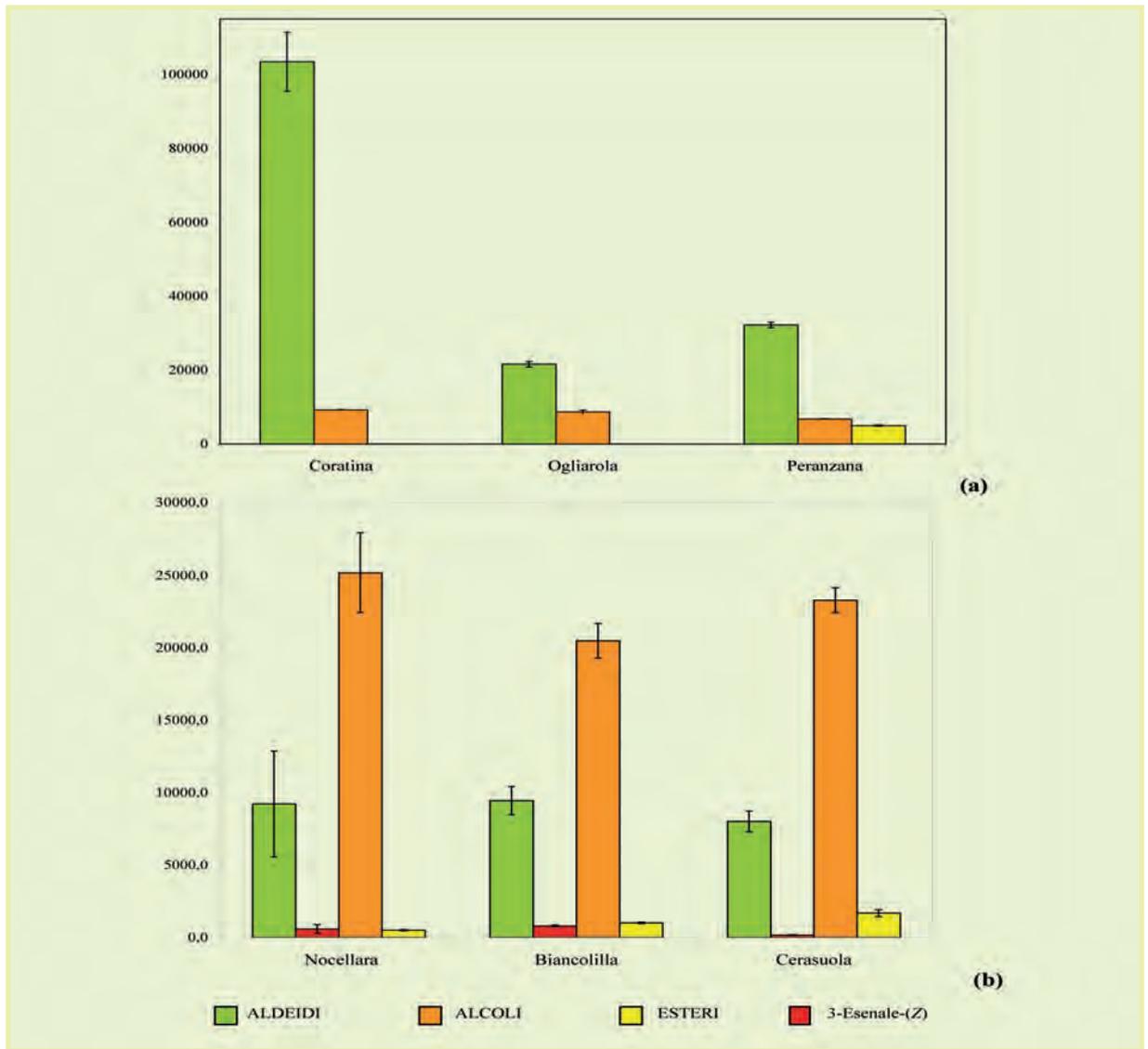


Figura 6. Contenuto in aldeidi, alcoli ed esteri degli oli extravergini di oliva di tipiche cultivar pugliesi (a) e siciliane (b).

Analisi statistica multivariata

Analisi FT-IR

Da una preliminare elaborazione statistica multivariata effettuata unicamente sui dati ottenuti dall'analisi FT-IR condotta su un ridotto campione degli oli extravergini raccolti durante le due campagne olearie, si è ottenuto un modello con sei componenti principali significative che spiega complessivamente il 90% della varianza totale dei dati; con le prime tre componenti in particolare, si spiega il 72% di tale variabilità (prima componente 45%, seconda componente 15% e terza componente 12%). In Figura 7 si osserva una discreta discriminazione degli oli calabresi rispetto agli altri, lungo la prima componente (da sinistra verso destra), mentre lungo la seconda componente (dal basso verso l'alto), si nota una certa separazione degli oli lombardi dal restante gruppo (Figura 7a); infine contrapponendo la terza contro la prima componente, si osserva lungo la terza componente, seppur minima, una differenziazione del cluster degli oli molisani da quello dei pugliesi (Figura 7b).

Dal loading plot relativo allo score plot della Figura 7 (Figura 8a), si osservano alti valori negativi dei loadings, corrispondenti alle zone dello spettro IR in cui si registrano i maggiori assorbimenti da parte degli oli calabresi, a 2922 cm⁻¹, 2854 cm⁻¹, 1744 cm⁻¹ (essendo in questo numero d'onda dove si registra il maggior peso discriminante) e nel range 761-700 cm⁻¹ (con il valore minimo a 720 cm⁻¹); dalla parte dei valori positivi dei loadings si riscontrano elevati poteri discriminanti nelle due zone che vanno da 1424 cm⁻¹ a 1182 cm⁻¹ (con massimo a 1216 cm⁻¹) e

da 1138 cm⁻¹ a 977 cm⁻¹ (con massimo a 1043 cm⁻¹). Nella seconda componente (Figura 8b) alti valori di loadings positivi si osservano ai numeri d'onda localizzati a 2921 cm⁻¹ e 2854 cm⁻¹. Alti valori negativi di loadings si osservano invece nei minimi corrispondenti a 1758 cm⁻¹, 1733 cm⁻¹, 1365 cm⁻¹, 1227 cm⁻¹, 1217 cm⁻¹ e 720 cm⁻¹. Per finire nella terza componente (Figura 8c) alti valori di loadings positivi si osservano ai numeri d'onda localizzati a 2924 cm⁻¹, 1740 cm⁻¹, 1735 cm⁻¹ e 1725 cm⁻¹, in cui gli oli pugliesi hanno i maggiori assorbimenti. Alti valori negativi di loadings si osservano invece nei minimi corrispondenti a 1172 cm⁻¹ e 722 cm⁻¹, in cui assorbono maggiormente gli oli molisani.

Da questo primo screening, in conclusione è possibile affermare che la tecnica FT-IR, molto veloce e che non prevede manipolazione del campione, ha mostrato buone capacità discriminanti in termini di origine geografica dei oli extravergini di oliva, certamente ottimizzabile e più attendibile, aumentando il numero di campioni del data set.

Analisi statistica multivariata applicata a differenti componenti chimiche

Visti l'eterogeneità dei dati raccolti, le numerose analisi chimiche condotte e l'elevato potenziale di alcune delle componenti chimiche studiate (acidi grassi, composti fenolici e volatili, in particolare) nel fornire indicazioni importanti sull'origine genetica e geografica dei relativi oli extra-

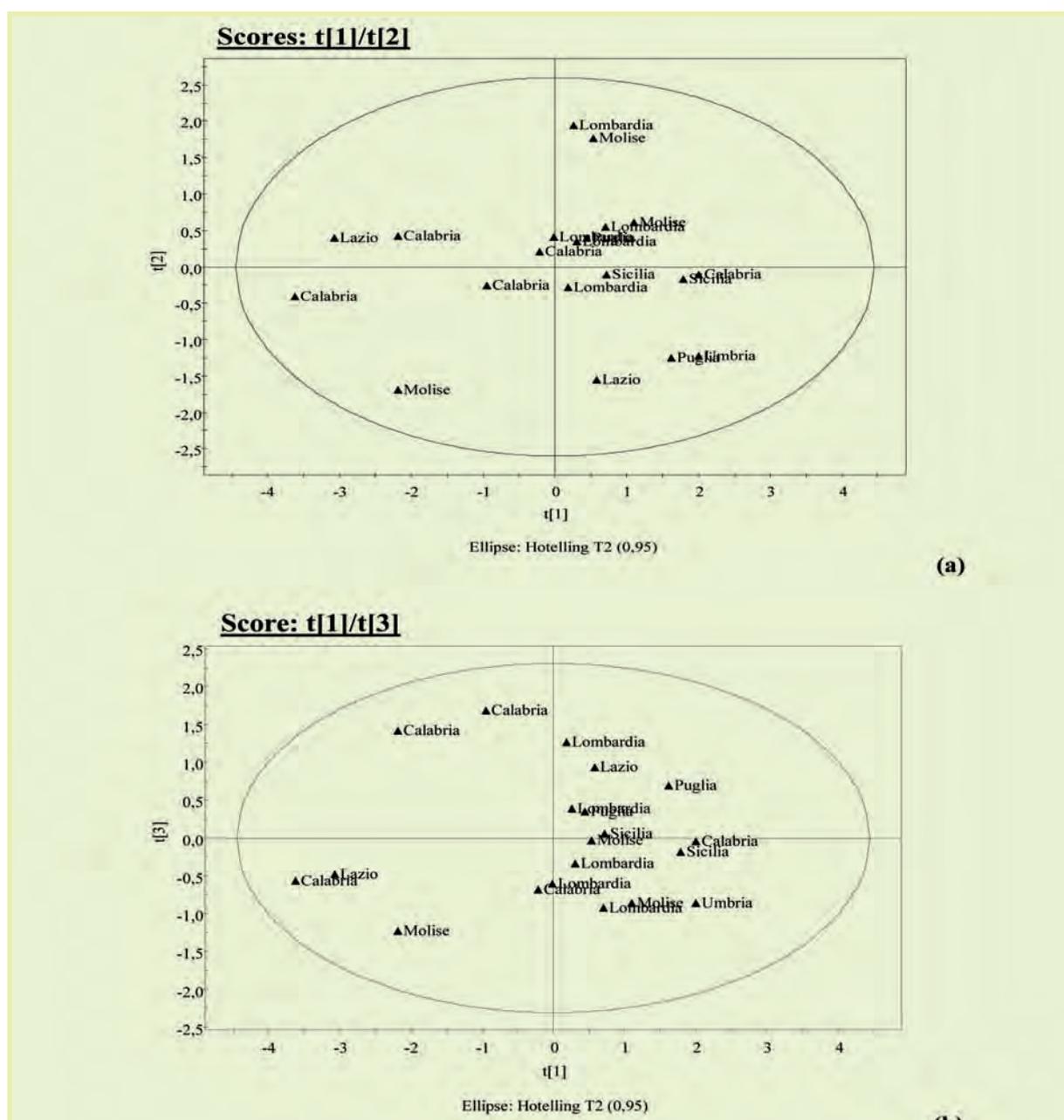


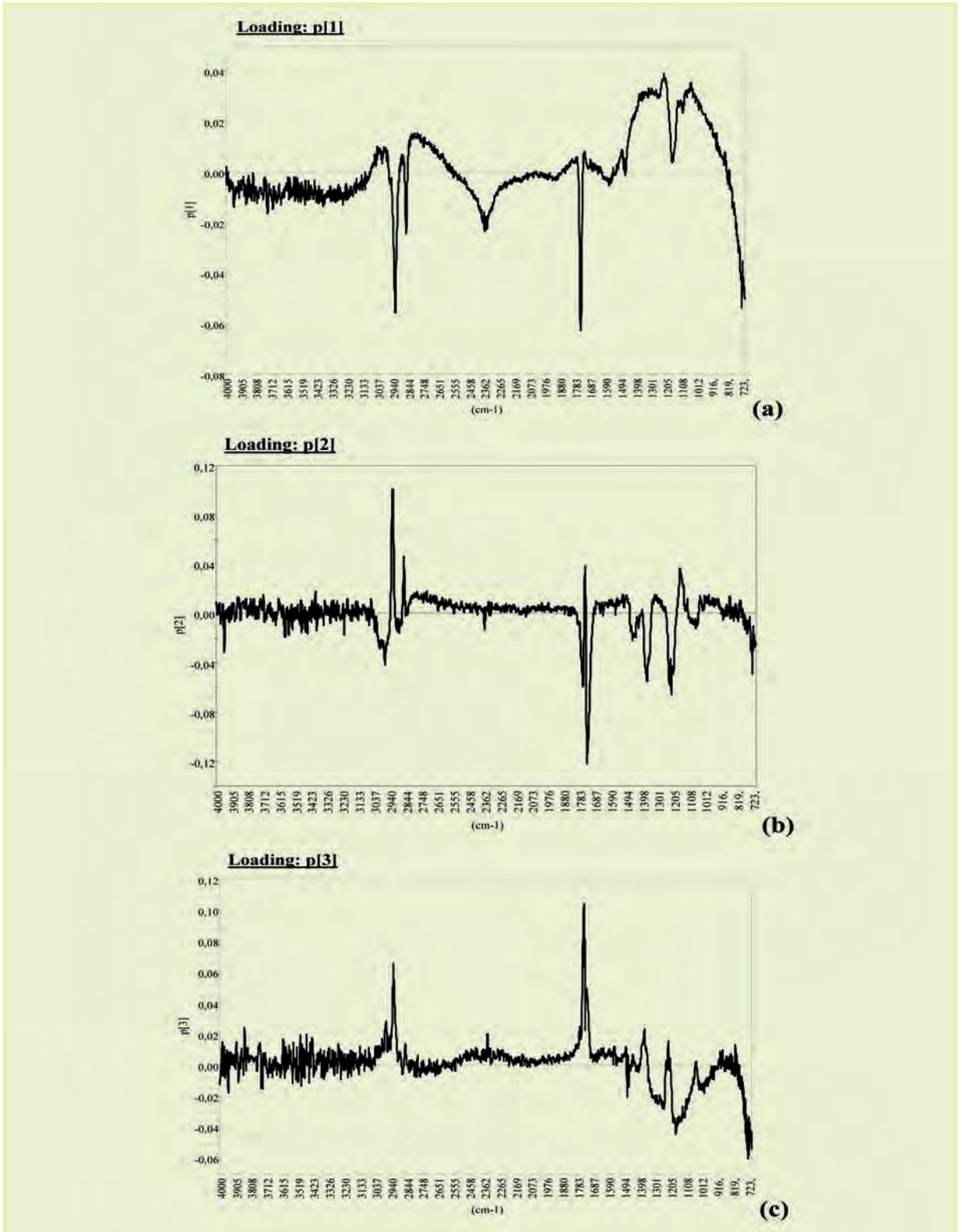
Figura 7. Score plots delle prime due componenti principali (a) e della terza vs. prima componente principale (b) del modello PCA costruito con tutti i campioni e tutte le variabili (frequenze IR).



vergini di oliva, si è applicata un'analisi chemiometrica multivariata al fine di estrapolare le maggiori informazioni possibili circa la capacità discriminante delle sostanze chimiche analizzate, quali markers della tipicità.

Per la nostra attività si è effettuata l'analisi delle componenti principali (PCA), perché permette di suddividere i campioni di partenza in gruppi omogenei rispetto a una serie di variabili (componenti chimiche) scelte dal ricercatore permettendo di individuare anche eventuali out-liers (campioni che per proprie caratteristiche chimiche non appartengono a nessun gruppo) e di eliminare informazioni ridondanti.

In base a queste considerazioni è stato costruito un modello statistico con 234 campioni di olio



provenienti da 13 regioni italiane (Sardegna, Sicilia, Calabria, Puglia, Basilicata, Campania, Molise, Abruzzo, Lazio, Marche, Umbria, Veneto e Liguria), e quindici variabili (acidità libera, numero di perossidi, K232, K270, polifenoli totali, fruttato, amaro, pungente, acido palmitoleico, eptadecanoico, eptadecenoico, stearico, oleico, linoleico, arachico). Il modello suddetto spiega il 73% della varianza totale (25, 18, 11, 10, e 9%, rispettivamente per I, II, III, IV e V componente).

I risultati mostrati nello score plot di Figura 9a evidenziano quattro gruppi di campioni e precisamente: quello collocato in basso a sinistra costituito dagli oli provenienti da Lazio, Marche e Abruzzo, quello in alto a sinistra costituito principalmente da oli pugliesi, quello in alto a destra dai sardi e quello in basso a destra dai calabresi; tra questi ultimi tre clusters si collocano i campioni siciliani.

Le altre regioni essendo caratterizzate da scarsa numerosità di oggetti (oli), non possono essere sufficientemente caratterizzate.

Dal relativo loading plot (Figura 9b) si evince che, lungo la prima componente gli oggetti sulla

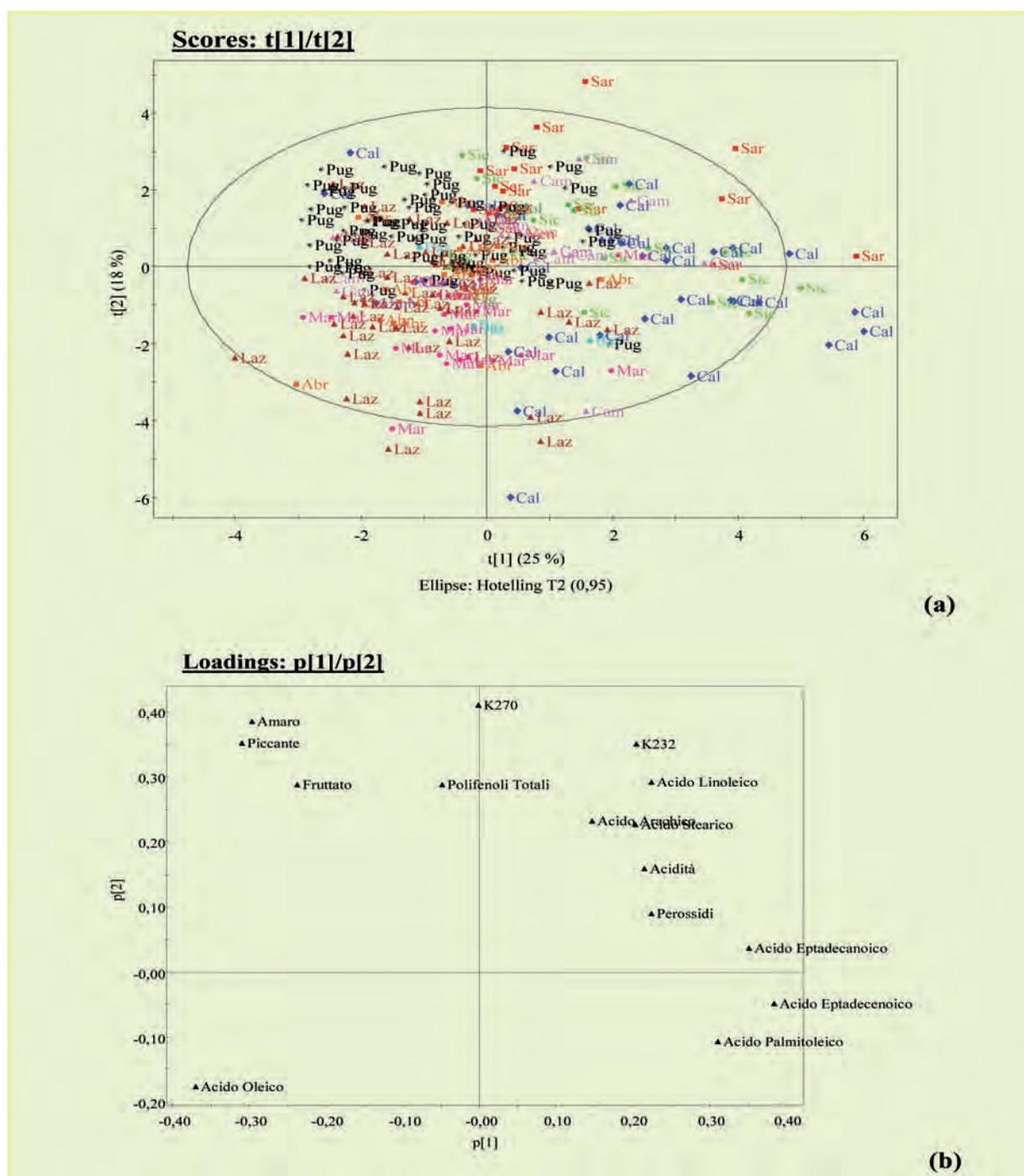


Figura 9. Score plot (a) e relativo loading plot (b) dell'analisi PCA di oli extravergini di oliva (234 campioni) provenienti da diversi areali italiani. Legenda regioni: Sar: Sardegna; Sic: Sicilia; Cal: Calabria; Pug: Puglia; Bas: Basilicata; Cam: Campania; Mol: Molise; Abr: Abruzzo; Laz: Lazio; Mar: Marche; Umb: Umbria; Ven: Veneto; Lig: Liguria.



sinistra dello score plot sono caratterizzati da maggiori concentrazioni di acido oleico e bassi valori di acido eptadecenoico, eptadecanoico e palmitoleico, mentre lungo la seconda componente, i campioni dello score plot collocati in alto (oli pugliesi in particolare), presentano più alti valori in polifenoli totali, e in punteggio ottenuto all'analisi sensoriale per i descrittori di fruttato, amaro e pungente (questi ultimi due notoriamente correlati al contenuto in polifenoli degli stessi prodotti).

Sulla base della bassa numerosità dei campioni provenienti da alcune regioni è stato costruito un altro modello PCA con 172 oggetti e sfruttando le stesse variabili.

Esso spiega complessivamente il 66% della varianza totale dei dati (in particolare la varianza spiegata da ciascuna delle componenti è rispettivamente il 27, il 18, il 12, ed il 9%).

Dallo score plot di Figura 10a si evidenzia in maniera più netta quanto descritto per il precedente modello (Figura 9a), con una maggiore separazione delle "nuvole" rappresentanti ciascuna una definita zona geografica.

Il relativo loading plot (Figura 10b) appare sostanzialmente invariato rispetto al precedente (Figura 9b), eccetto che nella parte superiore della seconda componente principale dove si ha una maggiore importanza degli acidi arachico e stearico.

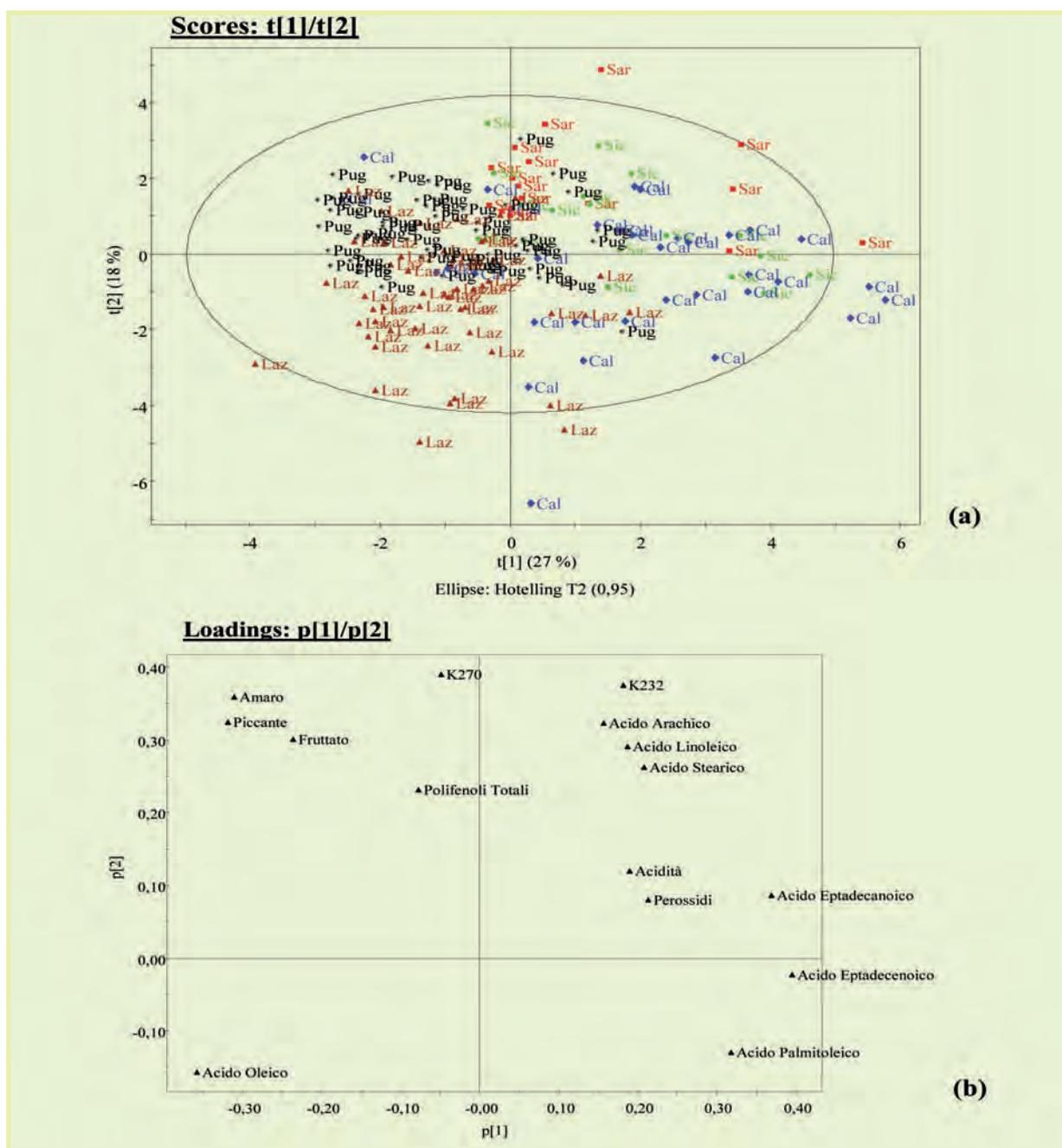


Figura 10. Score plot (a) e relativo loading plot (b) dell'analisi PCA di oli extravergini di oliva (172 campioni) provenienti da diversi areali italiani. Legenda regioni: Sar: Sardegna; Sic: Sicilia; Cal: Calabria; Pug: Puglia; Laz: Lazio.

CONCLUSIONI

I primi approcci alla definizione di parametri analitici validanti la rintracciabilità documentale degli oli italiani di alta qualità hanno permesso di evidenziare degli aspetti promettenti relativi all'analisi di alcuni importanti costituenti chimici degli oli extravergini di oliva come gli acidi grassi ed i composti fenolici e volatili quali markers dell'origine genetica e geografica del prodotto.

Il nostro lavoro approfondito su diverse campagne olearie ha permesso di intravedere, soprattutto in alcune variazioni quantitative dei lignani e dei secoiridoidi, degli utili parametri di riferimento per la caratterizzazione.

Riguardo la composizione volatile, le analisi dello spazio di testa effettuate sugli oli "pugliesi" e "siciliani" validate da ricerche precedenti a questo lavoro, hanno evidenziato che l'origine dell'aroma degli oli extravergini di oliva, di natura strettamente enzimatica, dipende fortemente dalla cultivar di appartenenza e dall'origine geografica del frutto; un loro coinvolgimento nell'ambito della rintracciabilità analitica degli oli certificati IOO, risulterà pertanto utile.

I primi risultati sull'applicazione di strumenti come lo FT-IR, anche se devono essere validati da ulteriori indagini, sono comunque interessanti e permettono di rivolgere l'interesse verso quel settore della strumentazione on-line che potrebbe in tempi rapidi, dare risposte significative circa la differenziazione dei prodotti "oli extravergini di oliva di alta qualità", in funzione della loro origine.

Infine, l'analisi statistica multivariata ci ha dimostrato che con un congruo data set e con l'applicazione di modelli statistici validi (es. PCA o altre tecniche di cluster analysis) che descrivano chimicamente oli extravergini di oliva di tutto l'areale italiano, sarà certamente possibile avere informazioni attendibili riguardo la "storia" del prodotto.

RINGRAZIAMENTI

Il lavoro è stato eseguito con il contributo di UNAPROL nell'ambito del Programma di attività ai sensi del Reg. CE n. 867/2008. Progettazione, realizzazione e gestione di sistemi di controllo del rispetto delle norme di autenticità, qualità e commercializzazione dell'olio di oliva e delle olive da mensa immessi sul mercato.

Si ringraziano i responsabili delle Aziende aderenti al progetto per aver fornito i campioni di olio extravergine di oliva.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Angerosa F., Bréas O., Contento S., Guillou C., Reniero F., Sada E. Application of stable isotope ratio analysis to the characterization of the geographical origin of olive oils. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1013-1017 (1999).
- (2) Vlahov G. Application of NMR to the study of olive oils progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy 35, 341-357 (1999).
- (3) Mannina L., Patumi M., Proietti N., Bassi D., Segre A. L. Geographical characterization of Italian extra virgin olive oils using high-field ¹H NMR spectroscopy. *Analytica Chim. Acta* 552, 13-24 (2005).
- (4) Alonso-Salces R.M., Héberger K., Holland M.V., Moreno-Rojas J.M., Mariani C., Bellan G., Reniero F., Guillou C. Multivariate analysis of NMR fingerprint of the unsaponifiable fraction of virgin olive oils for authentication purposes. *Food Chem.* 118, 956-965 (2010).
- (5) Pasqualone A., Montemurro C., Caponio Francesco, Blanco A. Identification of virgin olive oil from different cultivars by analysis of DNA microsatellites. *J. Agric. Food Chem.* 52, 1068-1071 (2004).
- (6) Camin F., Larcher R., Nicolini G., Bontempo L., Bertoldi D., Perini M., Schlicht C., Schellenberg A., Thomas F., Heinrich K., Voerkelius S., Horacek M., Ueckermann H., Froeschl H., Wimmer B., Heiss G., Baxter M., Rossmann A., Hoogewerff J. Isotopic and elemental data for tracing the origin of european olive oils. *J. Agric. Food Chem.* 58, 570-577 (2010).
- (7) Camin F., Larcher R., Perini M., Bontempo L., Bertoldi D., Gagliano G., Nicolini G., Versini G. Characterization of authentic Italian extra-virgin olive oils by stable isotope ratios of C, O and H and mineral composition. *Food Chem.* 118, 901-909 (2010).



- (8) Luykx Dion M.A.M., van Ruth S. M. An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chem.*, 107, 897–911 (2008).
- (9) Ping L., Yongming C., Yong H. Identification of geographical origin of olive oil using visible and Near-Infrared Spectroscopy technique combined with chemometrics. *Food Bioprocess Technol.* 5, 235–242 (2012).
- (10) Woodcock T., Downey Gerard O'Donnell C. P. Confirmation of declared provenance of European extra virgin olive oil samples by NIR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 56, 11520–11525 (2008).
- (11) Angerosa, F., Servili M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposto, S., Montedoro, GF. Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *J. Chromatogr. A.*, 1054, 17-31 (2004).
- (12) Servili M., Esposto S., Taticchi A., Urbani S. Di Maio I., Sordini B., Selvaggini R., Montedoro GF., Angerosa F. "Volatile compounds of virgin olive oil: their importance in the sensory quality". In *Advances in Olive Resources*, Berti L. and Maury J. Eds., pp. 45-77 (2009).
- (13) Servili, M., Selvaggini R., Esposto, S., Taticchi A., Montedoro, GF., Morozzi, G. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *J. Chromatogr. A.* 1054, 113-127 (2004).
- (14) Inglese P., Famiani F., Galvano F., Servili M., Esposto S., Urbani S. Factors affecting extra virgin olive oil composition. *Horticultural Rev.* 38, 83-148 (2010).
- (15) Bellincontro A., Taticchi A., Servili M., Esposto S., Farinelli D., Mencarelli F. Non-destructive evaluation of phenolic compounds during ripening in olive fruit by NIR-AOTF spectroscopy. In corso di pubblicazione su *J. Agric. Food Chem.* (2012).
- (16) Montedoro G.F., Servili M., Baldioli M., Selvaggini R., Miniati E., Macchioni A. Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. 3. Spectroscopic characterization of the secoiridoids derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 41, 2228–2234 (1993).
- (17) Montedoro GF., Servili M., Baldioli M., Miniati E. Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 40, 1571-1576 (1992).
- (18) Selvaggini R., Servili M., Urbani S., Esposto S., Taticchi A., Montedoro GF. Evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil by direct injection in high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *J. Agric. Food Chem.* 54, 2832-2838 (2006).
- (19) Servili M., Selvaggini R., Taticchi A., Montedoro G. F. "Headspace composition of virgin olive oil evaluated by solid phase microextraction: relationships with the oil sensory characteristics". In *Food Flavours and Chemistry*, Spanier A. H., Shahidi F., Parliament T. H., Mussiman C., Ho C. T., Tratras Contis E. Eds. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, U.K., pp 236-247 (2001).
- (20) Regolamento CE 1989/2003 modificante il Regolamento (CEE) n. 2568/91 *Gazzetta Ufficiale L.* 295/57 13/11/2003.
- (21) Regolamento CE 640/2008 della Commissione del 4 luglio 2008.
- (22) COI/T.20/Doc. no. 15/Rev. 2 settembre 2007.
- (23) Sassi P., Palombo F., Cataliotti R. S., Paolantoni M., Morresi A. Distributions of H-bonding aggregates in tert-butyl alcohol: the pure liquid and its alkane mixtures. *J. Phys. Chem. A.* 111, 6020-6027 (2007).
- (24) Brenes, M., Hidalgo, F. J., Garcí a, A., Rios, J. J.; Garcí a, P., Zamora, R., Garrido, A. Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77, 715-720 (2000).
- (25) Brenes M., Garcí a, A.; Rios J. J., Garcí a P., Garrido A. Use of 1-acetoxypinoresinol to authenticate Picual olive oils. *Int. J. Food Sci. Technol.* 37, 615-625 (2002).
- (26) Montedoro GF., Esposto S., Taticchi A., Selvaggini R., Urbani S., Servili M. "Chemical constituents of olive products and their biological activity". *Proceeding of the Second international seminar Olivebioteq 2006 "Biotechnology and quality of olive tree products around the Mediterranean basin"*, Mazara del Vallo (TP), Italy, 5-10 November 2006, *Special Seminars and Invited Lectures*, pp. 237-244 (2006).
- (27) Esposto S., Selvaggini R., Taticchi A., Urbani S., Di Maio I., Veneziani G., Sordini B., Pirrone, L., Servili M. Characterisation of Sicilian virgin olive oils using phenolic and volatile compounds as markers. In corso di pubblicazione su *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* (2012).

Effetti dell'irrigazione e della gestione del suolo sulla qualità delle produzioni olivicole di diverse cultivar italiane

Lavoro finalizzato alla "Progettazione e realizzazione di sistemi di controllo del rispetto delle norme di autenticità, qualità e commercializzazione degli oli di oliva immessi sul mercato" nell'ambito delle attività di tracciabilità, certificazione e tutela della qualità dell'olio di oliva e delle olive da tavola

Riassunto

La tecnica colturale ha notevoli effetti sulla quantità e qualità delle produzioni olivicole e può fornire indicazioni utili ai fini della tracciabilità del prodotto e la certificazione ambientale. A tal fine si riportano i risultati di un lavoro condotto per un triennio su due pratiche colturali, l'irrigazione e la gestione del suolo, fondamentali per il successo produttivo e la sostenibilità dell'oliveto in tre diversi areali olivicoli italiani. La somministrazione di volumi irrigui inferiori al fabbisogno idrico dell'albero non ha comportato variazioni nei valori di acidità libera, numero di perossidi e costanti spettrofotometriche, che sono stati sempre al di sotto dei limiti di legge per la categoria dell'olio extra-vergine. Al contrario, un aumento del contenuto in composti fenolici nell'olio è stato evidente ai più bassi regimi idrici in tutti gli areali di produzione. La gestione del suolo mediante inerbimento permanente non ha influito sull'efficienza produttiva degli alberi e sulla qualità degli oli prodotti, ma ha determinato un miglioramento nelle caratteristiche fisiche del terreno. Le informazioni ottenute sono state riscontrate su molte varietà di olivo in diverse condizioni climatiche e, pertanto, trasferibili ai produttori per migliorare la gestione agronomica dell'oliveto.

GESTIONE DELL'IRRIGAZIONE

Introduzione

La produzione dell'olio di oliva è geograficamente localizzata e la sua distribuzione a livello mondiale risulta concentrata nel bacino del Mediterraneo. A livello nazionale esiste una forte asimmetria nella distribuzione geografica dovuta al clima, tipicamente mediterraneo nell'Italia peninsulare ed insulare, ma continentale o quasi nell'Italia del nord. Dal punto di vista adattativo, l'olivo è in grado di crescere e produrre anche in condizioni di clima semi-arido, ma la disponibilità idrica, legata al regime pluviometrico e alle caratteristiche dei suoli, ha un notevole effetto sia sulla quantità che qualità delle produzioni. Pertanto, l'irrigazione è una pratica fondamentale per raggiungere alti livelli produttivi.

Vantaggi indiscutibili dell'irrigazione si hanno a partire dall'impianto e per tutta la fase di allevamento dell'oliveto in quanto la disponibilità idrica stimola l'attività vegetativa e consente di ottenere un rapido sviluppo dell'albero e una precoce entrata in produzione. Una volta raggiunta la fase produttiva, i vantaggi che essa apporta sono numerosi e tra questi l'aumento della produzione di olive e di olio per albero, della pezzatura dei frutti, del rapporto polpa nocciolo e dell'attività vegetativa dell'albero. L'incremento produttivo di olivi irrigati rispetto ad olivi coltivati in asciutto è tanto maggiore quanto più arido è il clima e minore la capacità

Riccardo Gucci ^a, Maurizio Servili ^b, Giovanni Caruso ^a, Stefania Urbani ^b, Agnese Taticchi ^b, Sonia Esposto ^b

a) Dip. di Coltivazione e Difesa delle Specie Legnose, Università di Pisa, Via del Borghetto 80, 56124, Pisa, Italy

b) Dip. di Scienze Economico-Estimative e degli Alimenti, Università di Perugia, Via San Costanzo 1, 06126, Perugia, Italy

Running title: Tecnica colturale e qualità dell'olio

Parole chiave: Acidità libera, irrigazione, inerbimento, perossidi, polifenoli.



di immagazzinamento dell'acqua nel terreno. Infatti, nei climi dell'Italia meridionale e insulare l'irrigazione può consentire di raddoppiare o triplicare la produzione di olio, mentre in quelli più umidi dell'Italia centrale e settentrionale l'incremento produttivo è di solito più contenuto. Allo stesso modo, l'andamento climatico stagionale influisce sul risultato produttivo dell'irrigazione. In annate di abbondanti precipitazioni nel periodo estivo l'irrigazione ha effetti trascurabili o nulli sulla produzione di olio, mentre in annate contraddistinte da estati calde e siccitose l'irrigazione determina aumenti considerevoli dell'olio prodotto.

Tra gli obiettivi primari della gestione dell'irrigazione in olivicoltura vi sono il risparmio di acqua e il miglioramento della qualità dell'olio. La qualità sensoriale dell'olio vergine di oliva è strettamente correlata ai composti fenolici, in quanto sostanze d'impatto per il gusto amaro e per il pungente, e, in generale, la loro concentrazione nell'olio diminuisce all'aumentare della disponibilità idrica [1-4]. Servili et al. [5] riportano che olivi pienamente irrigati della varietà Leccino hanno prodotto oli con concentrazioni in polifenoli e orto-difenoli più basse rispetto a quelli prodotti da olivi sottoposti a deficit idrico controllato o ad irrigazione di soccorso. Questi risultati concordano con quelli ottenuti sulla cultivar Arbequina, dove gli oli ottenuti da piante irrigate hanno mostrato concentrazioni in composti fenolici inferiori rispetto a quelli prodotti da piante in asciutto [6]. Al contrario, l'irrigazione non sembra avere un chiaro effetto su alcuni parametri quali acidità libera, numero di perossidi e costanti spettrofotometriche [1, 2, 5, 7]. Tovar et al. [4] non hanno riscontrato differenze significative per acidità libera, numero di perossidi e costanti spettrofotometriche in oli (cv. Arbequina) sottoposti a differenti regimi irrigui (25, 50 e 75% della piena irrigazione). I risultati finora disponibili sono stati ottenuti su un numero limitato di cultivar, di cui solo alcune italiane.

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare l'effetto di differenti regimi irrigui sui parametri produttivi e sulla qualità dell'olio di alcune delle principali cultivar italiane al fine di sviluppare dei protocolli operativi per la gestione dell'acqua nei rispettivi areali olivicoli. Sono state prese in considerazione per un triennio tre aree olivicole, al Nord, al Centro e al Sud, di notevole importanza per le caratteristiche del prodotto, ma differenti per caratteristiche dei suoli e del clima.

Materiali e Metodi

È stato effettuato un confronto tra diversi regimi irrigui tra il 2009 e 2011 in oliveti in produzione collocati in diversi areali olivicoli italiani e caratterizzati da varietà, condizioni climatiche e pedologiche diverse. In particolare, sono state selezionate tre aziende nella provincia di Brescia, un'azienda con tre livelli irrigui in provincia di Livorno, un'azienda in provincia di Campobasso e cinque aziende nella provincia di Lecce. In generale, le cultivar selezionate erano tipiche dei rispettivi areali di coltivazione, ma sono state anche considerate cultivar di ampia diffusione in Italia e all'estero.

Provincia di Brescia

Le prove sono state condotte tra il 2009 e il 2011 in un'azienda nel comune di Salò (Azienda 1) (Foto 1) e in due aziende nel comune di Puegnago del Garda (Azienda 2 e Azienda 3) (Foto 2). Il regime pluviometrico nella provincia di Brescia è caratterizzato da una piovosità media annua di circa 1050 mm (stazione meteorologica di Puegnago del Centro Agrometeorologico Provinciale di Brescia, 1990-2008) distribuita piuttosto uniformemente nel corso dell'anno con una certa diminuzione nel solo periodo estivo. Le precipitazioni annuali sono state pari a 1118, 1811 e 1069 mm nel 2009, 2010 e 2011, rispettivamente, di cui 262 mm (2009), 418 mm (2010) e 309 (2011) in estate.

Per motivi di semplicità di gestione, in ciascuna azienda il confronto ha riguardato due livelli irrigui, di cui uno seguiva la consuetudine praticata in azienda (Alto), l'altro un regime irriguo che somministrava volumi inferiori di acqua (Basso). L'acqua presso le aziende veniva distribuita mediante impianto di irrigazione a goccia, a spruzzo o con interventi di soccorso mediante carro-botte. I volumi irrigui erogati nei tre anni di lavoro sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1. Volumi di acqua somministrati per ciascuna tesi durante il periodo di differenziazione dell'irrigazione presso le aziende in provincia di Brescia nel 2009, 2010 e 2011.

Cultivar	Azienda	Livello irriguo	Volumi irrigui [m ³ ha ⁻¹]		
			2009	2010	2011
Casaliva	1	Alto	195	43	85
Casaliva	1	Basso	101	11	0
Casaliva	2	Alto	720	160	240
Casaliva	2	Basso	370	40	0
Casaliva	3	Alto (*)	186	53	80
Casaliva	3	Basso (**)	0	0	0
Leccino	2	Alto	540	213	180
Leccino	2	Basso	278	30	0

(*) Irrigazioni di soccorso; (**) asciutto.

I periodi irrigui sono stati dal 23 luglio all'11 settembre nel 2009, dal 13 al 23 luglio nel 2010 e dal 29 agosto al 4 ottobre nel 2011.

Nel corso del periodo irriguo lo stato idrico dell'albero è stato misurato alla fine di luglio e nei primi giorni di settembre, mediante rilievi di potenziale idrico del fusto (SWP) con camera a pressione, su sei alberi per ciascuna varietà (tre alberi per ciascun livello irriguo) (Tab. 2). La misurazione veniva effettuata su una foglia completamente espansa, inserita in prossimità del fusto e mantenuta precedentemente al buio per circa 40 minuti mediante insacchettamento con foglio di alluminio. Con cadenza mensile è stato misurato anche il peso medio del frutto (media di 50 frutti) prelevando casualmente i frutti da diversi settori della chioma di tutti gli alberi delle file in prova. Alla raccolta sono stati prelevati circa 3,5 kg di olive da ciascun albero in prova, per un totale di sei campioni di olive per ogni varietà (tre repliche per ciascun trattamento irriguo). Il peso medio del frutto è stato misurato su un campione di 50 frutti ad albero e gli stessi frutti venivano poi utilizzati per la determinazione del contenuto in olio nel frutto mediante risonanza magnetica nucleare (MQC-23 Oxford Analytical Instruments Ltd., Oxford, UK) (Foto 3).



Foto 1. Oliveto allevato a monocono (cv. Casaliva) con inerbimento permanente dell'interfila a Salò (BS).



Foto 2. Oliveto allevato a monocaule libero (cv. Leccino) con inerbimento permanente totale a Puegnago (BS).



Tabella 2. Potenziale idrico del fusto (SWP) misurato durante il periodo di differenziazione dell'irrigazione presso le aziende in provincia di Brescia nel 2009, 2010 e 2011. I valori sono medie \pm deviazione standard di 3 repliche per tesi.

Cultivar	Azienda	Livello irriguo	SWP (-MPa)	
			1.08.09	4.10.09
Casaliva	1	Alto	1.92 \pm 0.13	3.51 \pm 0.05
Casaliva	1	Basso	4.13 \pm 0.28	4.64 \pm 0.42
Casaliva	2	Alto	2.38 \pm 0.25	1.77 \pm 0.06
Casaliva	2	Basso	2.52 \pm 0.13	3.53 \pm 0.06
Casaliva	3	Alto (*)	3.20 \pm 0.20	4.04 \pm 0.05
Casaliva	3	Basso (**)	3.68 \pm 0.39	4.93 \pm 0.10
Leccino	2	Alto	2.50 \pm 0.22	1.98 \pm 0.22
Leccino	2	Basso	2.62 \pm 0.28	3.00 \pm 0.10
			22.07.10	02.09.10
Casaliva	1	Alto	2.25 \pm 0.26	1.35 \pm 0.09
Casaliva	1	Basso	3.78 \pm 0.17	1.31 \pm 0.16
Casaliva	2	Alto	1.45 \pm 0.05	1.10 \pm 0.17
Casaliva	2	Basso	2.00 \pm 0.10	1.08 \pm 0.08
Casaliva	3	Alto (*)	2.64 \pm 0.31	1.36 \pm 0.05
Casaliva	3	Basso (**)	3.05 \pm 0.22	1.38 \pm 0.08
Leccino	2	Alto	1.50 \pm 0.10	1.13 \pm 0.08
Leccino	2	Basso	1.48 \pm 0.08	1.18 \pm 0.03
			21.07.11	06.09.11 (***)
Casaliva	1	Alto	1.41 \pm 0.09	1.04 \pm 0.09
Casaliva	1	Basso	1.43 \pm 0.07	1.05 \pm 0.14
Casaliva	2	Alto	1.43 \pm 0.06	1.13 \pm 0.15
Casaliva	2	Basso	1.45 \pm 0.05	1.15 \pm 0.05
Casaliva	3	Alto (*)	1.49 \pm 0.04	1.15 \pm 0.14
Casaliva	3	Basso (**)	1.46 \pm 0.05	1.17 \pm 0.11
Leccino	2	Alto	1.48 \pm 0.03	1.22 \pm 0.10
Leccino	2	Basso	1.42 \pm 0.03	1.12 \pm 0.13

(*) Irrigazioni di soccorso; (**) asciutto; (***) dopo pioggia abbondante caduta dal 3 al 5 settembre 2011.

Provincia di Livorno

La prova è stata condotta in un oliveto (*Olea europaea* L. cv. Frantoio) di 513 piante ha⁻¹ piantato nel 2003 presso i campi sperimentali dell'Università di Pisa a Venturina (LI) (Foto 4) in un suolo franco-sabbioso, in condizioni di clima mediterraneo sub-umido [8]. La piovosità media annua è di 650 mm, concentrata prevalentemente nel periodo autunno-invernale (medie ventennali 1990-2007, Servizio Agrometeorologico ARSIA della Regione Toscana). Le variabili climatiche sono state misurate con una centralina Netafim (Netafim Ltd., Israele) presente in loco e l'evapotraspirazione potenziale calcolata utilizzando l'equazione (ET₀) di Penman-Monteith. Le precipitazioni annuali sono state pari a 771, 1140 e 382 mm nel 2009, 2010 e 2011, rispettivamente, di cui 187 mm (2009), 140 mm (2010) e 83 (2011) nei mesi estivi.

L'oliveto è fornito di un impianto di sub-irrigazione avente una portata oraria massima di 1560 L, predisposto per la fertirrigazione. Gli alberi sono stati irrigati soddisfacendo appieno il fabbisogno fino al 2006 quando è iniziata l'irrigazione in deficit controllato con restituzioni volumetriche pari a circa il 50% del fabbisogno intero [8]. Nel triennio 2009-2011 sono stati stabiliti

tre regimi irrigui: piena irrigazione (Piena), irrigazione in deficit controllato (Deficit) e irrigazione di soccorso (Soccorso) (Tab. 3). Lo stato idrico dell'albero è stato monitorato mediante misure di potenziale idrico fogliare [8] effettuate al termine del periodo notturno (PLWP) (Fig. 1). Gli alberi "Soccorso" venivano irrigati solo quando i valori di PLWP scendevano al di sotto di -4 MPa.

Tabella 3. Volumi di acqua somministrati per ciascuna tesi durante il periodo di differenziazione dell'irrigazione a Venturina (LI) nel 2009, 2010 e 2011.

Gestione del suolo	Irrigazione	Anno	Periodo irriguo	Volumi irrigui [m ³ ha ⁻¹]
Inerbimento	Piena	2009	1 Lug – 9 Ott	1958
Inerbimento	Deficit			484
Inerbimento	Soccorso			38
Lavorazione	Deficit			465
Inerbimento	Piena	2010	29 Giu – 10 Ott	922
Inerbimento	Deficit			115
Inerbimento	Soccorso			114
Lavorazione	Deficit			102
Inerbimento	Piena	2011	1 Lug – 26 Sett	734
Inerbimento	Soccorso			33
Lavorazione	Soccorso			36

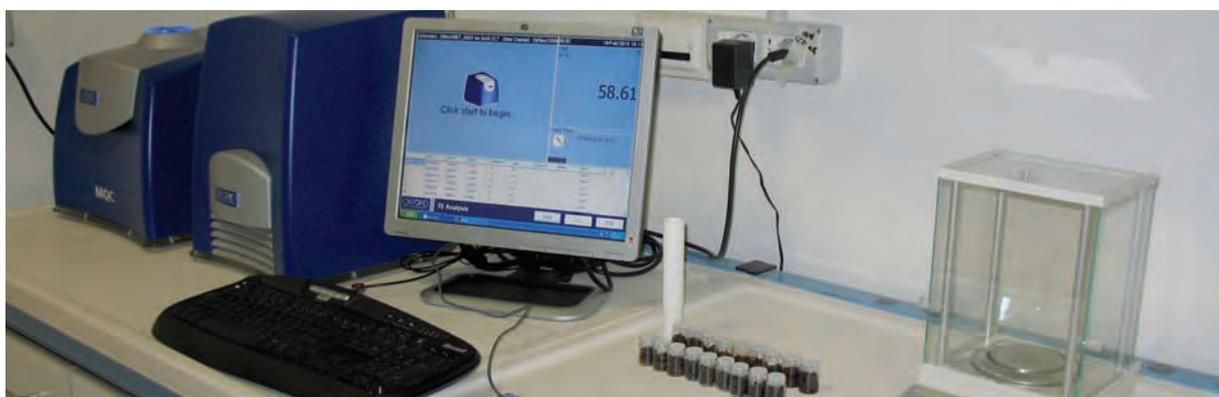


Foto 3. Strumentazione NMR per la determinazione del contenuto in olio nel frutto.



Foto 4. Olivi allevati a vaso libero presso l'oliveto sperimentale a Venturina (LI) ove sono state condotte le attività riguardanti la gestione in deficit della risorsa idrica.



Gli elementi nutritivi somministrati mediante fertirrigazione sono stati pari a 50, 35 e 60 g di N, P₂O₅ e K₂O ad albero rispettivamente nel 2009, 2010 e 2011. La piena fioritura è avvenuta il 24 maggio 2009, il 28 maggio 2010 e il 24 maggio 2011, e la raccolta è stata effettuata il 19 Ottobre 2009, 25 Ottobre 2010 e 17 ottobre 2011. Alla raccolta sono stati misurati la produzione ad albero, il peso medio del frutto (media di 50 frutti per albero), l'indice di maturazione secondo una scala di colore da 0 a 7 (0 = buccia verde intenso; 7 = buccia nera e polpa colorata fino al nocciolo) e il contenuto in olio sul peso secco mediante risonanza magnetica nucleare.

Provincia di Campobasso

Per le prove condotte nel 2010 e 2011 nel comune di Ururi sono state utilizzate due varietà tipiche della zona (Gentile di Larino e Peranzana) (Foto 5), una tipica siciliana a duplice attitudine (Nocellara del Belice) e una ampiamente diffusa in Italia e all'estero (Frantoio) (Foto 6).

Gli alberi delle diverse cultivar presenti presso l'azienda selezionata erano allevati ad asse unico ad un sesto di 6 x 3 m. La gestione del suolo prevedeva la lavorazione periodica durante la stagione vegetativa e l'inerbimento spontaneo nel periodo di raccolta al fine di garantire una migliore transitabilità nell'oliveto. Come per le altre aziende commerciali, i regimi irrigui confrontati sono stati: a) consuetudine aziendale (Alto); b) maggiore stress rispetto alla consuetudine (Basso) (Tab. 4). L'acqua veniva distribuita mediante gocciolatori della portata di 4 L/h. Il periodo irriguo è durato dal 12 uoglio al 2 settembre 2010 e dal 10 luglio al 17 agosto 2011. Per ciascuna cultivar sono stati utilizzati sei alberi (tre alberi per ciascun regime irriguo). Lo stato idrico degli alberi è stato misurato due volte nel 2010 e una volta nel 2011 mediante rilievi di potenziale idrico del fusto secondo la metodologia precedentemente descritta (Tab. 5). I frutti utilizzati per la determinazione del peso medio del frutto e del contenuto in olio nel frutto sono stati prelevati in corrispondenza dei due rilievi di potenziale idrico del fusto e al momento della raccolta, avvenuta il 17 novembre 2010 e il 6 ottobre 2011 (Foto 7). Il quantitativo di frutti necessari alla microleificazione (3,5 kg di olive) è stato prelevato da ciascuna tesi irrigua per un totale di due campioni per varietà (un campione per ciascun regime irriguo), ad eccezione della varietà Frantoio e Gentile di Larino nel 2010 per le quali è stato possibile campionare soltanto i frutti degli alberi irrigati secondo consuetudine aziendale (Alto).

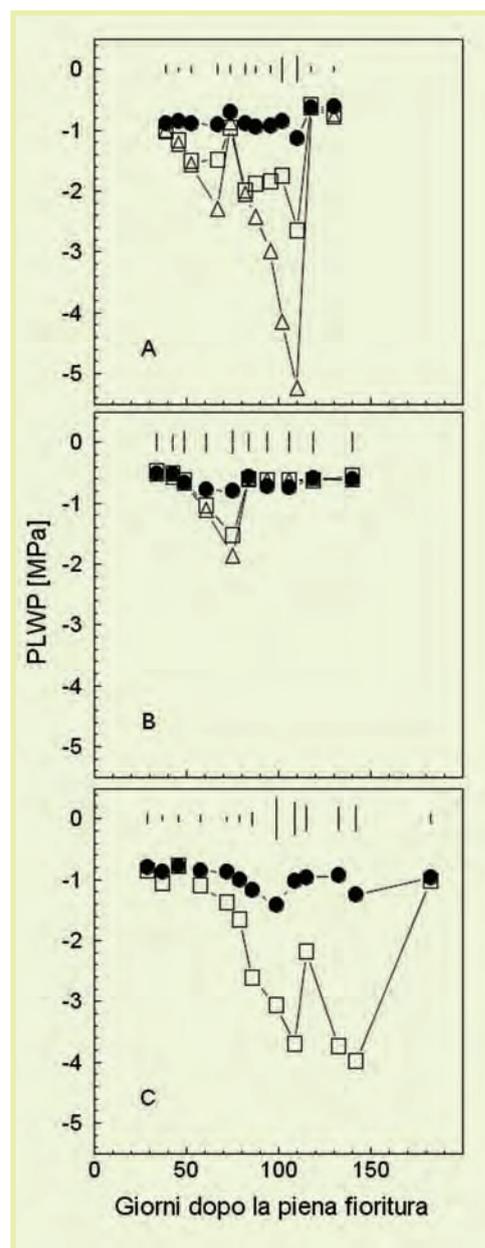


Fig. 1. Potenziale idrico fogliare misurato al termine del periodo notturno (PLWP) in olivi (cv. Frantoio) sottoposti a tre differenti regimi irrigui (pieno, deficit e soccorso) nel 2009 (A), 2010 (B) e 2011 (C) a Venturina (LI). I valori sono medie di 6 alberi per tesi. Le barre verticali indicano differenze minime significative (LSD) calcolate mediante ANOVA ($p < 0.05$).

Tabella 4. Volumi di acqua somministrati per ciascuna tesi durante il periodo di differenziazione dell'irrigazione a Ururi (CB) nel 2010 e 2011.

Cultivar	Livello irriguo	Volumi irrigui [m ³ ha ⁻¹]	
		2010	2011
Gentile di Larino	Alto	142	196
Gentile di Larino	Basso	71	98
Peranzana	Alto	133	262
Peranzana	Basso	31	131
Nocellara del Belice	Alto	156	218
Nocellara del Belice	Basso	76	109
Frantoio	Alto	209	218
Frantoio	Basso	45	109

Tabella 5. Potenziale idrico del fusto (SWP) misurato durante il periodo di differenziazione dell'irrigazione a Ururi (CB) nel 2010 e 2011. I valori sono medie \pm deviazione standard di 3 repliche per tesi.

Cultivar	Livello irriguo	SWP (-MPa)	
		28.07.2010	07.09.2010
Gentile di Larino	Alto	0.74 \pm 0.09	1.18 \pm 0.14
Gentile di Larino	Basso	0.76 \pm 0.05	1.11 \pm 0.09
Peranzana	Alto	1.16 \pm 0.05	1.05 \pm 0.12
Peranzana	Basso	1.21 \pm 0.09	1.08 \pm 0.10
Nocellara del Belice	Alto	1.39 \pm 0.09	1.41 \pm 0.06
Nocellara del Belice	Basso	1.45 \pm 0.07	1.46 \pm 0.13
Frantoio	Alto	1.55 \pm 0.04	1.21 \pm 0.09
Frantoio	Basso	1.45 \pm 0.11	1.24 \pm 0.11
		28.07.2011	
Gentile di Larino	Alto	1.01 \pm 0.10	
Gentile di Larino	Basso	1.05 \pm 0.09	
Peranzana	Alto	1.01 \pm 0.10	
Peranzana	Basso	1.08 \pm 0.12	
Nocellara del Belice	Alto	1.09 \pm 0.13	
Nocellara del Belice	Basso	1.05 \pm 0.15	
Frantoio	Alto	1.06 \pm 0.07	
Frantoio	Basso	1.05 \pm 0.13	





Foto 5. Oliveto (cv. Peranzana) gestito con inerbimento temporaneo a Ururi (CB).



Foto 6. Veduta dell'oliveto (cv. Frantoio) a Ururi (CB).



Foto 7. Fruttificazione alla raccolta su olivi della cultivar Peranzana, Ururi (CB).

Provincia di Lecce

In provincia di Lecce sono state individuate due varietà (Ogliarola Salentina e Cellina di Nardò) tipiche del Salento, una (Coratina) (Foto 8) tipica della Puglia e diffusa anche a livello internazionale, e una (Frantoio) utilizzata come riferimento in quanto presente nelle altre aree di studio. Le cinque aziende selezionate nel 2009 erano collocate nei comuni di Magliano, Sannicola, Melendugno, Ugento e Castrignano del Capo (Foto 9). Le precipitazioni medie annuali nella provincia di Lecce sono di circa 630 mm (Stazione meteorologica di Galatina del Servizio Meteo dell'Aeronautica Militare, medie del periodo 1960-1990). I regimi irrigui a confronto sono stati: consuetudine aziendale (Alto) e un livello inferiore (Basso) che prevedeva la somministrazione di volumi inferiori di acqua e turni irrigui più brevi. I volumi irrigui erogati nel 2009 sono riportati in Tabella 6. L'irrigazione è stata differenziata dal 28 luglio al 28 settembre 2009. Con cadenza mensile è stato misurato anche il peso medio del frutto (media di 50 frutti) prelevando casualmente i frutti da diversi settori della chioma di tutti gli alberi delle file in prova. Alla raccolta, avvenuta il 26 ottobre 2009, sono stati prelevati circa 3,5 kg di olive da ciascun albero in prova, per un totale di sei campioni di olive per ogni varietà (tre repliche per ciascun trattamento irriguo), ad eccezione della varietà Ogliarola Salentina (una replica per ciascun trattamento irriguo) e della varietà Frantoio per la quale è stato possibile prelevare i frutti soltanto dagli alberi sottoposti a regime irriguo "Alto".

Estrazione ed analisi dell'olio

Per tutti gli oliveti oggetto di analisi l'olio è stato ottenuto da olive lavorate entro 36 ore dalla raccolta utilizzando un sistema di estrazione da laboratorio dotato di un frangitore a martelli, gramola e separatore centrifugo. La pasta è stata gramolata a 25 °C per 20 min, quindi l'olio separato per centrifugazione, immediatamente filtrato e conservato al buio a 8 °C. L'acidità libera, il numero di perossidi e gli indici spettrofotometrici sono stati determinati in base ai Metodi Ufficiali di Analisi (regolamento UE 1989/03 che modifica il reg. EEC 2568/91) [9], il contenuto in composti fenolici mediante un metodo colorimetrico secondo la metodologia riportata in Montedoro et al. [10].

Tabella 6. Volumi di acqua somministrati per ciascuna tesi durante il periodo di differenziazione dell'irrigazione presso le aziende in provincia di Lecce nel 2009.

Cultivar	Livello irriguo	Durata dell'intervento irriguo [ore]	Turno irriguo [giorni]
Ogliarola Salentina	Alto	24	15
Ogliarola Salentina	Basso	7	7
Cellina di Nardò	Alto	3	5
Cellina di Nardò	Basso	3	10
Coratina	Alto	8	15
Coratina	Basso	8	10
Frantoio	Alto	24	10
Frantoio	Basso	7	7



Foto 8. Olivi (cv. Coratina) allevati a vaso a Sannicola (LE)



Foto 9. Olivi allevati a globo a Melendugno (LE)



Risultati

Provincia di Brescia

La crescita del frutto è stata influenzata dall'irrigazione e dal diverso regime pluviometrico nei tre anni di studio. Nei periodi caratterizzati da abbondanti precipitazioni l'effetto dell'irrigazione sul peso medio del frutto è stato, com'era prevedibile, modesto o del tutto assente, mentre nei periodi più asciutti verificatisi a metà, inizio e fine estate nel 2009, 2010 e 2011, rispettivamente, tale effetto è stato evidente. Volumi irrigui più abbondanti hanno comportato, sia nella cultivar Casaliva che Leccino, una maggiore crescita del frutto (Tab. 7).

Anche le caratteristiche del frutto alla raccolta hanno risentito dell'intensità e della distribuzione delle precipitazioni nel corso dell'anno. Il peso medio del frutto degli alberi del livello "Alto" è stato superiore, ma statisticamente simile, a quello del livello "Basso" sia nel 2009 che nel 2011, mentre nel 2010, caratterizzato da abbondanti precipitazioni, le differenze riscon-

Tabella 7. Peso medio del frutto di olivi (cvs. Casaliva e Leccino) presso le aziende nella provincia di Brescia nel 2009, 2010 e 2011. Il peso medio del frutto è ottenuto dal peso di 50 frutti per ciascun trattamento irriguo.

Cultivar	Livello irriguo	Peso medio del frutto [g]				
		01.08.09	04.09.09	29.09.09	02.11.09	
Casaliva 1	Alto	1.08	1.28	2.10	1.91	
Casaliva 1	Basso	0.92	1.08	2.00	1.86	
Casaliva 2	Alto	1.2	1.96	2.32	2.96	
Casaliva 2	Basso	1.3	1.52	2.12	2.66	
Casaliva 3	Alto (*)	1.04	1.12	1.78	2.58	
Casaliva 3	Basso (**)	1.00	1.42	2.04	N.D.	
Leccino	Alto	N.D.	N.D.	N.D.	2.47	
Leccino	Basso	N.D.	N.D.	N.D.	2.36	
		22.07.10	17.08.10	02.09.10	02.10.10	28.10.10
Casaliva 1	Alto	0.86	1.90	1.92	2.56	2.60
Casaliva 1	Basso	0.68	1.62	1.86	2.74	2.87
Casaliva 2	Alto	0.90	1.66	1.80	2.06	2.36
Casaliva 2	Basso	0.86	1.72	1.76	1.88	2.02
Casaliva 3	Alto (*)	0.60	1.46	1.72	1.84	2.01
Casaliva 3	Basso (**)	0.74	1.36	1.66	1.96	2.00
Leccino	Alto	0.98	N.D.	1.84	2.44	2.48
Leccino	Basso	0.94	N.D.	1.88	2.36	2.52
		21.07.11	20.08.11	06.09.11	20.09.11	24.10.11
Casaliva 1	Alto	0.86	1.00	1.62	1.86	2.33
Casaliva 1	Basso	0.82	0.80	1.40	1.58	1.75
Casaliva 2	Alto	0.86	1.30	1.74	1.94	2.00
Casaliva 2	Basso	0.92	1.16	1.52	1.80	1.78
Casaliva 3	Alto (*)	0.80	1.08	1.58	1.74	1.82
Casaliva 3	Basso (**)	0.82	0.96	1.42	1.62	1.53
Leccino	Alto	0.72	1.20	1.34	1.60	1.79
Leccino	Basso	0.88	1.16	1.52	1.80	1.47

(*) Irrigazioni di soccorso; (**) asciutto; N.D., non disponibile.

Tabella 8. Acidità libera, numero di perossidi, K_{232} , K_{270} e ΔK di oli ottenuti da olivi sottoposti a differenti regimi irrigui nel 2009 e 2010 nella provincia di Brescia. I valori sono medie di tre campioni di olio per tesi. Lettere differenti indicano differenze minime significative ($p < 0.05$) calcolate mediante analisi della varianza (ANOVA).

Anno	Cultivar	Livello irriguo	Acidità libera [% ac. oleico]	Numero di perossidi [meq Kg ⁻¹]	K_{232}	K_{270}	ΔK	
2009	Casaliva 1	Alto	0.22	7.0	1.78	0.109	-0.003	
	Casaliva 1	Basso	0.23	7.5	1.88	0.126	-0.013	
	Casaliva 2	Alto	0.20	5.7	1.68	0.099	-0.030	
	Casaliva 2	Basso	0.19	7.0	1.73	0.104	-0.002	
	Casaliva 3	Alto (*)	0.20	6.3	1.82	0.134	-0.005	
	Casaliva 3	Basso (**)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
	Leccino	Alto	0.19	4.5	1.53	0.108	-0.001	
	Leccino	Basso	0.23	4.2	1.59	0.114	-0.001	
	2010	Casaliva 1	Alto	0.23	6.7	1.59	0.077	-0.002
		Casaliva 1	Basso	0.20	7.6	1.56	0.078	-0.001
Casaliva 2		Alto	0.26	5.6	1.53	0.098	-0.002	
Casaliva 2		Basso	0.24	6.6	1.59	0.092	-0.003	
Casaliva 3		Alto (*)	0.29	6.4	1.55	0.091	-0.003	
Casaliva 3		Basso (**)	0.23	4.7	1.59	0.095	-0.004	
Leccino		Alto	0.21	4.3	1.40	0.074 b	-0.002	
Leccino		Basso	0.18	4.6	1.47	0.082 a	-0.001	

(*) Irrigazioni di soccorso; (**) asciutto; N.D., non disponibile.

trate sono legate più al carico di frutti ad albero che all'irrigazione (Fig. 2A, B, C). Maggiori volumi irrigui hanno comportato anche un certo ritardo nella maturazione dei frutti che si è manifestato, seppur con diversa intensità, in tutti e tre gli anni di studio (Fig. 2D, E, F). Infine, è emerso che irrigazioni più abbondanti hanno comportato un maggiore accumulo di olio nel mesocarpo. Nel 2011 il contenuto in olio nella polpa dei frutti del livello "Alto" è stato, per entrambe le varietà, significativamente superiore a quello del livello "Basso" (Fig. 2I). È interessante notare che, seppure in misura più modesta, tale effetto è stato riscontrato anche in un'annata molto piovosa come quella del 2010 (Fig. 2H).

I parametri di qualità per la classificazione merceologica misurati sugli oli prodotti in provincia di Brescia hanno presentato valori bassi in tutti i campioni con punte massime di 0,29% di acido oleico di acidità libera e 7,6 meq O₂/kg di olio del numero di perossidi (Tab. 8). Per entrambi questi parametri, così come per gli indici spettrofotometrici non sono emerse differenze significative tra i due regimi irrigui, fatta eccezione per il K_{270} che nel 2010 ha mostrato valori significativamente superiori nel livello "Basso". Per quanto riguarda i polifenoli totali i valori più alti sono stati misurati negli oli prodotti da alberi irrigati meno abbondantemente o in asciutto con differenze evidenti tra i due livelli irrigui e comprese tra il 30 e 65% nel 2009 e tra il 6 e il 54% nel 2010 (Fig. 3).



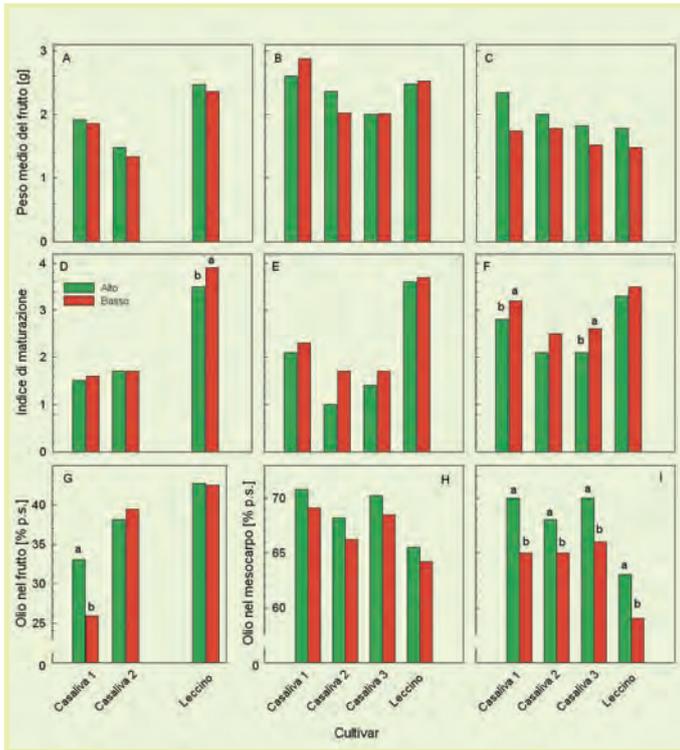


Fig. 2. Peso medio del frutto, indice di maturazione e contenuto in olio nel frutto in olivi (cvs. Casaliva e Leccino) sottoposti a due differenti regimi irrigui (Alto, consuetudine aziendale; Basso, volumi irrigui inferiori rispetto alla consuetudine aziendale) nel 2009 (A, D, G), 2010 (B, E, H) e 2011 (C, F, I) presso le aziende in provincia di Brescia. Gli istogrammi rappresentano le medie di 3 repliche per tesi. Lettere diverse indicano differenze minime significative (LSD) calcolate mediante ANOVA ($p < 0.05$).

Provincia di Livorno

I tre anni durante i quali si è svolto lo studio (2009, 2010 e 2011) sono stati caratterizzati da andamenti climatici differenti, in particolare per quanto riguarda il regime pluviometrico. Ciò ha influito notevolmente sulla differenziazione dello stato idrico degli alberi e, conseguentemente, sui risultati attesi. La Figura 1 mostra gli andamenti del potenziale idrico fogliare degli olivi sottoposti a diversi regimi irrigui nel 2009, 2010 e 2011. È evidente che, a differenza di quanto si è verificato nel 2009 e 2011, la differenziazione dello stato idrico nel 2010 è avvenuta solo per un breve periodo di tempo (circa 20 giorni) ed ha riguardato principalmente la tesi pienamente irrigata rispetto alle altre due.

Il peso medio del frutto alla raccolta degli alberi pienamente irrigati è stato significativamente superiore a quello di olivi in asciutto nel 2009 e 2011, mentre non sono state riscontrate differenze con i frutti degli alberi gestiti in deficit (Fig. 4A). La maturazione dei frutti è stata influenzata in maniera evidente dall'irrigazione in due dei tre anni di studio, mostrando un aumento della colorazione all'aumentare del livello di stress idrico (Fig. 4B). Il contenuto in olio nel mesocarpo è stato simile, seppur con valori leggermente superiori nel livello in deficit, sia nel 2009 che nel 2010, mentre differenze significative sono state misurate nel 2011 con valori per gli alberi pienamente irrigati pari al 114 % di quelli misurati in alberi in asciutto (Fig. 4C).

Anche per quanto riguarda le produzioni, sia in frutti che in olio,

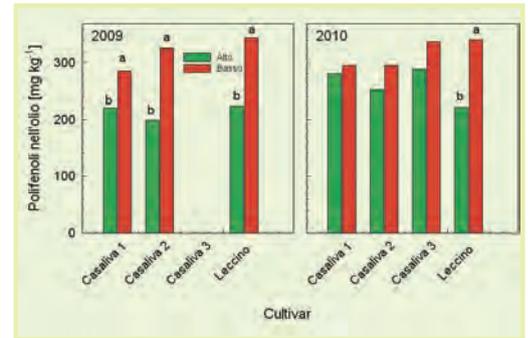


Fig. 3. Contenuto in polifenoli in oli ottenuti da olivi (cvs. Casaliva e Leccino) sottoposti a due differenti regimi irrigui (Alto, consuetudine aziendale; Basso, volumi irrigui inferiori rispetto alla consuetudine aziendale) nel 2009 e 2010 presso le aziende in provincia di Brescia. Gli istogrammi rappresentano le medie di 3 repliche per tesi. Lettere diverse indicano differenze minime significative (LSD) calcolate mediante ANOVA ($p < 0.05$).

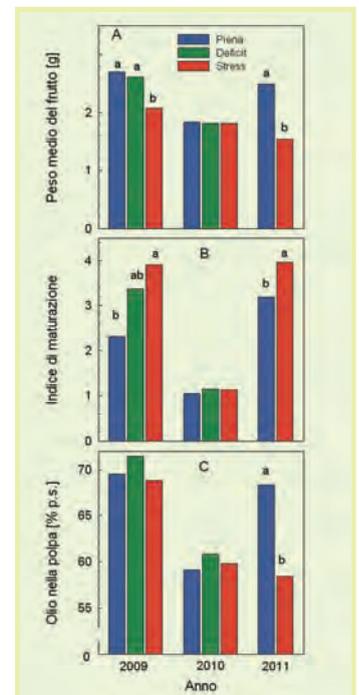


Fig. 4. Peso medio del frutto, indice di maturazione e contenuto in olio nel mesocarpo in olivi (cv. Frantoio) sottoposti a tre differenti regimi irrigui (pieno, deficit e soccorso) a Venturina (LI) nel 2009, 2010 e 2011. I valori sono medie di 6 (2009) o 4 (2010 e 2011) repliche per tesi. Lettere diverse indicano differenze minime significative (LSD) calcolate mediante ANOVA ($p < 0.05$).