

---

SCUOLA DI SCIENZE

Dipartimento di Chimica Industriale “Toso Montanari”

Corso di Laurea Magistrale in

**Chimica Industriale**

Classe LM-71 - Scienze e Tecnologia della Chimica Industriale

Tecniche elettroanalitiche-chemiometriche  
applicate alla tipizzazione di  
oli monovarietalì

Tesi di laurea sperimentale

**CANDIDATO**

Virginia Conti

**RELATORE**

Prof. Mario Berrettoni

**CORRELATORE**

Dott. Paolo Conti

**Sessione II**

---

**Anno Accademico 2012-2013**

---



*Ai miei genitori,*

*che possano sempre essere orgogliosi della loro bambina*



## INDICE

<b>1. SCOPO DELLA TESI</b> .....	7
<b>2. INTRODUZIONE</b> .....	8
2.1. Storia dell'olivo: la coltivazione, il culto il commercio.....	8
2.2. Olio di oliva e composizione chimica.....	11
2.2.1. Frazione saponificabile.....	13
2.2.2. Frazione insaponificabile.....	16
2.2.2.1. Idrocarburi.....	16
2.2.2.2. Steroli.....	17
2.2.2.3. Alcoli.....	20
2.2.2.4. Pigmenti colorati.....	20
2.2.2.5. Fenoli.....	22
2.2.2.6. Acidi fenolici.....	24
2.2.2.7. Secoiridoidi.....	25
2.2.2.8. Flavoinoidi.....	27
2.2.2.9. Lignani.....	27
2.2.2.10. Metalli.....	29
2.3. Processo di rettifica degli oli.....	30
2.4. Classificazione.....	31
2.5. Aspetti nutrizionali.....	32
2.6. Produzione dell'olio d'oliva.....	35
2.6.1. Metodo mediante pressione.....	37
2.6.2. Metodo per centrifugazione.....	39
2.6.3. Filtrazione selettiva.....	40
2.7. Le frodi alimentari, una guerra continua.....	41
2.8. Metodi analitici di riconoscimento delle frodi.....	44
2.9. Olio marchigiano.....	45
2.9.1. Piantone di Mogliano.....	49
2.9.2. Mignola.....	50
2.9.3. Coroncina.....	51
<b>3. PARTE SPERIMENTALE</b> .....	53
3.1. Reagenti.....	53
3.2. Preparazione delle miscele olio/RTIL.....	53

3.3. Tecniche elettroanalitiche a potenziale controllato e voltammetria ciclica.....	54
3.3.1. Passaggio da macroelettrodi a microelettrodi.....	59
3.4. Tecniche chemiometriche.....	62
3.4.1. Pretrattamenti.....	63
3.4.2. Metodi di convalida delle elaborazioni chemiometriche.....	66
3.4.3. Principal Component Analysis (PCA) .....	68
3.4.4. PLS .....	70
3.4.5. Tecniche di classificazione e modellazione.....	72
<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONE .....</b>	<b>75</b>
4.1. Risultati delle elaborazioni sulle misure a tre elettrodi .....	86
4.2. Classificazioni con v-Parvus.....	93
4.3. PLS-D.....	94
<b>5. CONCLUSIONI.....</b>	<b>97</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>98</b>

## **1. SCOPO DELLA TESI**

Il presente lavoro di tesi si propone di verificare se le tecniche elettrochimiche consentano di effettuare una classificazione del cultivar dell'olio.

In particolare si vuole proporre un nuovo metodo per eseguire misure voltammetriche con un microelettrodo di platino direttamente in campioni di olio extravergine di oliva a cui sono aggiunti RTILs (Room Temperature Ionic Liquids) per rendere le matrici adeguatamente conducibili e quindi adatte per le analisi.

I voltammogrammi ciclici dovranno poi essere elaborati attraverso diverse tecniche chemiometriche con l'obiettivo di discriminare i campioni sulla base della loro origine.

Si studieranno quindi delle metodologie analitiche che potrebbero consentire di riconoscere l'origine delle olive usate per produrre un olio e di verificarne l'aderenza alle normative o ai disciplinari delle DOP e l'eventuale presenza di materiale estraneo. Le ricerche hanno l'obiettivo di individuare nell'olio il "fingerprint" da cui sarà possibile risalire alle varie cultivar di provenienza, identificando la composizione e l'origine dell'olio, ciò consentirà inoltre di difendere i consumatori da eventuali frodi commerciali.

## 2. INTRODUZIONE

### 2.1 STORIA DELL'OLIVO: LA COLTIVAZIONE, IL CULTO, IL COMMERCIO

Il leggendario albero di ulivo e l'olio ricavato dai suoi frutti hanno accompagnato la storia dell'umanità.

L'albero dell'olivo veniva coltivato in Siria più di 6000 anni fa: sembra che i Fenici siano stati una delle prime popolazioni a dedicarsi all'olivicoltura. Oltre che in ambito culinario l'olio veniva utilizzato per confezionare le focacce destinate ai sacrifici, oppure veniva utilizzato come moneta di scambio, come balsamo medicamentoso e cosmetico, olio combustibile per il riscaldamento, l'illuminazione e la profumazione domestica e per tante altre cose ancora.

Il suo uso fungeva da indicatore culturale e sociale delle differenti società.

Tra i Greci la coltivazione dell'olio trovò una diffusione larghissima e divenne presto sistematica, ovvero con regole precise sulle modalità della coltivazione stessa, quali l'allineamento e la distanza dei filari degli ulivi. In Grecia esistevano molti e fiorenti uliveti; particolarmente ricca ne era l'Attica e soprattutto la pianura vicina ad Atene. D'altra parte l'olivo era la pianta sacra alla dea Atena e secondo la mitologia era stata lei che, in gara con Poseidone per il possesso dell'Attica, aveva vinto facendo nascere l'ulivo dalla sua asta vibrata nel terreno. Gli Etruschi fecero propria questa leggenda e, per giustificare l'abbondanza degli uliveti in Etruria, raccontavano che Minerva (Atena) aveva battuto la sua lancia soprattutto sul territorio aretino. Un'altra leggenda vuole invece che Atena donò il primo ulivo agli ateniesi e lo piantò sull'acropoli: da quell'ulivo nacquero poi tutte le altre varietà [1]. In onore della dea si celebravano ricche feste, dette Panatenee, durante le quali gli atleti vincitori delle gare ricevevano anfore contenenti olio raffinato, chiamato da Omero "oro liquido" dato l'enorme valore economico e commerciale: si tratta di anfore di una forma molto particolare, con corpo assai panciuto, collo breve, fondo stretto e piccole anse "a maniglia", dette per questo loro particolare uso, panatenaiche. In seguito, quando nel 776 a.C. ad Olimpia nacquero i giochi olimpici, i vincitori venivano premiati con corone intrecciate di rami d'olivo in onore della dea Atena in segno di fratellanza e onore [2].

I Greci conoscevano diverse varietà di olivi selvatici cui davano nomi diversi, agrielaia, kòtinós, phulia, anche a seconda della qualità e grado di maturazione delle olive da cui si traeva l'olio. I Romani, invece, le riunivano tutte sotto la denominazione oleaster, che è poi quella passata nel vocabolario botanico moderno.

Presso gli antichi popoli italici l'olivo simboleggiava la fertilità dell'uomo e della terra e anche a Roma era venerata come pianta sacra. È facile comprendere perché questa pianta abbia attraversato i secoli rivestita di un'aura di sacralità: l'olio non solo serviva come condimento ma la sua morchia bruciata era ricco concime, gli oli più pesanti davano luce alle lampade, mentre il suo legno prezioso poteva essere bruciato solo sull'altare degli dei. L'olivo si lega così indissolubilmente al progredire della civiltà mediterranea che durante il I sec. a.C. nelle terre romane del bacino mediterraneo si coltivano olivi e viti con tecniche d'avanguardia; infatti furono i primi a realizzare gli strumenti per la spremitura delle olive e a perfezionare la tecnica della conservazione dell'olio che rimasero sostanzialmente invariati per secoli.

I Romani, che riconoscevano all'olio molteplici valenze, ne apprezzavano in modo particolare le qualità terapeutiche. Durante la stagione invernale veniva distribuita ai soldati una dotazione di olio, che veniva da loro usata per proteggersi dal freddo, ungendosi.

Ma a partire dal tardo impero (IV sec. a.C.) la storia del bacino mediterraneo si avvia verso un lungo periodo di guerre e carestie; si produce poco e in regime autarchico e anche l'olivicoltura ristagna. La crisi generale dell'Impero romano, prossimo allo sfaldamento, fu accompagnata dalla crisi del mondo agricolo. Le stesse strutture della proprietà fondiaria risultarono sconvolte dalla commistione di attività agricole e pastorali in terreni coltivati e incolti, mentre l'invasione longobarda spazzò via la maggior parte del ceto degli antichi proprietari. Nel periodo della decadenza dell'Impero romano e delle invasioni barbariche la coltura dell'olivo viene mantenuta in vita dall'opera di ordini religiosi come i Benedettini e i Cistercensi: in seguito, nell'alto Medio Evo, l'olio di oliva divenne assai raro e prezioso, tanto da essere considerato in alcuni casi come denaro contante e ad essere presente solo sulla mensa dei ricchi e degli ecclesiastici.

La coltivazione dell'olivo ebbe scarsa diffusione anche nei secoli XI, XII e parte del XIII, ma non perché non se ne conoscesse il valore, ma perché considerato bene raro dall'uso parsimonioso.

In Toscana il Comune di Siena nel 1428 invitava i lavoratori agricoli a piantare "...ulivi e degli'altri arbori domestici..." definendo l'olio come una delle quattro cose più necessarie alla vita dell'uomo. In quel periodo si ha notizia che in Maremma la coltivazione dell'olivo si concentrava nelle aree dominate dai radi castelli, mentre l'ospedale senese di Santa Maria della Scala possedeva a Civitella un oliveto che veniva dato in affitto per due quintali e mezzo di olio all'anno. Nel comune di Scarlino, appartenente al principato di Piombino, all'inizio del Cinquecento il frantoio comunale produceva una non trascurabile quantità di olio a dimostrazione di una realtà produttiva significativa. A partire dalla fine del Medio Evo il panorama dei paesi affacciati sul Mediterraneo tornò a coprirsi di oliveti ed il commercio oleario raggiunse nuovamente l'importanza dei traffici antichi.

Nel Rinascimento prima e sotto i Lorena poi, in Toscana, l'olivicoltura ebbe un ulteriore incremento con la realizzazione di piantagioni prevalentemente in filari alternati a coltivazioni di cereali e di vite. E' dopo la metà del secolo scorso che si diffondono gli oliveti specializzati considerati unica coltura e finalizzati alla produzione di olio di alta qualità; ed è così che insieme all'olivo si è diffusa nel mondo una civiltà alimentare, frutto della saggezza e dell'esperienza di 6000 anni, riscoperta dalla scienza contemporanea e battezzata Dieta Mediterranea.

Oltre che in Toscana, l'ulivo si diffuse notevolmente anche nelle campagne marchigiane con notevoli ripercussioni sull'economia rurale dell'epoca. L'olio marchigiano, seppur con una produzione limitata rispetto ad altre regioni, ha goduto fin dall'antichità una reputazione invidiabile.

La sua eccelsa qualità viene menzionata già dal 1228, quando le navi marchigiane che approdavano sul Po per poter commerciare, pagavano pedaggio in olio (25 libbre) al quale veniva conferito valore maggiore rispetto a quello proveniente da altre regioni italiane.

Nel 1300 l'olio marchigiano, detto "olio della Marchia", veniva venduto anche a Firenze e Venezia, dove era molto ricercato e il suo prezzo elevatissimo in virtù dell'aroma e del sapore, qualità intatte ancora oggi.

Tra il 1600 e il 1700 la coltivazione dell'olio quasi scomparve nelle Marche a causa di qualche cambiamento climatico che rese impossibile la crescita dell'ulivo.

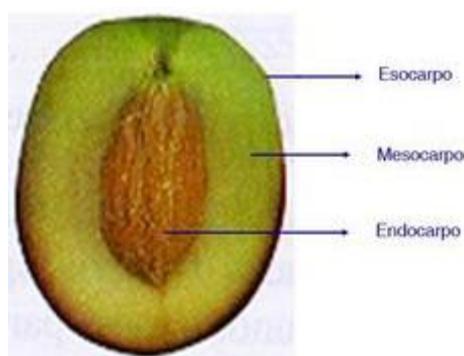
## 2.2 OLIO DI OLIVA E COMPOSIZIONE CHIMICA

L'olio d'oliva si ricava da frutti di diverse varietà del genere *Olea*, soprattutto della specie *Olea europea*.

Il frutto (oliva) prende anche il nome di drupa ed è costituito dalle seguenti parti:

- Buccia (Epicarpo): 1%
- Polpa (Mesocarpo): 70%
- Nocciolo (Endocarpo): 29%

Nell'endocarpo, legnoso, è racchiuso il seme contenente l'embrione.



**Fig. 1 Struttura della drupa.**

In generale l'oliva al giusto grado di maturazione presenta la seguente composizione:

- Acqua 40 – 50 %
- Olio 15 – 36 %
- Sostanze azotate 1.5 – 2 %
- Composti non azotati 18 – 24 %
- Fibra grezza 5 – 8 %
- Ceneri 1 – 2 %

Le caratteristiche di un olio d'oliva dipendono da molti fattori: sistema di coltivazione, ambiente pedo-climatico, periodo e sistema di raccolta delle olive, tecnologie e modalità di trasformazione e conservazione del prodotto.

Gli olii d'oliva si differenziano sia per le caratteristiche organolettiche (aroma, odore, sapore) sia per le caratteristiche chimiche (composizione, acidità ecc): molti di questi fattori non sono modificabili poiché tipici di un determinato luogo, mentre altre sono facilmente adattabili (come per esempio la tipologia di cultivar, le tecniche colturali e le modalità di estrazione).

L'olio d'oliva è un grasso che, a temperatura ambiente, si presenta in forma liquida, di colore giallo-verde e di sapore gradevole. La sua densità è variabile, ma alla temperatura di 15° è di circa 0,916, quindi minore dell'acqua.

Dal punto di vista dei costituenti chimici, l'olio è formato da:

- **FRAZIONE SAPONIFICABILE**, che costituisce circa il 98-99% del campione, ed è costituita da trigliceridi, esteri della glicerina con acidi grassi saturi, monoinsaturi, polinsaturi.
- **FRAZIONE INSAPONIFICABILE**, che rappresenta il restante 1-2% e include tutte quelle sostanze che non subiscono alcuna alterazione se sottoposte all'azione di alcali concentrati e che, seppur presenti in minima quantità, influiscono in maniera determinante sulla qualità merceologica, nutrizionale ed organolettica dell'olio.

## 2.2.1 FRAZIONE SAPONIFICABILE

Contiene almeno una molecola di acido grasso con legame estereo o ammidico e che può quindi essere liberata per idrolisi. La frazione saponificabile è composta prevalentemente da trigliceridi, questa frazione dà all'olio la sua natura di “prodotto grasso”.

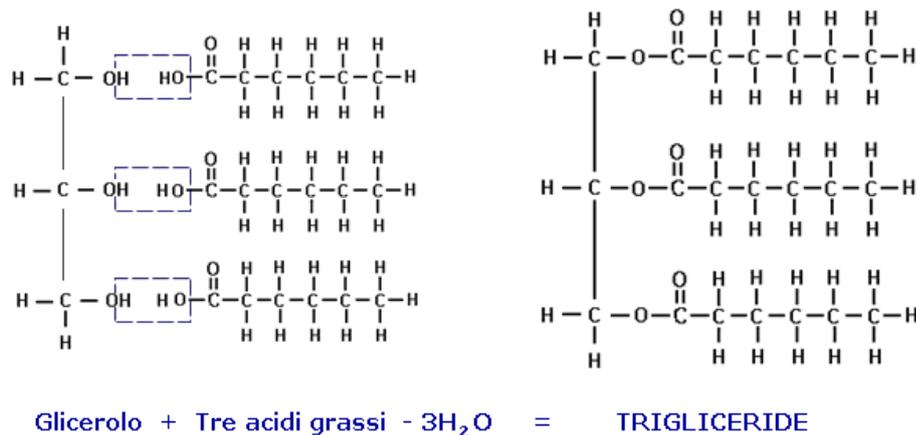


Fig. 2 Composizione di un trigliceride

I trigliceridi sono formati dall'esterificazione dei tre gruppi ossidrilici del glicerolo con altrettanti acidi grassi: se questi acidi grassi sono tutti e tre uguali si tratta di trigliceridi semplici, altrimenti di trigliceridi misti. La diversa natura e tipologia di acido grasso influenza notevolmente la composizione finale del trigliceride e, a sua volta, quella dell'olio: infatti ogni olio ha la sua composizione specifica e rappresentativa e da essa viene identificato. Inoltre la composizione percentuale degli acidi grassi all'interno del trigliceride è totalmente indipendente dalla composizione percentuale dell'acido grasso stesso in ogni tipologia di olio: in altri termini due oli ottenuti da origine botaniche diverse (come per esempio da olive e nocciole) possono anche avere una composizione percentuale di acidi grassi simili, ma si differenzieranno dalla distribuzione percentuale di ciascun acido nelle tre diverse posizioni dello scheletro glicerolico. L'utilità di questa caratteristica sta nel poter stilare una “carta d'identità” unica e peculiare di ogni tipo di olio e di poterlo quindi salvaguardare dal punto di vista legislativo: infatti il tipo e la configurazione del trigliceride sono determinanti nel determinare le caratteristiche dell'olio, come per esempio sapore, consistenza e digeribilità.

I trigliceridi e i loro acidi grassi sono rappresentati come catene lineari (alifatiche) più o meno lunghe di atomi di carbonio: a seconda della presenza o meno di doppi legami tra gli atomi di carbonio, gli acidi grassi si suddividono in “saturi” (senza doppi legami) e “insaturi”. Proprio la presenza di questi doppi legami rende l’olio più o meno attaccabile dall’ossigeno.

A seconda che presentino o meno nella struttura carboniosa uno o più doppi legami, gli acidi grassi insaturi si dividono in:

- *ACIDI GRASSI MONOINSATURI*: sono caratterizzati da un solo doppio legame. Appartengono a questo gruppo l’acido oleico, il più abbondante nell’olio d’oliva (55-80%). Il contenuto di acidi grassi monoinsaturi è l’elemento che contraddistingue l’olio d’oliva rispetto agli altri acidi grassi di origine vegetale.
- *ACIDI GRASSI POLINSATURI*: sono caratterizzati da due o più doppi legami, il che conferisce all’olio una maggiore fluidità, ne abbassa il punto di fusione ma lo rende anche più reattivo, meno stabile chimicamente e più facilmente attaccabile dall’ossigeno. Tra gli acidi grassi polinsaturi prevalgono quelli a 18 atomi di carbonio come l’acido linoleico e linolenico, detti anche acidi grassi essenziali (AGE o EFA) per l’impossibilità di essere sintetizzati dal nostro organismo. Si tratta comunque di sostanze indispensabili per la vita dell’uomo (per esempio per la struttura delle membrane cellulari) e dobbiamo dunque introdurli necessariamente attraverso la dieta, l’olio d’oliva ne è una fonte importante.

La diversa proporzione di acidi grassi saturi, monoinsaturi e polinsaturi dipende da diverse caratteristiche, quali l’area geografica di appartenenza la tipologia di cultivar, le condizioni climatiche, la varietà e il grado di maturazione della drupe [3].

**Tabella 1: Composizione % degli acidi grassi nell'olio extravergine d'oliva**

ACIDI	SIMBOLO	QUANTITA' [%]	FORMULA
<b>Palmitico</b>	(C <sub>16</sub> )	7.5-20	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> -COOH
<b>Palmitoleico</b>	(C <sub>16:1</sub> )	0.5-10	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -CH=CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -COOH
<b>Stearico</b>	(C <sub>18</sub> )	0.5-5	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>16</sub> -COOH
<b>Oleico</b>	(C <sub>18:1</sub> )	55-80	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH=CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -COOH
<b>Linoleico</b>	(C <sub>18:2</sub> )	3.5-21	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CH=CH-CH <sub>2</sub> -CH=CH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> - COOH
<b>Linolenico</b>	(C <sub>18:3</sub> )	0.3-0.5	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> -CH=CH) <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -COOH
<b>Arachino</b>	(C <sub>20</sub> )	0-0.8	CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>18</sub> -COOH

Come è possibile notare osservando la seconda colonna della tabella, si tratta di una serie di composti con un numero pari di atomi di carbonio all'interno della catena: questo avviene perché la biosintesi degli acidi grassi prevede una progressiva addizione di monomeri a due atomi di carbonio (sintesi dell'acetil-CoA).

Infine possiamo notare come, per quanto riguarda i composti insaturi, nell'olio d'oliva si riscontrano principalmente catene isomerizzate cis.

Queste condizioni vengono alterate con processi industriali di esterificazione e raffinazione, che provocano la formazione di catene isomerizzate trans. In questo modo è possibile riconoscere un olio industrialmente trattato, differenza che probabilmente da punto di vista olfattivo e sensoriale è impossibile notare.

La parte saponificabile dell'olio di oliva è composta da discrete quantità di acilgliceroli parziali, che vengono generati da un'incompleta biosintesi triglicerolica o da fenomeni idrolitici durante i processi di lavorazione della drupe.

In un olio d'oliva extravergine la loro concentrazione è di circa 1-2.8% e sono molto importanti per poter risalire all'entità e alle condizioni di conservazioni dell'olio stesso, infatti, l'1,2-diacilglicerolo è presente in alte percentuali nell'olio "fresco", mentre, con il passare del tempo, questa percentuale si abbassa e la molecola tende a isomerizzare verso il 1,3-diacilglicerolo, che è una forma più stabile.

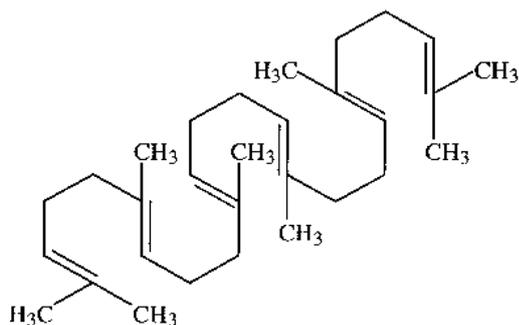
## 2.2.2 FRAZIONE INSAPONIFICABILE

Questa frazione è costituita da un numeroso gruppo di componenti minori (circa 220 sostanze) appartenenti a diverse classi, che complessivamente costituiscono circa l'1-3% del totale. Si tratta di idrocarburi, steroli, steroidi, fenoli, polifenoli, squalene, acidi alifatici, clorofilla e varie vitamine: questi svolgono un ruolo molto importante sia dal punto di vista nutrizionale salutistico (in quanto sono per lo più costituenti indispensabili per le normali attività metaboliche e per lo stato di benessere dell'organismo umano) che dal punto di vista organolettico (sapore, odore, colore). Sono molto determinanti sulla capacità di autoconservazione dell'olio, oltre che rappresentare un prezioso riferimento analitico per il controllo di genuinità del prodotto. La quantità e qualità di questi componenti dipende da una moltitudine di fattori, quali lo stato di conservazione della drupe, la sua varietà, lo stato di salute della pianta e persino dalle condizioni climatiche e geografiche in cui la pianta cresce.

I principali elementi che compongono questa frazione sono:

### 2.2.2.1 IDROCARBURI:

Costituiscono da soli circa il 50% dell'intera frazione insaponificabile dell'olio, di cui ne rappresentano circa lo 0.5-1%. Si dividono in saturi ed in insaturi e probabilmente si formano come prodotti collaterali durante la sintesi degli acidi grassi. Tra gli idrocarburi insaturi quello presente in quantità maggiore è lo squalene (0.7-12 g/Kg), chiamato così per essere presente soprattutto nell'olio di fegato degli squali, ma anche in vegetali come i semi di amaranto, crusca di riso, germe di grano e olive. Tutti gli organismi superiori producono squalene, inclusi gli esseri umani: è infatti il precursore biochimico degli steroidi e del colesterolo, e svolge un'importante azione fisiologica nel ricambio umano (quindi nella crescita) oltre che essere chemio protettivo verso particolari forme cancerose. Infine protegge l'intestino dall'ossidazione legata alla luce e quindi dall'invecchiamento.



**Fig. 3 Struttura chimica dello squalene**

Tra gli idrocarburi, in percentuali molto minori, troviamo alcune catene da C13 a C30 della famiglia degli alcani ed alcuni alcheni, per un totale di 150-200 mg/kg. Infine alcuni idrocarburi, come gli IPA (idrocarburi policiclici aromatici) possono essere presenti in tracce e sono indice di inquinamento ambientale, a causa della vicinanza degli oliveti a insediamenti industriali o autostrade.

#### 2.2.2.2 STEROLI

Gli steroli sono sostanze naturalmente presenti negli alimenti che assumiamo giornalmente, in particolare nell'olio extravergine di oliva, nella verdura, nella frutta, nella frutta secca e nei cereali, anche se in piccole quantità (2-3% del totale). Sono composti simili al colesterolo e sono anch'essi sintetizzati in natura a partire dallo squalene. La loro analisi permette di accertare la genuinità del prodotto: infatti la frazione sterolica di un olio di oliva è tipica dello stesso e non confondibile con quella di altri oli, sia per qualità che per quantità. Questo permette riconoscere la presenza di frodi (aggiunta di altri oli) nell'olio d'oliva. La composizione degli steroli, sia qualitativa che quantitativa, non è influenzata da eventuali variazioni genetiche apportate alla pianta, al contrario di quanto accade per il contenuto di acidi grassi.

La frazione sterolica comprende diversi composti che apportano molteplici benefici all'organismo umano: hanno infatti un'azione regolatrice sull'attività cellulare e sul metabolismo, riducono l'assorbimento del colesterolo a livello intestinale, funzionano da antiossidanti e sono inibitori del processo di irrancidimento dell'olio.

Tutti gli steroli hanno una struttura composta da quattro anelli condensati (tre cicloesanicici e un ciclopentanicico), quasi tutti contano un gruppo ossidrilico in posizione 3 e una lunga catena alifatica in posizione 17 (struttura tipica del colestano, che è alla base di tutti gli altri componenti della famiglia) e si differenziano tra di loro per lo più per la posizione e il numero dei doppi legami. Gli steroli sono, infine, tra i responsabili della caratteristica dell'olio di essere resistenti all'ossidazione e alla polimerizzazione. Infatti molti di questi steroli presentano un gruppo lungo la catena alifatica in grado di subire l'estrazione di un atomo di idrogeno da parte di un gruppo perossido, e di terminare quindi la fase di propagazione della reazione radicalica.

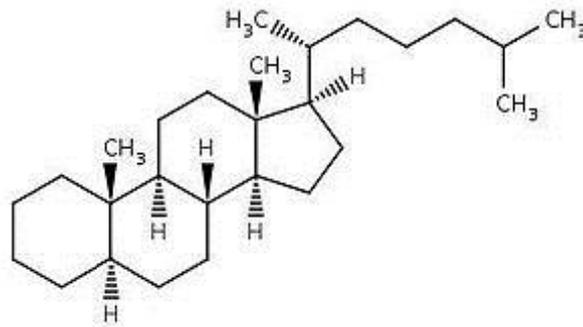
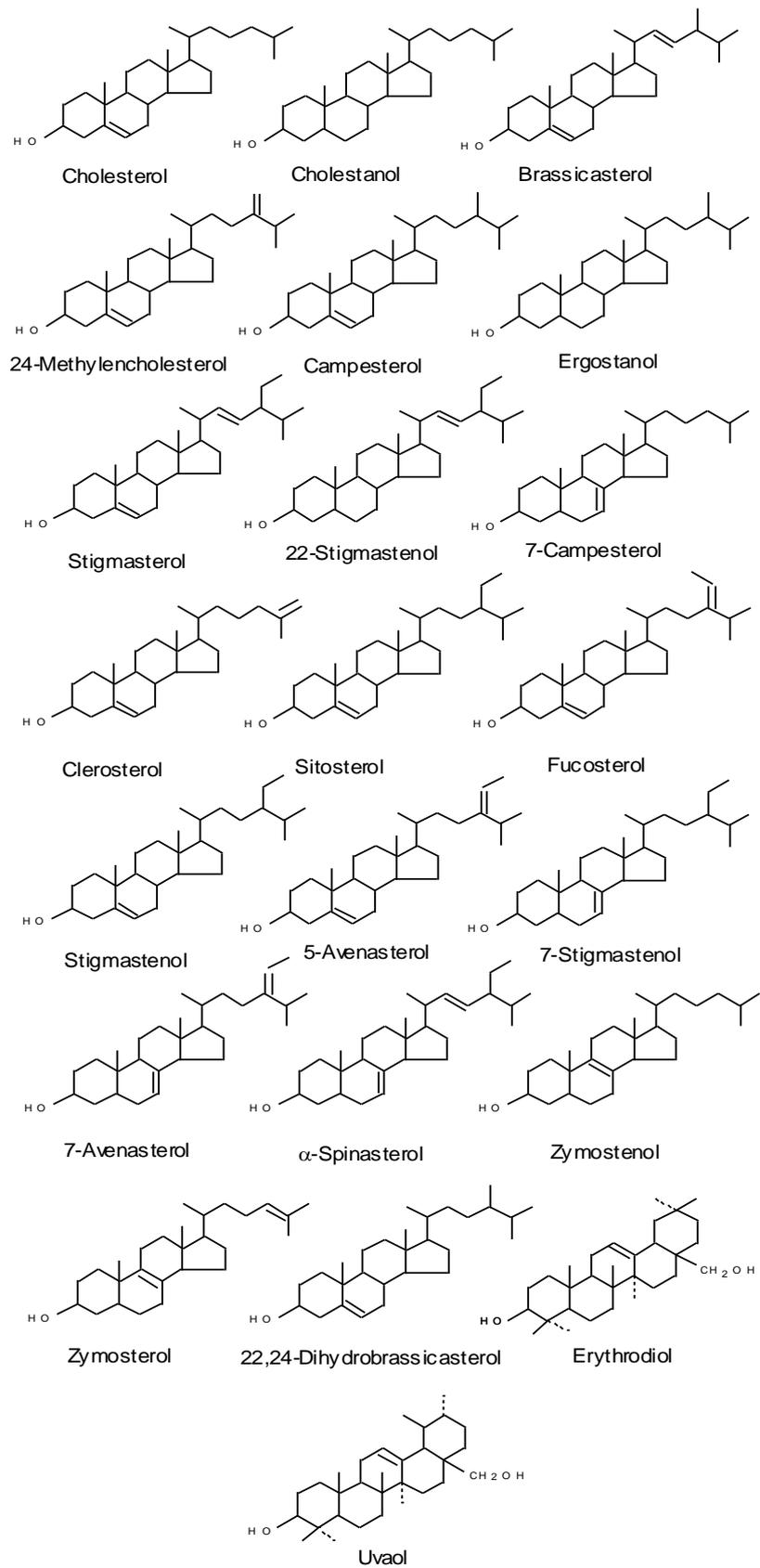


Fig. 4 Struttura chimica del colestano



**Fig. 5** Strutture dei principali steroli (e dialcoli triterpenici)

### 2.2.2.3 ALCOLI

Gli alcoli sono in genere molecole di piccole dimensioni e di bassa tensione di vapore: questa loro caratteristica permette loro di evaporare a basse temperature ed entrare più facilmente in contatto con le cellule olfattive, sollecitando la sensazione odorosa caratteristica dell'olio. Sono sostanze inoltre molto labili chimicamente, per cui man mano che le olive arrivano a un periodo sempre più lungo di maturazione l'olio tende a perdere odori; questo avviene anche per l'olio che inevitabilmente invecchia.

Possiamo dividere la classe degli alcoli in due principali categorie:

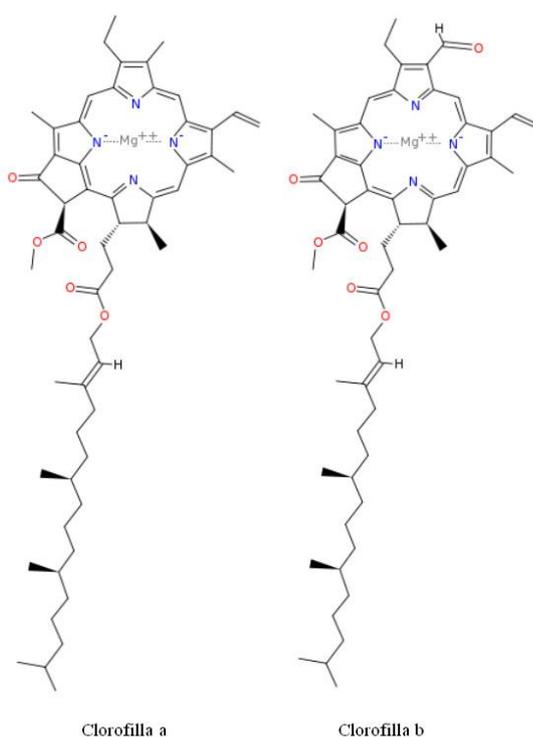
- Alcoli triterpenici: tra cui si ricordano i principali cicloartenolo e metilencicloartenolo, insieme al  $\beta$ -sitosterolo, che si trova come componente caratteristico e predominante nella frazione sterolica, ostacolano l'assorbimento del colesterolo nell'intestino. Essi sono precursori biogenetici degli steroli.
- Alcoli alifatici, sia lineari che a catena (sia a numero pari che a numero dispari), sia saturi che insaturi. Sono presenti nell'olio a percentuali molto basse e fanno parte degli elementi che danno all'olio la sua classica profumazione, ma sono difficilmente isolabili agli altri aromi da cui l'olio è composto.

### 2.2.2.4 PIGMENTI COLORATI

I composti che conferiscono all'olio il suo colore sono principalmente caroteni e clorofille, oltre che ai relativi prodotti di decomposizione.

- I caroteni sono circa ottanta ed hanno colore arancione-rosso. Il più importante di essi è il  $\beta$ -carotene, che funge da buon antiossidante quando l'olio si trova alla luce, in quanto disattiva il meccanismo di produzione a catena di radicali liberi da parte dell'ossigeno, portando ad una degradazione ossidativa che porta ad una vasta gamma di sottoprodotti. Inoltre il  $\beta$ -carotene è anche il precursore della vitamina A: questa vitamina tal quale nell'olio non esiste, ma l'enzima carotenasi, presente nel fegato, causa la scissione del  $\beta$ -carotene in esso presente, producendo due molecole di vitamina A. Il  $\beta$ -carotene è per questo definito Provitamina A.

- La clorofilla è una miscela di due sostanze: la clorofilla A di colore verde-blu e la clorofilla B di colore verde-giallo. Questi due pigmenti contribuiscono al colore verde dell'olio fresco. Durante la conservazione la clorofilla si degrada e la riduzione del colore verde causa il viraggio del colore dell'olio verso il giallo. Inoltre la clorofilla, la cui quantità può variare in rapporto a vari fattori, svolge un'azione di eccitamento sul metabolismo, di stimolo sulla crescita cellulare e sulla produzione del sangue e di accelerazione dei processi di cicatrizzazione. La clorofilla, in assenza di luce, protegge l'olio dall'ossidazione, mentre quando l'olio viene esposto alla luce ha un effetto ossidante, e peggiora quindi sia le caratteristiche organolettiche dell'olio, sia la stabilità e conservabilità dell'olio: per questo motivo la concentrazione di  $\beta$ -carotene è molto importante, in quanto è più facilmente ossidabile della clorofilla e la protegge così da fenomeni di foto distruzione.



**Fig. 6: struttura delle clorofilla a e della clorofilla b**

La presenza di doppi legami coniugati influenza molto la lunghezza d'onda massima di assorbimento della molecola, alzandola: la colorazione finale è quindi strettamente connessa alla composizione chimica del prodotto stesso, che va dal giallo chiaro al verde intenso molto scuro, passando dal giallo oro, il giallo bruno, il verdolino e il verde brillante.

### 2.2.2.5 FENOLI

I polifenoli conferiscono all'olio stabilità, qualità nutrizionali e salutistiche oltre che peculiarità sensoriali. Le proporzioni tra i vari polifenoli presenti nell'olio mutano quindi sensibilmente le qualità nutraceutiche e sensoriali dello stesso.

Si tratta di una famiglia di composti assai variegata e diversificata: i polifenoli infatti non sono tutti uguali, ciascuno ha caratteristiche proprie che possono andare ad influenzare il profilo organolettico e nutrizionale dell'olio. La prima distinzione va fatta tra fenoli lipofici (i tocoferoli) e idrofili.

- **TROCOFEROLI:** si ritrovano anche in altri oli e grassi di origine vegetale, e nei semi. Appartengono al gruppo di composti denominati vitamina E. In natura esistono otto composti strettamente affini tra loro dal punto di vista chimico ed a seconda della presenza di una catena satura o insatura, questi composti vengono divisi in due gruppi: i tocoferoli ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) ed i tocotrienoli ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  in un primo tempo detti vitamina T), che differiscono per il numero e per la posizione dei metili sostituiti.

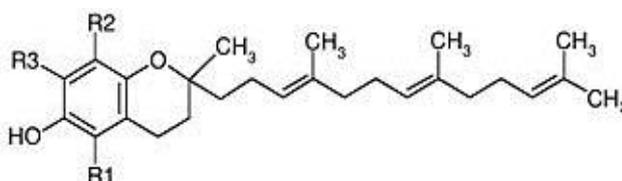


Fig. 7: Struttura di base dei Tocotrienoli

Tabella 2: sostituenti dei principali stocotriifenoli

TROCOFENOLO	R1	R2	R3
$\alpha$ - TROCOTRIENOLO	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
$\beta$ - TROCOTRIENOLO	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
$\gamma$ - TROCOTRIENOLO	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
$\delta$ - TROCOTRIENOLO	H	H	CH <sub>3</sub>

L' $\alpha$ -tocoferolo è il componente principale (circa 95% del totale) ed è quello che possiede la massima attività biologica e ad esso ci si riferisce per valutare l'attività degli altri tocoferoli  $\beta$ -,  $\gamma$ - ( che compongono principalmente il restante 5% del totale).

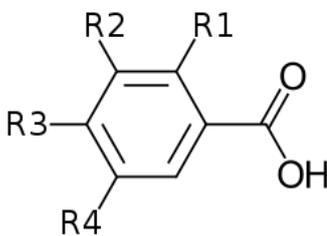
I tocoferoli, chiamate sostanze vitamere, sono importanti antiossidanti: migliorano infatti la stabilità di conservazione e di lavorazione di molti materiali contenenti grassi e vengono aggiunti come antiossidanti durante la lavorazione dei prodotti alimentari. Il loro assorbimento avviene prevalentemente nella parte mediale dell'intestino tenue per diffusione passiva. Come tutte le vitamine liposolubili anche l'assorbimento del tocoferolo necessita un'adeguata emulsione e solubilizzazione micellare. L'efficienza di assorbimento è bassa e variabile (20÷60%) e diminuisce all'aumentare dell'apporto.

- *FENOLI IDROFILICI*: conferiscono una spiccata importanza nutrizionale ed una qualità salutistica legata alle proprietà antiossidanti e rimangono una caratteristica peculiare dell'olio d'oliva. Nell'oliva intera se ne possono distinguere ben 7 diverse sottofamiglie: antocianine, flavonoidi, falvoni, acidi fenolici, alcoli fenolici, secoridoidi e acidi idrossicianimidici, mentre, nell'olio extra vergine di oliva, riscontra la presenza di acidi fenolici, alcoli fenolici, secoridoidi, lignani e flavoni. Ciascuna delle sottofamiglie citate si distingue dalle altre per composizione chimica e reattività, oltre che, presumibilmente, per caratteristiche organolettiche apportate. Questa differenza di composizione dipende dal processo di spremitura della drupe, durante la quale le cellule vegetali che compongono l'oliva si disgregano e si mescolano, dando origine ad una purea. Gli enzimi idrolitici, particolarmente attivi e presenti nelle drupe più mature, vengono a contatto con questa purea e idrolizzano le funzionalità glicosidiche ed esteree liberando la frazione fenolica e le strutture saccaridi che presenti [4].

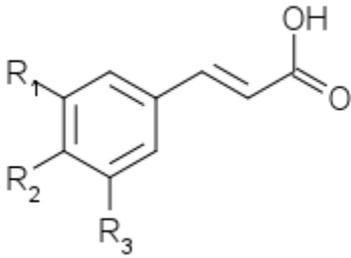
### 2.2.2.6 ACIDI FENOLICI

Gli acidi fenolici (o acidi fenolcarbossilici) sono quei composti organici che contengono almeno un gruppo ossidrilico fenolico e un gruppo carbossilico, ma non tutti i composti classificati come tali hanno questa struttura chimica: infatti alcuni vengono chiamati in questo modo solo per la loro funzione antiossidante, come per esempio l'acido cinnamico e l'acido enolico. Altri acidi fenolici sono l'acido caffeico, gli acidi orto e para cimarico, l'acido ferulico, l'acido gallico, l'acido omovallico, l'acido 4-idrossibenzoico e 4-idrossifenilacetico, l'acido sinapico e quello siringico.

**Tabella 3: struttura e sostituenti dei principali acidi fenolici**

NOME	R1	R2	R3	R4	FORMULA
acido paraidrossibenzoico	H	H	OH	H	
acido protocatecuico	H	OH	OH	H	
acido vanillico	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	
acido gallico	H	OH	OH	OH	
acido siringico	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	
acido salicilico	OH	H	H	H	
acido gentisico	OH	H	H	OH	

**Tabella 4: struttura e sostituenti dei principali acidi idrossicinnamici**

NOME	R1	R2	R3	FORMULA
acido cumarico	H	OH	H	
acido caffeico	OH	OH	H	
acido ferulico	OCH <sub>3</sub>	OH	H	
acido sinapico	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	
E-anetolo	H	OCH <sub>3</sub>	H	

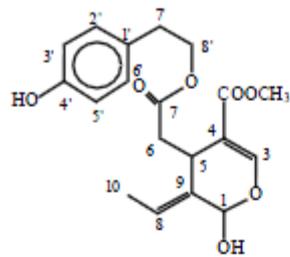
#### 2.2.2.7 SECOIRIDOIDI

I secoiridoidi maggiormente presenti nell'olio extra vergine di oliva sono l'oleuropeina aglicone e le forme dialdeidiche del ligstroside aglicone (p-HPEA-EDA) e dell'oleuropeina aglicone (3,4-DHPEA-EDA).

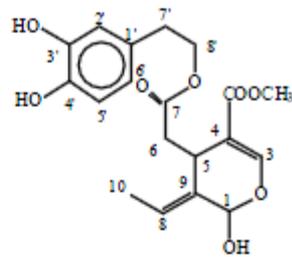
I secoridoidi sono dei composti esclusivi delle piante appartenenti alla famiglia delle oleuropeace che includono l'olivo e, di conseguenza quindi il frutto dell'oliva e l'olio vergine di oliva. Questi composti sono caratterizzati dal punto di vista chimico dalla presenza di acido elenolico e dai suoi derivati. I più abbondanti nell'oliva sono la forma dialdeidica dell'acido decarbossimetilenoico legata al (3,4-Diidrossifenil)etanolo(3,4-DHPEA), la forma dialdeidica dell'acido decarbossimetil elenolico legata al (p-idrossifenil)etanolo(p-HPEA) e un isomero dell'oleuropeina aglicone 3,4-DHPEA-EA.

Le loro concentrazioni sono generalmente basse nell'olio appena estratto e tendono ad aumentare durante lo stoccaggio, ciò è da imputare a processi di idrolisi a carico dei secoridoidi quali 3,4-DHPEA-EDA, p-HPEA-EDA e 3,4-DHPEA-EA (le strutture molecolari di questi composti contengono 3,4-DHPEA e p-HPEA).

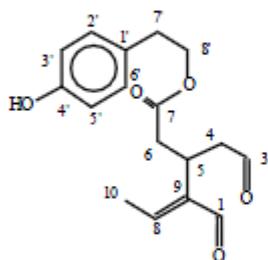
Altri secoiridoidi sono presenti in quantità molto ridotte.



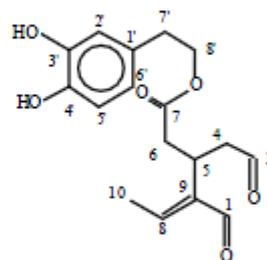
**Ligustroside aglicone**



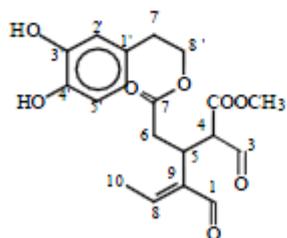
**3,4-DHPEA-EA**



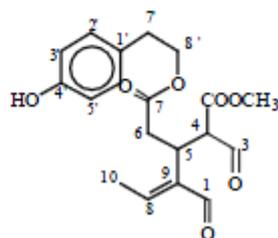
**p-HPEA-EDA**



**3,4-DHPEA-EDA**



**Forma dialdeidica dell'oleuropeina  
aglicone**

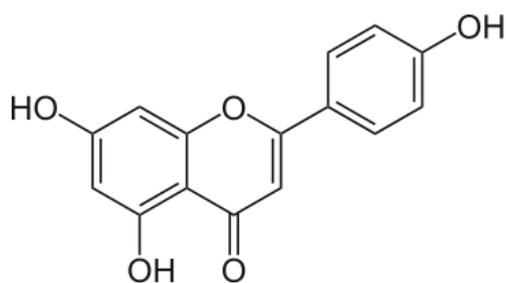


**Forma dialdeidica del ligustroside  
aglicone**

**Fig. 8: secoridoidi comuni nell'olio d'oliva**

### 2.2.2.8 FLAVOINOIDI

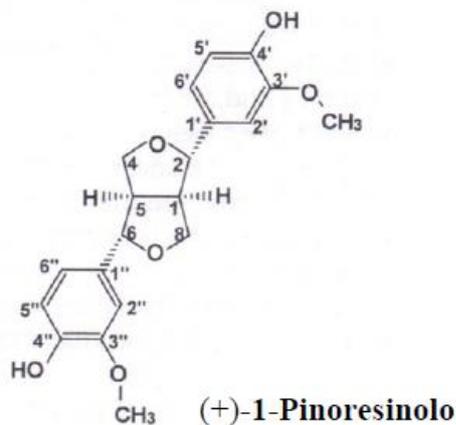
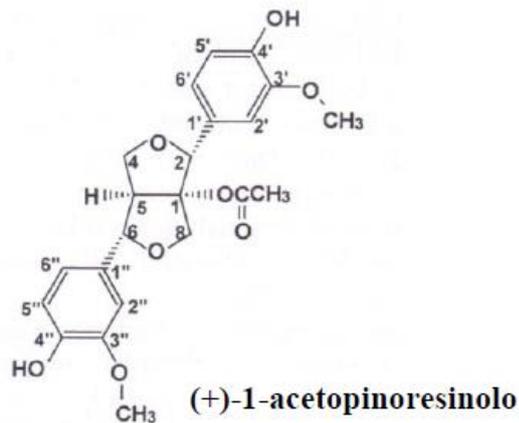
I flavonoidi sono dei composti polifenolici che possiedono 15 atomi di carbonio, derivano dal flavone e tutti condividono certe proprietà. Sono principalmente idrosolubili, sono di solito presenti nelle piante come glicosidi e nella stessa pianta un aglicone flavonoidico può esistere in combinazione con diversi zuccheri. I composti flavonoidi non sono facilmente idrolizzabili, sono fino a 20 volte più antiossidanti dell'alfa-tocoferolo e agiscono in maniera sinergica anche con acido ascorbico. Abbassano la pressione arteriosa, riducono l'aggregazione piastrinica, possono aiutare a ridurre i rischi di danni alle coronarie e sono antivirali e antibatterici. Nell'olio ritroviamo principalmente la luteolina e l'apigenina (come mostrato in Fig. 9).



**Fig. 9: struttura dell'apigenina**

### 2.2.2.9 LIGNANI

I lignani sono sostanze di origine naturale, sono contenuti nei tessuti legnosi delle piante e nei cereali: tramite questi composti le piante si difendono dall'aggressione dei microrganismi e hanno notevoli proprietà antibatteriche e antitumorali (soprattutto preservano dal cancro alla prostata, al seno e al colon). Si tratta di composti fenolici formati dall'unione di due molecole di fenilpropano, di cui (+)-1-acetossipinoresinolo e (+)-1-pinoresinolo sono i più abbondanti nell'olio.



**Fig. 10: struttura chimica dell'(+)-1-acetossipinoresinolo e dell' (+)-1-pinoresinolo**

Si può quindi indicare come contenuto globale di polifenoli la somma delle quantità di tocoferoli e fenoli idrofilici (e tutte le classi in cui si dividono) e determinare il valore espresso come mg di acido gallico: in media questo valore varia tra i 40 e i 900 mg/Kg. L'ampiezza dell'intervallo dipende dai fattori che influenzano la quantità di polifenoli presenti all'interno di ogni singolo olio: dal cultivar all'ambiente geografico, alle condizioni ambientali a quelle di stoccaggio, dalla produzione alla conservazione del prodotto. Tutti i polifenoli hanno spiccate capacità antiossidanti, ma alcuni lo sono più di altri: il diidrossitirosolo (3,4-DHPEA) [5, 6, 7] e gli altri composti difenolici, come il 3,4-DHPEA-EDA, lo sono molto più del tirosolo e degli altri tocoferoli [8, 9].

### 2.2.2.10 METALLI

L'analisi elementare dell'olio d'oliva è un'importante mezzo per determinare con certezza la genuinità e la purezza dell'olio in questione, oltre allo stato di conservazione dello stesso, dove per genuinità si intende soprattutto che l'olio non sia stato tagliato con altri oli o inquinato da sostanze diverse (adulteranti) [10].

In riferimento alla contaminazione dell'olio extra vergine di oliva da parte di metalli pesanti va sottolineato come questa possa essere di natura ambientale e verificarsi lungo tutta la filiera alimentare, dalla produzione primaria fino al consumo. In fase di gramolazione, ad esempio, la normativa europea consente l'impiego di talco come coadiuvante tecnologico per aumentare la resa, ma questo potrebbe rilasciare metalli pesanti. La presenza di metalli nell'olio extra vergine di oliva, oltre a rappresentare un problema di sicurezza alimentare, può avere ripercussioni negative anche sulla conservazione, in quanto essi catalizzano il fenomeno ossidativo e la decomposizione degli idroperossidi che porta alla formazione di radicali liberi: un olio extra vergine che presenta un elevato contenuto di metalli tenderà quindi a irrancidire più rapidamente. La tossicologia dei metalli pesanti è stata studiata estesamente ed i loro effetti sulla salute sono periodicamente riesaminati da organismi internazionali, come l'Organizzazione Mondiale della Sanità e il Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additions (JECFA), che fissano poi i "limiti cautelativi d'assunzione su base settimanale" (PTWI4). Generalmente tali composti inorganici sono presenti solo in tracce (quindi nell'ordine dei ppm per i metalli facente parti degli oligoelementi e praticamente zero per quelli che sono i metalli pesanti).

Alcuni metalli rivestono un ruolo considerevole nel metabolismo della pianta e non hanno significato dal punto di vista nutrizionale, ma alcuni di loro (come per esempio Cu, Fe, Ni e Mn) sono molto dannosi per la salute umana e possono derivare da una contaminazione ambientale, dall'utilizzo di pesticidi o fertilizzanti non adatti o dalla composizione del suolo. Se si esclude l'inquinamento dalle cause, la presenza di metalli nell'olio è dovuta principalmente dall'origine geografica della pianta (ovvero dalla composizione del suolo) e dagli aspetti genetici e metabolici della stessa: è quindi possibile una caratterizzazione del prodotto da un punto di vista varietale e/o geografico [11].

## 2.3 PROCESSO DI RETTIFICA DEGLI OLI

La rettifica si applica a tutti gli oli che presentano caratteristiche (acidità e proprietà organolettiche) tali da non essere idonei per la commercializzazione.

Si attua attraverso differenti operazioni:

- deacidificazione;
- demucillaginazione;
- deodorazione;
- decolorazione;
- demargarinazione.

### **Deacidificazione**

Finalizzata all'allontanamento gli acidi grassi liberi, può eseguita con diversi metodi:

- con alcali (metodo tradizionale);
- mediante neutralizzazione con alcali in presenza di solvente (metodo De Smet).

La neutralizzazione avviene in presenza di due solventi:

- **esano** – nel quale viene disciolto l'olio
- **isopropanolo in acqua** – dove si disciolgono sia l'idrossido di sodio che i saponi che si formano;
- mediante distillazione

### **Demucillaginazione**

Si effettua mediante trattamento:

- con acido solforico;
- acqua o soluzioni di elettroliti
- con terre adsorbenti.

## **Decolorazione e deodorazione**

La decolorazione è ottenuta mediante trattamento con terre adsorbenti o carbone attivo mentre la deodorazione viene effettuata per distillazione in corrente di vapore sotto vuoto (3-5 mm Hg) ad alta temperatura (200 °C).

## **Demargarinazione**

Ha lo scopo di eliminare i trigliceridi ad alto punto di fusione che possono causare intorbidamento a basse temperature.

Si effettua mediante rapido raffreddamento a 6 – 7 °C e successiva filtrazione.

## **2.4 CLASSIFICAZIONE**

Dal regolamento CE 1513/2001:

Olii di oliva vergini: “ottenuti dall’oliva meccanicamente o con altri processi fisici, in condizioni termiche tali da non alterarli e che non hanno subito nessun trattamento tranne il lavaggio, la decantazione, la centrifugazione, la filtrazione”. Sono esclusi quindi gli olii ottenuti per estrazione con solvente o con processi di riesterificazione e qualsiasi miscela con olii di altra natura.

1. Olio di oliva vergine extra: olio di gusto assolutamente perfetto con un’acidità libera, espressa in acido oleico, non superiore allo 0.8%
2. Olio di oliva vergine: olio di gusto perfetto con un’acidità libera non superiore al 2%
3. Olio di oliva lampante: olio di gusto imperfetto con un’acidità libera superiore al 2%
4. Olio di oliva: miscela di olio di oliva raffinato ed olio di oliva vergine non lampante, con un’acidità libera non superiore all’1%
5. Olio di sansa di oliva: miscela di olio di sansa di oliva raffinato ed olio di oliva vergine diverso dal lampante, con un’acidità libera non superiore all’1%.

## 2.5 ASPETTI NUTRIZIONALI

L'olio di oliva è apprezzato non solo per il suo pregio gastronomico, ma anche per le sue virtù nutrizionali e curative. La ricerca scientifica, nella sua perenne e rapida evoluzione ha portato alla luce in maniera sistematica tutto il valore medico-nutrizionale dell'olio di oliva.

In Italia circa il 40% dei decessi che si verificano annualmente è causato da malattie cardiovascolari ed il 33% circa da tumori. Nel primo caso la più consolidata evidenza nutrizionale è rappresentata dalla correlazione positiva con il livello ematico di colesterolo e trigliceridi, in particolare con il colesterolo LDL (low-density lipoprotein) riferite come le lipoproteine del "colesterolo cattivo": più colesterolo cattivo è presente nel sangue, tanto più probabile sarà incorrere in una di queste malattie cardiovascolari poiché esso trasporta il colesterolo dal fegato alle cellule del corpo. Una forte presenza di questo tipo di colesterolo nel sangue, infatti, può causare dei problemi perché può depositarsi sulla parete interna dei vasi sanguigni. Man mano che questi depositi crescono, i vasi sanguigni diventano sempre più ristretti; il sangue non riesce più a scorrere agevolmente e aumentano, di conseguenza i rischi di infarto. Un altro contenuto di particolari proteine riferite come le lipoproteine del 'colesterolo buono', dette HDL (high-density lipoprotein), sono invece in grado di impedire al colesterolo di depositarsi sulla parete interna dei vasi sanguigni e di avviarlo all'eliminazione, aumentando il livello di salute dell'organismo umano poiché recuperano il colesterolo dal corpo e lo trasportano al fegato. Tra gli alimenti più ricchi di grassi monoinsaturi, che fanno diminuire il livello di LDL e aumentare quello di HDL, vi è l'acido oleico, di cui l'olio d'oliva è ricchissimo: inoltre le lipoproteine LDL contenenti acido oleico sono i più resistenti all'ossidazione. Il colesterolo in eccesso viene esterificato o con acidi grassi polinsaturi o con acidi grassi monoinsaturi o, in mancanza, con acidi grassi saturi con cui forma composti insolubili (placche ateromatose che si depositano sulle arterie), ed è questa la ragione per cui la dieta deve essere ricca di acidi grassi insaturi. Tra le altre virtù, l'acido oleico protegge la mucosa gastrica, diminuisce l'escrezione di acido cloridrico, facilita l'assorbimento di vitamine liposolubili e previene la formazione di calcoli migliorando lo svuotamento biliare della cistifellea.

Passando invece alle malattie oncologiche, le evidenze generali indicano che i grassi saturi sono capaci di promuovere la progressione verso alcuni tumori, tra cui quelli al seno, al colon e alla prostata, che sono in assoluto i più frequenti: rispetto a questi, i grassi monoinsaturi (come l'acido oleico), non li promuovono affatto e la somministrazione di olio d'oliva dà luogo alla sostituzione di acidi grassi saturi alimentari con i monoinsaturi. Altri acidi grassi polinsaturi, come gli omega-6 e gli omega-3, sembrano inibire la cancerogenesi ed hanno un'elevata azione antiossidante ed antiradicalica volta a prevenire lo stress ossidativo. Tra tutti gli oli e grassi animali e vegetali di cui è costituita la dieta mediterranea, l'olio d'oliva si candida come alimenti base ed essenziale di una dieta sana ed equilibrata per via dei rapporti ottimali dei suoi costituenti.

**Tabella 5: Principali oli e grassi (vegetali e animali) con i relativi rapporti ottimali di sostituzione**

OLI E GRASSI	SATURI	MONOINSATURI	POLINSATURI
Olio di arachide	14.5-26.9	37.1-69.4	14.0-43.1
Olio di cocco	82.0-100	5.4-8.3	1.0-2.3
Olio di girasole	9.2-16.4	14.0-39.8	48.3-74.2
Olio di mais	9.9-21.9	20.2-42.7	39.9-64.0
Olio di oliva	8.0-26.5	22.0-83.4	3.5-22.0
Olio di palma	45.0-57.0	36.0-44.0	6.5-12.5
Olio di soia	11.1-20.3	17.7-26.7	55.3-66.6
Burro	53.2-67.5	20.0-27.0	3.4-5.5
Strutto	43.0	43.0	12.0

Un altro importante aspetto nutrizionale dell'olio d'oliva riguarda il suo contenuto di numerose vitamine, quali la A, la D e soprattutto la preziosa vitamina E. La vitamina E, nell'essere umano, è decisiva per il corretto funzionamento delle ghiandole, del sistema nervoso e del cuore. Una delle sue funzioni più importanti è la regolazione del metabolismo come fattore antiossidante, poiché trattiene il 50% dell'ossigeno normalmente trasformato dalle cellule e dai tessuti. E' anche, in un certo modo, un vasodilatatore naturale, favorendo così la circolazione sanguigna attraverso vene e arterie e allo stesso tempo alimentando e aumentando la massa muscolare. L'olio d'oliva è ricco, infine, di altre importanti sostanze antiossidanti quali polifenoli, fitosteroli, clorofilla e carotenoidi che esplicano un'importante azione protettiva dell'organismo.

Grazie a tutti questi suoi preziosi costituenti, l'olio d'oliva può contribuire a bloccare l'attività dei radicali liberi, i composti chimici responsabili dell'invecchiamento delle cellule, impedisce così la disidratazione della pelle e la mantiene morbida, sana ed elastica.

## 2.6 PRODUZIONE DELL'OLIO D'OLIVA

L'estrazione dell'olio d'oliva è un processo industriale di trasformazione agroalimentare complesso e articolato, che ha per scopo l'estrazione dell'olio dalle drupe dell'olivo. Tale trasformazione avviene in diverse fasi che influenzano in maniera importante la natura dell'olio stesso [12].

Le sei fasi principali del processo sono:

1. Operazioni preliminari: hanno lo scopo di preparare le olive alla lavorazione. Comprende la raccolta delle olive (a mano o con abbattitori meccanici), il loro lavaggio e separazione da foglie e rami, la loro conservazione in apposite *cassette aerate* in plastica lontane da fonti di calore e il loro avvio alla frangitura nel giro di 24-48 ore dalla raccolta: oltre questo limite di tempo, per effetto di enzimi idrolitici che operano sulla parete cellulare, si ha la perdita progressiva di costituenti fenolici e volatili presenti nell'olio e il conseguente aumento dell'acidità e del numero di perossidi.
2. Molitura (o frangitura): ha lo scopo di rompere le pareti delle cellule e far fuoriuscire i succhi cellulari e l'olio contenuti all'interno. Il prodotto di questa fase è generalmente indicato con il termine di *pasta d'olio*, composta da olio, acqua e parti solide. Durante questa fase si attivano gli enzimi presenti sia nella polpa del frutto che nel seme dello stesso: questo consente l'estrazione delle sostanze volatili responsabili dell'aroma, ma anche l'ossidazione della matrice oleica, due fattori che influenzano notevolmente le caratteristiche organolettiche del prodotto finale.
3. Gramolatura. È un rimescolamento della pasta d'olio ed ha lo scopo di *rompere* l'emulsione fra olio e acqua e facilitarne la separazione nella fase successiva.
4. Estrazione del mosto d'olio. Ha lo scopo di separare la fase liquida, l'emulsione acqua-olio, dalla fase solida, la *sansa*: la sansa è composta dai residui solidi delle bucce, della polpa, dei semi e dai frammenti dei noccioli.

5. Separazione (o chiarificazione) dell'olio d'oliva. Nella tradizione si otteneva mediante sedimentazione, ovvero lasciando depositare a lungo l'olio al riparo da sbalzi di temperatura ed eliminando i residui mediante il prelievo con mestoli da travaso.

Un ulteriore metodo per eliminare le impurità era la filtrazione: l'olio veniva fatto passare in recipienti sul cui fondo erano inserite fibre vegetali che catturavano le impurità. Anche l'olio ottenuto con i moderni sistemi di estrazione, indipendentemente dal sistema impiegato, è un olio ancora grezzo (mosto), torbido ed opalescente per le impurità. Viene quindi in genere lasciato riposare finché tutte le sostanze estranee si depositano sul fondo e poi travasato in contenitori puliti.

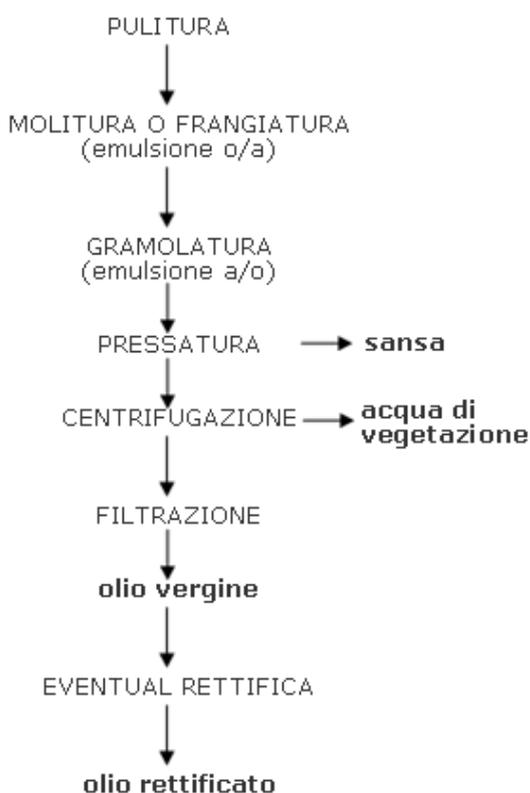
6. Conservazione: l'olio va stoccato e conservato in condizioni opportune per prevenirne l'invecchiamento e conservarne le qualità e virtù. Di solito si usano recipienti di vetro scuro o di acciaio inossidabile per prevenire i fenomeni fotossidativi; tali recipienti vanno colmati fino all'orlo per minimizzare il contatto con l'ossigeno e le derivanti reazioni di ossidazione, oppure mantenuti in atmosfera inerte (per esempio in azoto) ad una temperatura tra i 12 e i 15°C.

Attualmente esistono tre diverse tecniche di estrazione:

- Per pressione: più tradizionale e indicato per valorizzare cultivar che hanno potenzialità di pregio. Il risultato finale è un olio di qualità e dal prezzo molto alto, ma dalle elevate spese di lavorazione: si tratta infatti di un processo discontinuo e dai lunghi tempi di lavorazione.
- Per centrifugazione: metodo continuo e decisamente più veloce, ma che comporta la perdita di parte della componente polifenolica dell'olio, diminuendone le virtù nutrizionali e quindi il pregio.
- Filtrazione selettiva

### 2.6.1 METODO MEDIANTE PRESSIONE

Le olive che giungono al frantoio devono essere innanzitutto pulite da foglie, terra e



quant'altro possa danneggiare le caratteristiche organolettiche dell'olio e lo stesso impianto. Sempre a questo livello, per la produzione di oli particolarmente pregiati, si può effettuare una cernita a mano, allontanando le olive che non rispondono agli standard qualitativi.

Subito dopo viene eseguita la molitura o frangitura, cioè il loro schiacciamento con mezzi meccanici: le drupe vengono messe all'interno delle "molazze", vasche metalliche speciali dotate di 2, 3 o 4 ruote di granito che girano su sé stesse ed intorno ad un albero centrale determinando, così, lo schiacciamento dell'oliva. La frangitura ha lo

scopo di ledere le cellule della polpa, favorendo la fuoriuscita di olio dai vacuoli e la frantumazione del nocciolo. Quest'ultimo aspetto è molto importante perché, essendo il nocciolo dotato di un guscio legnoso, quando va incontro a rottura produce schegge che favoriscono, a loro volta, la lesione delle strutture cellulari della polpa ed una maggior estrazione di olio.

Nei frantoi più moderni le molazze sono sostituite da frangitoi metallici a martelli, a cilindri o a dischi, che permettono di abbattere i tempi di produzione.

Dalla molitura si ottiene una massa definita "pasta di olive" che può essere definita un'emulsione di olio in acqua, perché l'olio fuoriuscito dai vacuoli si disperde sotto forma di goccioline in questa massa pastosa. La pasta di olive viene poi estratta dalla molazza e portata alla gramola, dove si effettua una gramolatura, cioè un suo rimescolamento.



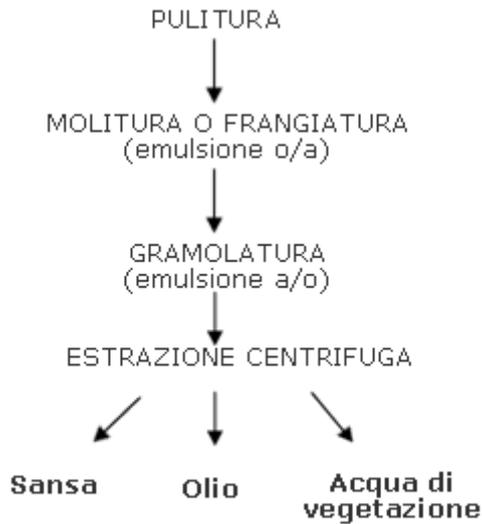
Fig. 11: impianto per l'estrazione dell'olio mediante pressione

Agitando questa pasta si facilita un'ulteriore lacerazione delle cellule, ottenendo una maggiore fuoriuscita di olio dai vacuoli: grazie ai continui rimescolamenti, le goccioline di olio disperse nella massa collidono tra loro unendosi in gocce via via sempre più grosse. Procedendo nella lavorazione di questa pasta si ha un'inversione di fase; si passa quindi da un'emulsione di olio in acqua ad un'emulsione di acqua in olio: la massa assume una composizione oleosa e l'acqua di vegetazione rimane dispersa sotto forma di piccolissime goccioline. L'aumento della temperatura e dei tempi di gramolatura migliora la resa in olio ed il suo aroma, ma influisce negativamente sulla qualità e conservabilità del prodotto, in quanto il calore diminuisce il contenuto in polifenoli, mentre il tempo di gramolatura prolungato favorisce l'aumento dell'acidità libera.

A questo punto si riestrae la massa dalla gramola e si effettua la pressatura mediante presse idrauliche: dalla pasta di olive fuoriesce un liquido, detto mosto, costituito da un'emulsione di olio in acqua di vegetazione, quel che rimane è detto sansa. Il mosto viene poi portato nelle centrifughe per ottenere una completa e più celere separazione delle due fasi, allontanando l'acqua di vegetazione dall'olio. L'olio così ottenuto dovrà subire una filtrazione finale per eliminare residui di polpa e tutte le sostanze che possono intorbidarlo

Al termine dell'intero processo si ottiene un olio *vergine*; tale attributo spetta esclusivamente agli oli ottenuti mediante processi meccanici. Gli oli vergini vengono a loro volta classificati in base all'acidità libera. Se questa risulta inferiore all'1% l'olio è detto extravergine, mentre oltre (fino al 2%) è solo vergine, come riportato precedentemente. Oltre il 2% di acidità si rende necessario un processo di correzione o rettifica.

## 2.6.2 METODO PER CENTRIFUGAZIONE



I processi iniziali, pulitura, frangitura e gramolatura, sono gli stessi visti per il classico metodo a pressione. Dopo la gramolatura la pasta di olive viene diluita con un 30% di acqua ed entra in un estrattore centrifugo, che può essere a tre vie (dal quale escono la sansa, l'olio e l'acqua di vegetazione) o a due vie (dal quale escono solamente l'olio e l'acqua di vegetazione).

L'estrattore centrifugo, chiamato decanter, è costituito da una vite senza fine che, ruotando, porta avanti la pasta di olive comprimendola; da un lato escono le sansi schiacciate, il liquido va sul fondo e, mentre scende, si ha anche la separazione dell'acqua (che esce dal basso) dall'olio (che esce dall'alto, perché più leggero).

La separazione, però, non è netta ed entrambi vengono immediatamente sottoposti a centrifugazione, per recuperare la piccola percentuale di olio presente nell'acqua da un lato, e per allontanare la piccola quota di acqua di vegetazione presente nell'olio dall'altra.



Fig. 12: impianto per l'estrazione dell'olio mediante centrifugazione

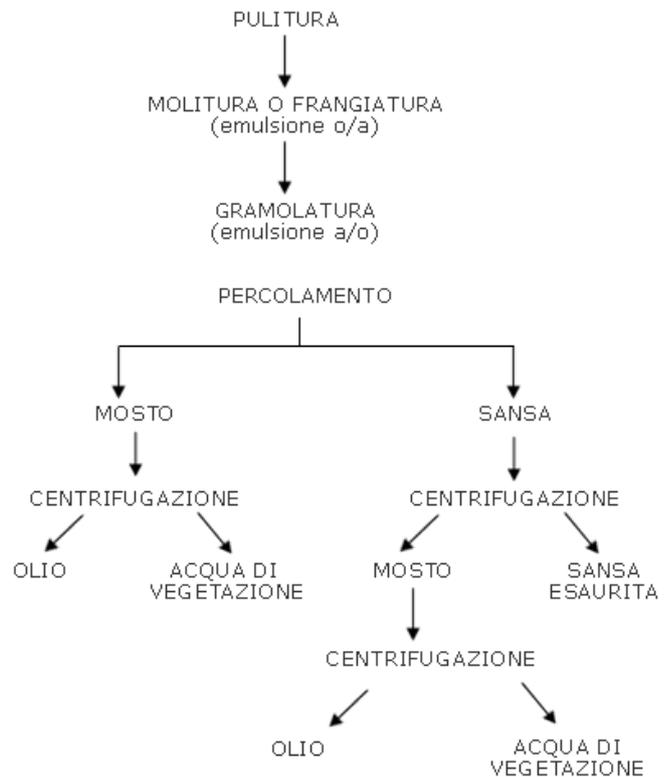
Gli oli vengono poi uniti e l'acqua recuperata per essere nuovamente mescolata alla pasta di oliva.

Si tratta di un impianto veloce, che lavora molto bene, ma che, dovendo mescolare la pasta di olive con un 30% di acqua, causa la parziale perdita della frazione polifenolica dell'olio: il prodotto si priva così di una caratteristica molto importante, sia per la salute del consumatore, sia per la sua conservabilità.

Per tutti questi motivi oggi si utilizza più frequentemente il processo mediante filtrazione selettiva.

### 2.6.3 FILTRAZIONE SELETTIVA

Le fasi iniziali di pulitura, molitura e gramolatura sono le stesse viste per i metodi precedenti. Alla gramolatura segue un'estrazione dell'olio mediante percolamento: la pasta di oliva viene messa su sistemi filtranti costituiti da una griglia di acciaio o nichel, sulla quale poggiano tante lamelle di metallo mobili che penetrano nella pasta. Dal momento che tali lamelle sono costituite da metallo, l'olio di oliva aderisce ad esse molto meglio dell'acqua; quando si retraggono lasciano poi sgocciolare l'olio trattenuto.



Questa tecnica sfrutta la diversa tensione interfacciale esistente tra metallo ed olio e tra metallo ed acqua. Su queste piastre scorre un pettine raschiatore in gomma, che spinge la pasta di oliva sul sistema filtrante.

Le goccioline di olio rimangono quindi adese alle lamelle di metallo e scivolano giù, mentre l'acqua non si attacca e resta nella pasta di olive.

Il risultato finale di questa tecnica filtrante è un'emulsione di piccolissime goccioline di acqua di vegetazione in olio, detta mosto, che viene sottoposta a centrifugazione per ottenere la definitiva separazione dell'olio dall'acqua. Anche la sansa viene sottoposta al medesimo processo, che permette di ottenere da un lato un corpo di fondo esaurito e dall'altro un mosto, che per successiva centrifugazione verrà ancora una volta separato in olio ed acqua di vegetazione.

In definitiva, si tratta di un processo più laborioso rispetto al precedente, ma che preserva la componente fenolica dell'olio, dando un prodotto più ricco di sostanze antiossidanti e meno soggetto all'irrancidimento, di altissima qualità; tuttavia la resa è piuttosto bassa.

## **2.7 LE FRODI ALIMENTARI, UNA GUERRA CONTINUA**

Le frodi alimentari sono purtroppo un campo di guerra senza soste tra produttori disonesti, i N.A.S. e gli aggiornamenti di legge.

Le frodi alimentari sono modifiche apportate intenzionalmente sui prodotti alimentari per ricavarne illeciti guadagni.

Ci sono diversi tipi di frode alimentare, che riguardano quindi l'alterazione dell'alimento:

- Adulterazioni
- Sofisticazioni
- Falsificazioni
- Contraffazioni

### *Adulterazioni*

Si tratta di peggioramenti della merce provocati dall'uomo. Le adulterazioni propriamente dette sono dovute alla sostituzione di una parte del prodotto con un altro scadente o diverso o di basso costo oppure nell'asportazione di una parte pregiata della merce, ad esempio togliendo dei grassi al latte.

Naturalmente quando il trattamento è consentito dalla legge non si è più in presenza di una frode, come nel caso del latte scremato che è regolarmente in commercio.

Recentemente nei pressi di Siena, sono stati sequestrati 8 milioni di litri di finto olio extravergine d'oliva: questo olio era ottenuto miscelando olio vergine e olio lampante opportunamente deodorato per eliminare i cattivi odori con modalità non previste dalla legge e in violazione delle norme vigenti. Il liquido infatti era contraddistinto da un alto tenore di perossidi (che indicano l'irrancidimento) ed un livello di acidità troppo basso, tipico dell'olio vergine. L'olio sequestrato è stato considerato non nocivo alla salute dei consumatori, perché si tratta di adulterazione, ovvero di miscelazione con materia prima di qualità inferiore (frode in commercio art. 515 codice penale) per questo motivo è stato dissequestrato e restituito, ma solo dopo averne declassato il 30-40% ad una categoria merceologica inferiore e non più come olio extravergine.

### *Sofisticazioni*

Esempi tipici di sofisticazione sono l'aggiunta di coloranti gialli alla pasta per farla sembrare all'uovo, di clorofilla alle confezioni di piselli (per ravvivare il colore verde), o di nitriti alle carni per farle sembrare più rosse. E' consentito migliorare l'aspetto di un prodotto, ma occorre rispettare le norme di legge che prevedono il tipo e la quantità di additivi che è possibile aggiungere ad ogni merce, altrimenti si ricade appunto nella sofisticazione.

### *Falsificazioni*

Sono le frodi più gravi perché consistono nella sostituzione di un prodotto con un altro, per esempio l'olio di semi al posto dell'olio d'oliva.

### *Contraffazioni*

Si hanno quando nomi e marchi di prodotti tipici o il marchio di una ditta vengono usati indebitamente.

Le alterazioni e le denaturazioni fiscali non sono frodi. Si tratta infatti di modifiche imposte dallo Stato e consistono nell'aggiunta di denaturanti particolari: l'utilità è quella di consentire la scoperta di frodi proprio mediante la presenza del particolare denaturante aggiunto, facilmente rilevabile con metodi analitici già sperimentati e standardizzati.

Un esempio è quello dell'alcol denaturato che è reso tale attraverso l'uso di sostanze che lo rendono imbevibile, in tal modo non è gravato dall'imposta di fabbricazione che è invece obbligatoria quando l'alcol è utilizzato come bevanda.

Esempi classici sono l'aggiunta di olio di sesamo agli oli di semi e alla margarina. Infatti, la presenza di olio di sesamo nel burro o in un olio extra vergine di oliva denuncierebbe facilmente l'adulterazione (rispettivamente con margarina nel primo alimento e di oli di semi nel secondo) non essendo l'olio di sesamo un componente naturale di entrambi. Si utilizzano infatti metodi analitici basati sulle reazioni colorimetriche o determinazioni spettrofotometriche.

Come precedentemente detto, le alterazioni degli alimenti dipendono da modificazioni naturali o accidentali dei loro caratteri originari, e sono quindi peggioramenti delle caratteristiche della merce dovuti a cause naturali e in particolare causati spesso dalla cattiva conservazione. Un esempio classico è l'irrancidimento dell'olio e dei grassi, provocato dall'ossigeno dell'aria e dalla luce. Quindi anche le alterazioni alimentari causate da incuria sono considerate frodi.

La frode più usuale nel settore oleario è quella di miscelare olio di semi con olio di oliva dichiarandolo olio extravergine d'oliva. In alcuni casi è stato accertato che olio di semi colorato artificialmente con clorofilla e betacarotene era venduto per olio extravergine.

Un'altra frode più specialistica e raffinata, di difficile individuazione, consiste nel dichiarare olio extra vergine d'oliva oli che all'origine erano stati qualificati lampanti o maleodoranti. Questi, opportunamente trattati e con l'aggiunta di modeste quantità di oli vergini di oliva, acquistano, sotto l'aspetto chimico, parametri propri dell'olio extravergine.

La classifica stilata dalla US Pharmacopeial Convention (un'organizzazione statunitense no profit impegnata a sviluppare metodi analitici standardizzati per assicurare il massimo di identità, qualità e purezza agli ingredienti e ai supplementi alimentari) indica che l'alimento in assoluto più suscettibile ad adulterazione è l'olio d'oliva.

Inoltre, L'Unione Europea aggiorna due regolamenti specifici (il 2568/1991 e il 29/2012 in vigore dal primo gennaio 2014) sulle etichette che impone ai produttori di indicare l'origine dell'olio, che deve essere indicata a caratteri grandi, mentre le etichette con marchi ingannevoli sulla provenienza sono ritirati dal mercato.

Ai ristoranti è imposto l'uso di sole bottiglie monouso con tappi "antiriciclo" per evitare che queste vengano rabboccate, magari con olio di diversa qualità, una volta terminate. Infine ci sono modifiche che riguardano anche la fase di produzione dell'olio: per ogni azienda è previsto l'obbligo di tenere un apposito registro 'a partita doppia', sul quale annotare entrate e uscite per le varie categorie commerciali, fino alla fase di imbottigliamento dell'olio. L'albo servirà a garantire la tracciabilità.

## 2.8 METODI ANALITICI DI RICONOSCIMENTO DELLE FRODI

- spettrofotometria U.V.:

presenza di legami coniugati, dieni e trieni (K 232 e 270)

- analisi gascromatografica degli acidi grassi, come esteri metilici:

tipi, quantità, isomeri trans.

- analisi gascromatografica della frazione insaponificabile:

steroli, eritrodiole, alcoli alifatici;

- analisi enzimatica (metodo lipasi pancreatico) per quantificare gli acidi grassi saturi che esterificano in posizione 2 (acido palmitico);

La spettrofotometria UV permette di individuare se un olio d'oliva sia vergine e di classificarlo commercialmente; di individuare un olio d'oliva proveniente da un processo di raffinazione; di riconoscere una miscela tra un olio d'oliva vergine e un qualsiasi tipo di olio raffinato.

Nella decolorazione su terre attive di oli lampanti perossidati si ha la formazione di trieni coniugati (i quali presentano picchi di assorbimento a  $\lambda = 270$  nm) e di composti chetonici, durante gli stadi più avanzati di ossidazione, provocando quindi un maggior assorbimento a 270 nm. Gli oli rettificati presentano quindi valori di assorbimento nell'UV notevolmente superiori a quelli di oli vergini e extra vergini.

Nella decolorazione con terre acidificate e nei trattamenti termici di deodorazione si formano isomeri di acidi grassi TRANS: una rotazione della molecola intorno a un "doppio legame" fa diventare la naturale configurazione cis-cis una configurazione trans-cis. Questo piccolo cambiamento ha considerevoli effetti negativi sulla salute.

Gli acidi grassi trans aggravano le carenze di acidi grassi essenziali, ostacolando la produzione di prostaglandine, che regola il tono muscolare delle pareti arteriose, la pressione del sangue, le funzioni renali e reagisce alle infiammazioni. Gli acidi grassi trans accrescono i livelli di colesterolo. [13]

## 2.9 OLIO MARCHIGIANO

Le Marche sono collocate sul versante del medio Adriatico e occupano circa 9.365,86 km<sup>2</sup> di territorio italiano che si estende tra il fiume Conca a nord e il Tronto a sud; a ovest la regione è limitata dall'Appennino. Essa presenta una forma caratteristica di pentagono irregolare e si sviluppa perlopiù longitudinalmente da nord-ovest a sud-est. Una zona montuosa è formata dall'Appennino Umbro-Marchigiano.

Le Marche sono una delle regioni più collinari d'Italia: le colline comprendono il 69% del territorio (6.462,90 km<sup>2</sup>). I restanti 2.902,96 km<sup>2</sup> sono invece montuosi. Le pianure sono limitate ad una stretta fascia costiera e alla parte delle valli più vicine alla foce dei fiumi, ma rappresentano una percentuale irrisoria. La regione è caratterizzata da tre diverse fasce climatiche: fascia litoranea, fascia medio basso collinare e fascia montana (alto collinare). La fascia litoranea è caratterizzata da un clima subcontinentale con sbalzi di temperatura da stagione a stagione: la latitudine e la scarsa altitudine rendono il clima complessivamente mite, con estati calde ma rinfrescate dalla benevole brezza marina e inverni freddi con regolari piogge di stagione. Nelle zone montuose vi sono estati più fresche e inverni molto rigidi con ampia possibilità di neve; l'inverno risulta altresì rigido nelle zone collinari interne dove si possono verificare basse temperature.

Come per il clima, anche la conformazione del terreno è piuttosto vario: vi sono zone con alta presenza di calcare che rende il terreno soffice ed areato, ma anche zone arenarie, argillose e con presenza di gesso.

La combinazione tra condizioni climatiche e caratteristiche orografiche hanno permesso lo sviluppo dell'olivicoltura, anche se in aree ristrette, mentre la presenza dei microclimi e di diverse razze di olivo che si sono insediate nel territorio marchigiano danno origine alla produzione di oli con caratteristiche organolettiche molto diverse tra loro, tutte di notevole pregio.

Quello che si tramanda da ulivo ad ulivo è un patrimonio non solo genetico, ma anche storico: ogni varietà di olio parla della zona della quale è originaria, del suo clima, delle sue caratteristiche orografiche ed anche della sua tradizione: dalla banca dati del progetto “oli monovarietali italiani” [14] si evince come, solo nella regione Marche, siano presenti ben 31 varietà di olio.

Questo numero però non acquisisce significato dalla quantità di olio che si produce: si sta parlando di un territorio in gran parte montuoso e non del tutto coltivabile e la maggior parte delle aziende marchigiane che investono una porzione del terreno alla coltivazione di olive sono medio-piccole e piccole. Quello che si ricerca nelle Marche è la qualità sia sotto il profilo nutrizionale che gastronomico, con spiccati caratteri di tipicità.

Il valore della produzione olivicola marchigiana è di 20 milioni di euro. Le Marche vantano anche due Dop nel settore olivicolo (Olio di Cartoceto Dop e Oliva Ascolana del Piceno Dop) [15].

Per regolamentare l’assegnazione del marchio “DOP” agli oli marchigiani è stata redatta una disciplina di produzione dell’olio extravergine di oliva a denominazione di origine protetta “Marche” D.O.P.:

#### *Art.1: Denominazione*

La denominazione di origine protetta Olio Extravergine di oliva «Marche» D.O.P. è riservata agli oli extravergini estratti da olive prodotte nella Regione Marche e che rispondono alle condizioni ed ai requisiti stabiliti dal presente disciplinare ed alla normativa vigente.

#### *Art. 2: Cultivar – Caratteristiche*

L'olio extravergine di oliva «Marche» D.O.P. deve essere ottenuto esclusivamente dalle seguenti varietà di ulivo presenti nelle aziende ricadenti nei territori di cui all'art. 3, iscritte nell'elenco degli oliveti e tenuto dall'organismo di controllo designato: Frantoio e biotipi adesso riconducibili per non meno del 40% sino ad un massimo del 60%; Coroncina, Mignola, Piantone di Mogliano, Leccino fino ad un massimo del 40%; sono ammesse altre varietà fino ad un massimo del 20%. In ogni caso le percentuali devono garantire che le caratteristiche chimiche ed organolettiche dell'olio extravergine di oliva «Marche» D.O.P. risultino omogenee, come riportato all'art. 11.

***Art. 3: Zona di produzione***

Limiti del territorio per l'olio extravergine di oliva "Marche" D.O.P. : Province di Pesaro, Ancona, Macerata e Ascoli Piceno e relativi Comuni e sottocomuni.

***Art. 4: Origine***

L'olio extravergine di oliva «Marche» D.O.P. presenta caratteristiche sensoriali tipiche, legate alle condizioni pedo-climatiche e varietali, che lo rendono nettamente distinguibile da quello prodotto nelle zone limitrofe.

***Art. 5: Sistemi di coltivazione***

Le pratiche agronomiche devono garantire la rispondenza dell'olio prodotto ai requisiti fissati dal presente disciplinare. Le particolari condizioni climatiche determinano la scarsa presenza dei più temibili parassiti dell'olivo quali la *Bactrocera oleae* (mosca delle olive) e la *Prays oleae* (tignola dell'olivo), pertanto la difesa fitosanitaria deve essere eseguita secondo la pratica della lotta guidata in modo da ridurre al minimo indispensabile gli interventi necessari. La raccolta delle olive deve essere effettuata direttamente dalla pianta, a mano o con sistemi meccanici che garantiscano l'integrità del frutto.

***Art. 6: Modalità di oleificazione e conservazione***

Le operazioni di trasformazione delle olive per la produzione di olio extravergine di oliva «Marche» D.O.P. devono essere effettuate nell'ambito della zona di produzione descritte nell'art. 3 del presente disciplinare, al fine di garantire la rintracciabilità ed il controllo. L'estrazione dell'olio dalle olive è realizzata esclusivamente con sistemi fisici o meccanici atti a garantire l'ottenimento di oli senza alcuna alterazione delle caratteristiche qualitative contenute nella drupa. E' vietato il ripasso e l'uso di enzimi e talco durante la lavorazione delle olive. Gli esami chimico-fisici ed organolettici dovranno essere effettuati secondo le metodiche di cui al regolamento CE n. 2568/91 e successive modifiche ed integrazioni.

All'atto del confezionamento, l'olio extravergine di oliva «Marche» D.O.P. deve rispondere alle seguenti caratteristiche:

- colore: giallo/verde;
- odore: di fruttato, tendenzialmente verde con intensità dal medio al leggero;
- sapore: fruttato di oliva parzialmente invaiata, con sentori di amaro e piccante;
- punteggio al Panel test: minimo 7;
- acidità: max 0.6 (gr ac. oleico/100 g olio);
- numero di perossidi: max 14 (meqO<sub>2</sub>/Kg);
- acido oleico: minimo 73%;
- acido linoleico: max 9%;
- K232: max 2.2;
- K270: max 0,15;
- Delta K: max 0,005;
- polifenoli totali: minimo 150 ppm (taratura con acido Gallico).

#### *Art. 7: Legame con l'ambiente*

La coltivazione dell'olivo nella regione è caratterizzata, oltre che dalle varietà presenti, anche dalle peculiari condizioni pedo-climatiche. Il clima marchigiano risulta essere influenzato positivamente da diversi fattori, tra cui la latitudine (compresa tra il 42° e il 44° parallelo nord), il grande sviluppo delle coste rispetto alla superficie totale, la modesta batimetria ed apertura verso il mare Adriatico, la vicinanza dei massimi rilievi appenninici alla costa e, infine, il graduale aumento delle quote allontanandosi dal litorale.

Le escursioni termiche medie giornaliere di settembre e ottobre, periodo nel quale si ha l'accumulo di olio, dei costituenti fenolici e composti aromatici nell'oliva, sono rispettivamente di 10° e 8,5°C.

#### *Art. 8: Struttura di controllo*

L'olio "Marche" D.O.P. sarà controllato da una struttura, conformemente all'art. 10 del regolamento CEE 2081/92.

### *Art. 9: Confezionamento ed etichettatura*

Tutte le operazioni riguardanti il prodotto «Marche» D.O.P. devono essere effettuate nell'ambito della zona di produzione descritte nell'art. 3 del presente disciplinare, al fine di garantire la rintracciabilità ed il controllo del prodotto e per evitare di alterarne e/o deteriorarne le caratteristiche qualitative. E' obbligatorio indicare in etichetta l'annata di produzione delle olive da cui l'olio è ottenuto ed il termine entro il quale è consigliato il consumo.

Dalla banca dati del progetto “oli monovarietali italiani” [14] si evince che la regione Marche può contare ben 31 varietà di olio diverse, detenendo il record regionale italiano.

In questa tesi sono stati utilizzati campioni di olio extravergine d'oliva di tre particolari di queste varietà: Piantone di Mogliano, Coroncina e Cingoli, tipiche di aree ristrette della zona alto-collinare della provincia di Macerata.

Di seguito vengono analizzate in dettaglio le varietà di olio:

#### *2.9.1 PIANTONE DI MOGLIANO*

È una varietà originaria del comune di Mogliano [16], ma i suoi alberi sono presenti nelle colline di tutta la Provincia di Macerata fino ad arrivare nelle aree più interne, ad altitudini anche superiori a 600 m.s.l.m. Si tratta di alberi con una buona resistenza al freddo e alla siccità e che per questo motivo si sono largamente diffusi ad alte altitudini. Dal punto di vista chimico si tratta di un olio ad alto contenuto di acido oleico e dal basso livello di clorofilla totali.

Acido palmitico  $10,64 \pm 0,73$

Acido palmitoleico  $0,71 \pm 0,12$

Acido stearico  $1,90 \pm 0,10$

Acido oleico  $79,50 \pm 1,01$

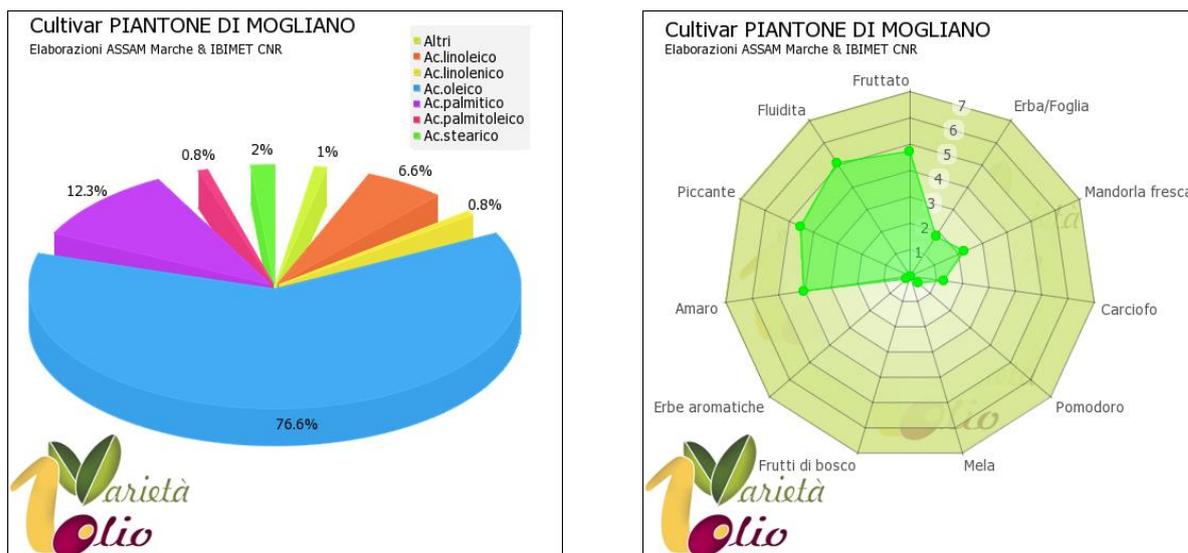
Acido linoleico  $5,96 \pm 0,38$

Acido linolenico  $0,57 \pm 0,06$

Rapporto acidi grassi insaturi/saturi ( $n \pm E.S.$ ):  $7,20 \pm 0,51$

Polifenoli totali ( $mg/kg \pm E.S.$ ):  $382,18 \pm 27,29$

Clorofille totali ( $ppm \pm E.S.$ ):  $5,31 \pm 0,88$



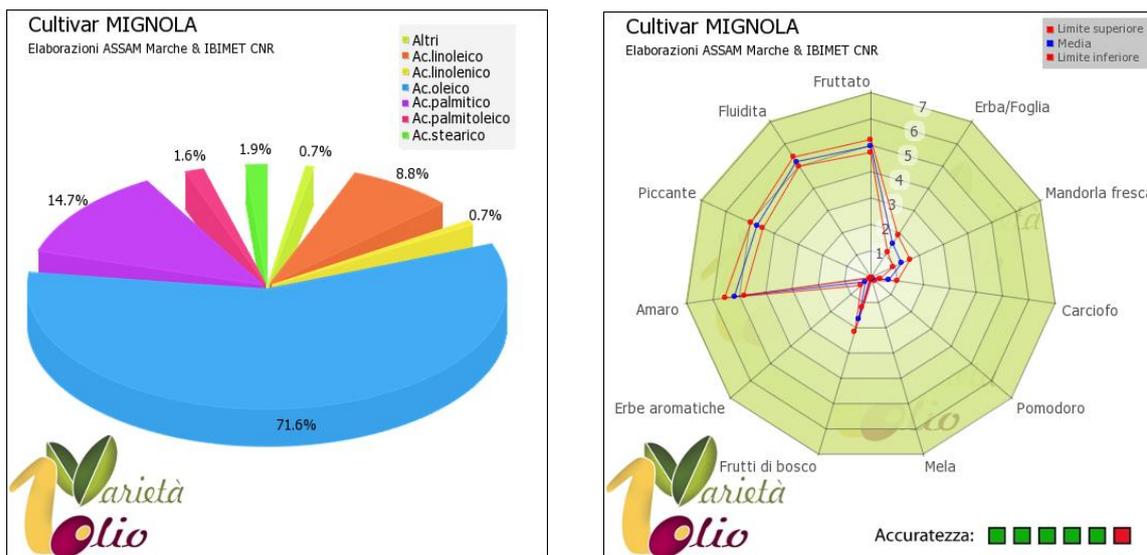
**Fig. 13: composizione chimica e organolettica della cultivar Piantone del Mogliano**

### 2.9.2 MIGNOLA

La Mignola è una cultivar marchigiana diffusa con maggiore concentrazione nel comune di Cingoli, fino alle aree più interne.

La resa in olio è molto elevata, il colore va dal verde al giallo oro (grazie al ricco contenuto di caroteni), il rapporto acidi grassi insaturi/saturi è relativamente basso, il contenuto in polifenoli totali è molto alto. La Mignola ha una sensibilità al freddo media e alla mosca bassa [17].

Nella seguente Fig. 14 viene riportata la composizione chimica ed organolettica della cultivar Mignola.



**Fig. 14: composizione chimica e organolettica della cultivar Mignola**

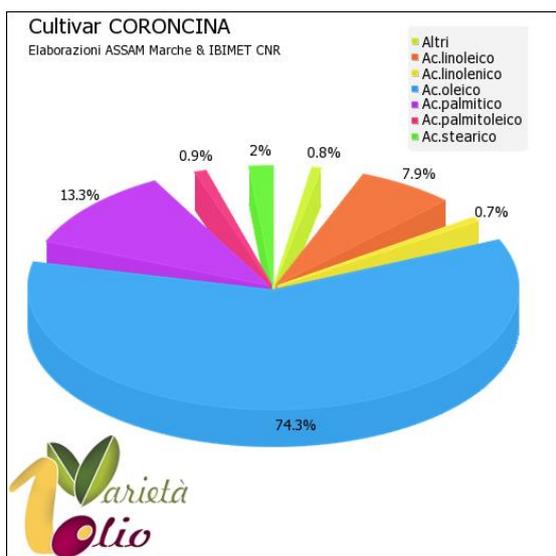
### 2.9.3 CORONCINA

Sembra che siano due i motivi per i quali la tradizione locale attribuisce il nome "coroncina" a questa varietà: la forma del frutto e il ramo fruttifero.

Si tratta di una cultivar diffusa nei Comuni di Caldarola, Cessapalombo, Camporotondo di Fiastrone, Serrapetrona e Belforte del Chienti, e per tale motivo la Coroncina viene definita la varietà dei "Cinque Comuni".

L'olio di coroncina, estratto dalle drupe a giusta maturazione, presenta un colore verde tendente al giallo, grazie a un buon contenuto in clorofilla, ed è piuttosto fluido per un buon rapporto tra acidi grassi insaturi e saturi. Si tratta di un olio monovarietale, dotato in purezza e con peculiari caratteristiche chimiche-organolettiche che lo distinguono dalla tipologia classica dell'olio marchigiano.

Nella seguente Fig. 15 viene riportata la composizione chimica ed organolettica della cultivar Coroncina.



**Fig. 15: composizione chimica e organolettica della cultivar Coroncina**

### 3 PARTE SPERIMENTALE

#### 3.1 REAGENTI

Trihexyl(tetradecyl)phosphonium bis(trifluoromethylsulfonyl) imide  
([TETDP]+[imide]<sup>-</sup>) ≥ 95.0% (Aldrich).

Inoltre nella seguente Tabella 6 vengono riportate le cultivar studiate in questo lavoro di tesi:

**Tabella 6: elenco delle cultivar analizzate**

CAMPIONI	Varietà di olio
1-6, 66, 67,70,72,80	Coroncina
7-15, 64, 65, 75, 76, 77, 79, 81, 82	Mignola
16-19, 62, 63, 68, 69, 71, 73, 74, 78	Piantone di Mogliano

#### 3.9 PREPARAZIONE DELLE MISCELE OLIO/RTIL

I campioni di olio sono stati accuratamente mescolati con quantità appropriate di [TETDP]+[imide]<sup>-</sup> in una vial di vetro da 10 ml e successivamente la miscela è stata sonicata per 5 minuti per avere l'omogeneizzazione dei due liquidi e poi si è lasciata a riposo per 15 minuti prima delle misure voltammetriche.

I voltammogrammi ciclici sono stati registrati nel range di potenziale che va da - 3.0 a + 3.0 V con una velocità di scansione di 0.1 V s<sup>-1</sup> ed utilizzando una cella elettrochimica a tre elettrodi: come elettrodo di lavoro si è utilizzato un microelettrodo di platino avvolto in un supporto di teflon; il controelettrodo e l'elettrodo di pseudo-riferimento sono costituiti da un filo di platino.

Prima di ogni utilizzo l'elettrodo di lavoro veniva perfettamente lucidato su un panno con allumina 0,05 µm ed attentamente lavato con acqua distillata.

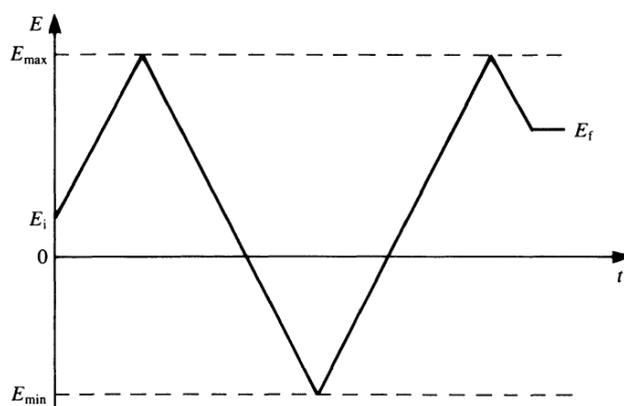
### 3.3 TECNICHE ELETTROANALITICHE A POTENZIALE CONTROLLATO E VOLTAMMETRIA CICLICA

La base di tutte le tecniche elettroanalitiche a potenziale controllato è la misura del responso in corrente provocata dall'applicazione di un potenziale.

La voltammetria ciclica (CV) è una tecnica ampiamente utilizzata nello studio teorico del comportamento di coppie redox. Le grandi potenzialità della voltammetria ciclica in questo campo, derivano dalla possibilità di ricavare rapidamente un grande numero di informazioni sulla termodinamica e sulla cinetica dei processi di ossido-riduzione e delle reazioni eterogenee di trasferimento elettronico.

La CV consente una rapida individuazione dei potenziali ossido-riduttivi delle specie elettroattive, oltre ad una rapida valutazione degli effetti del mezzo e delle condizioni sperimentali sullo svolgimento del processo.

La CV è una particolare LSV (Linear Sweep Voltammetry) che esegue una scansione lineare di potenziale a forma triangolare all'elettrodo di lavoro stazionario (in soluzione non agitata); come si può notare nella seguente Fig. 16.



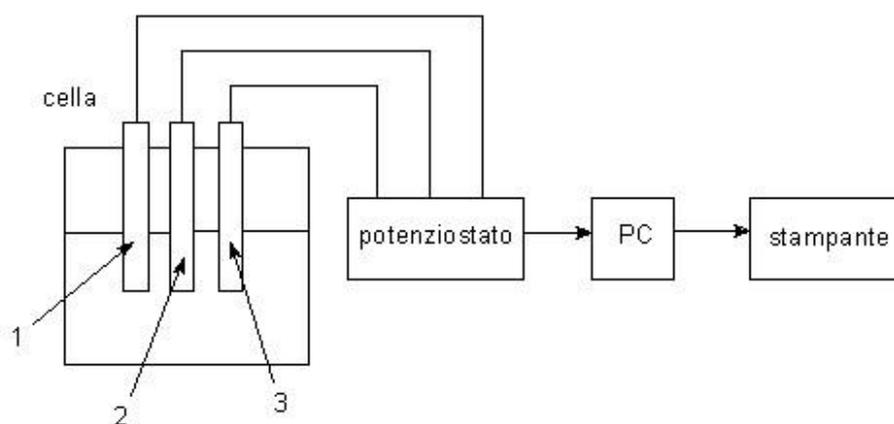
**Fig. 16** Variazione del potenziale applicato con il tempo in voltammetria ciclica, mostrando il potenziale iniziale,  $E_i$ , il potenziale finale,  $E_f$ , il potenziale massimo e minimo.

Viene quindi misurata la corrente che attraversa un elettrodo immerso nella soluzione contenente le specie elettroattive, in grado cioè di ridursi o ossidarsi, quando viene applicato allo stesso un potenziale elettrico esterno, variabile in modo opportuno. In questo modo una coppia redox in soluzione è sottoposta prima ad una riduzione e successivamente ad un'ossidazione o viceversa.

L'elettrodo viene detto elettrodo di lavoro ed ha una superficie attiva molto piccola: ciò gli permette di assumere esattamente il potenziale imposto dall'esterno; in altre parole si tratta di un elettrodo altamente polarizzabile.

La reazione redox avviene all'interno del range di potenziale definito da due valori di potenziale scelto ( $E_i$  ed  $E_f$ ) ed il potenziale a cui la riduzione o l'ossidazione prendono luogo, dà informazioni quali-quantitative circa l'analita di interesse.

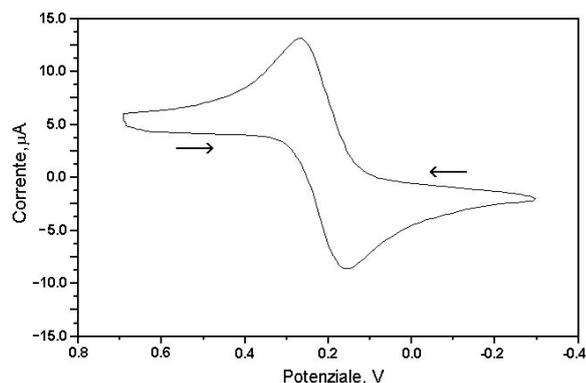
Un moderno sistema per la voltammetria si può schematizzare nel modo seguente:



**Fig. 17** schema di un sistema per la voltammetria.

La cella elettrolitica contiene la soluzione analitica ed al suo interno sono presenti di norma 3 elettrodi: l'elettrodo di lavoro (2), un contro elettrodo (1) per la chiusura del circuito ed un elettrodo di riferimento (3), collegati da un potenziostato che può controllare con estrema precisione il potenziale assunto dall'elettrodo di lavoro. La sollecitazione elettrica proveniente dal circuito esterno (il potenziale  $E$ ) fornisce come risposta un segnale elettrico proveniente dalla soluzione (la corrente  $i$ ). La scansione (cioè la variazione nel tempo) del potenziale  $E$  applicato fa in modo che vengono successivamente raggiunti i potenziali di scarica delle varie specie elettroattive presenti nella soluzione e quindi una variazione corrispondente della corrente  $i$  che attraversa il circuito.

Il grafico che si ottiene e che riporta la corrente in funzione del potenziale è detto voltammogramma ciclico. Le reazioni redox più comuni in cui è possibile osservare una CV reversibile è la riduzione dello ione ferricianuro a ferrocianuro (Fig. 18):



**Fig. 18 Voltammogramma ciclico di un sistema redox reversibile: soluzione  $5 \cdot 10^{-3}$  M  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  in  $\text{KNO}_3$  1.0 M. Pt electrode. Nel range catodico ha luogo la reazione  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} + e \rightarrow \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ , mentre nel range anodico ha luogo la reazione  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-} \rightarrow \text{Fe}(\text{CN})_6^{3-} + e$**

La Fig. 18 mostra un tipico voltammogramma ciclico registrato imponendo un singolo ciclo di variazione del potenziale. Si considera che la specie in forma ossidata, sia l'unica specie elettroattiva inizialmente presente in soluzione.

Studiando il processo di riduzione, nel primo segmento il potenziale viene fatto variare linearmente verso valori sempre negativi, partendo dal potenziale iniziale ( $E_i$ ) al quale non avviene alcuna riduzione. Man mano che il potenziale applicato si avvicina ad  $E^\circ$  per la specie in esame, la corrente catodica aumenta fino a raggiungere un massimo per poi decrescere in base all'equazione di Cottrell:

$$i = n \cdot F \cdot A \cdot C_0 \cdot \sqrt{\frac{D}{\pi \cdot t}}$$

dove:

$i$ : corrente elettrica (mA), in questo caso è la corrente faradica  $i_F$ ,

$n$ : numero di elettroni scambiati nel processo redox che avviene sull'elettrodo,

$F$ : costante di Faraday ( $96485,309 \text{ C mol}^{-1}$ ),

$A$ : area dell'elettrodo ( $\text{cm}^2$ ),

$C$ : concentrazione dell'analita nel corpo della soluzione (M),

$D$ : coefficiente di diffusione della specie che si scarica ( $\text{cm}^2/\text{s}$ ),

$t$ : tempo (s) trascorso dall'istante da cui è stato applicato il potenziale all'elettrodo.

Dopo qualche centinaio di mV oltre il potenziale di picco, la direzione della scansione di potenziale viene invertita.

Durante la scansione inversa, le molecole presenti vicino alla superficie dell'elettrodo, vengono riossimate. Si ottiene quindi un picco anodico nel voltammogramma ciclico.

Inizialmente in prossimità dell'elettrodo è presente solo la specie ossidata, ad una concentrazione  $c_0$ , pari a quella di bulk, ed il potenziale applicato è  $E_i$  al quale la specie ossidata non viene ridotta ( $E_i \gg E^\circ$ ). Allo spostarsi del potenziale verso  $E^\circ$  la concentrazione della specie ossidata alla superficie diminuisce, poiché la specie viene ridotta, mentre quella della specie ridotta, prodotta della reazione elettrodica, aumenta.

Quando il potenziale applicato è uguale al potenziale di equilibrio, entrambe le specie sono presenti alla stessa concentrazione, come previsto dalla legge di Nernst:

$$E = E^{0'} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Ox]}{[Red]}$$

dove:

- $E^{0'}$  è il potenziale formale,
- $R$  è la costante universale dei gas, uguale a  $8,314472 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  o  $0,082057 \text{ L atm mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ,
- $T$  è la temperatura assoluta in K,
- $[Ox]$  è la concentrazione (M) della specie in forma ossidata,
- $[Red]$  è la concentrazione (M) della specie in forma ridotta,
- $n$  è il numero di elettroni trasferiti nella semireazione,
- $F$  è la costante di Faraday, uguale a  $96485,309 \text{ C mol}^{-1}$ .

Proseguendo la scansione verso potenziali più negativi, la concentrazione della specie ossidata continua a diminuire fino al suo esaurimento sulla superficie dell'elettrodo.

A questo punto inizia la scansione inversa, e si raggiunge di nuovo il potenziale di equilibrio in cui  $c_{ox}(0,t) = c_{red}(0,t)$ , ma con un profilo diverso in quanto la condizione iniziale di questa scansione inversa è diversa da quella diretta.

Il voltammogramma di una voltammetria ciclica consiste in una curva chiusa: le coppie redox reversibili mostrano sia un picco catodico che anodico con la stessa intensità e carica associata, mentre i sistemi redox irreversibili non seguono questi criteri.

In particolare, per una coppia redox reversibile (con costante cinetica standard  $k^0 > 10^{-1} \text{ cm s}^{-1}$ ), la corrente di picco a 25°C è data dall'equazione di Randles-Sevcik:

$$i_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A C_0 D_0^{1/2} v^{1/2}$$

Dove:

$v$  è la velocità di scansione

$n$  è il numero di elettroni scambiati

$A$  è l'area dell'elettrodo

$D_0$  è il coefficiente di diffusione della specie elettroattiva in quel mezzo

$C_0$  è la concentrazione dell'analita.

La corrente risulta quindi essere direttamente proporzionale alla concentrazione dell'analita ed aumentare linearmente con la radice quadrata della velocità di scansione.

Inoltre per un processo nernstiano reversibile, il rapporto tra la corrente del picco diretto  $I_{pd}$  e quella del picco inverso  $I_{pi}$  è uguale ad 1.

In un sistema redox reversibile, il potenziale di mezza onda  $E_{1/2}$  si trova al centro fra il potenziale di picco anodico ( $E_{pa}$ ) ed il potenziale di picco catodico ( $E_{pc}$ ):

$$E_{1/2} = \frac{E_{pa} + E_{pc}}{2}$$

Infine la separazione tra i potenziali di picco, per una coppia reversibile, è data da:

$$\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = \frac{0.059}{n}$$

Perciò la separazione tra i potenziali di picco ci consente di stabilire il numero di elettroni che vengono trasferiti. In particolare, un processo monoelettronico reversibile presenta un  $\Delta E_p$  di circa 59 mV.

Contrariamente a quanto è stato visto per i processi reversibili, i voltammogrammi ciclici relativi a processi irreversibili, cioè caratterizzati da uno scambio elettronico lento (con costante cinetica standard  $k^\circ < 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$ ), presentano picchi di altezza ridotta rispetto a quelli presentati dai sistemi reversibili ed, inoltre, il picco diretto ed inverso sono caratterizzati da un elevato valore di  $\Delta E_p$ .

### *3.3.1 PASSAGGIO DA MACROELETTRODI A MICROELETTRODI*

Lo sviluppo della strumentazione di misura conseguito nel campo dell'elettronica ha permesso un progressivo abbassamento della soglia delle correnti misurabili, nell'ordine dei picoampere, pur conservando un buon rapporto segnale rumore; ed anche la riduzione delle dimensioni degli elettrodi.

Si possono distinguere tre classi di elettrodi:

- macroelettrodi con superficie attiva dell'ordine dei  $\text{cm}^2$  o superiore;
- microelettrodi con superficie attiva stimata nell'ordine dei  $\text{mm}^2$ ;
- ultramicroelettrodi con superficie attiva dell'ordine dei  $\mu\text{m}^2$ .

Essendo la corrente faradica misurata con un elettrodo proporzionale alla sua area si può intuire la drastica diminuzione della stessa nel passare da una classe all'altra. La diminuzione delle correnti misurate permette quindi di ridurre proporzionalmente la distorsione dei segnali elettrochimici dovuti a cadute ohmiche della cella elettrochimica ( $iR$  drop), tanto che gli ultramicroelettrodi vengono impiegati in soluzioni ad alta resistenza. Parallelamente alla diminuzione della superficie elettrodica si ottiene una diminuzione della corrente capacitiva, a questa proporzionale, che è un altro fattore di disturbo nelle misure elettrochimiche.

Applicando un potenziale ad un microelettrodo immerso in una idonea soluzione contenente una specie elettrochimicamente attiva, si genera un gradiente di concentrazione fra la soluzione in prossimità della superficie elettrodica e il resto della soluzione (bulk). A causa del gradiente di concentrazione si instaura un processo diffusivo che tende ad uniformare la concentrazione all'interno della cella elettrochimica.

Le leggi che descrivono il processo di diffusione sono la prima e la seconda legge di Fick. La prima legge afferma che il flusso di massa è direttamente proporzionale al gradiente di concentrazione.

Il flusso è definito come il numero di molecole che attraversano, nell'unità di tempo, un'area unitaria di un parallelepipedo immaginario di spessore infinitesimo, posto alla distanza  $x$  dalla superficie dell'elettrodo all'interno della soluzione. Il segno è relativo alla direzione: è positivo quando il movimento è verso il parallelepipedo ed è negativo quando il movimento è in uscita dal parallelepipedo.

$$F(x,t) = -D_o(\partial C_o(x,t)/\partial x) \quad (1)$$

Dove:

- $D_o$  è il coefficiente di diffusione
- $F(x,t)$  è il flusso alla distanza  $x$  dalla superficie dell'elettrodo e al tempo  $t$ .
- $C_o(x,t)$  è la concentrazione alla distanza  $x$  dalla superficie dell'elettrodo e al tempo  $t$ .

La variazione, in un determinato punto, della concentrazione con il tempo è data dalla seconda legge di Fick.

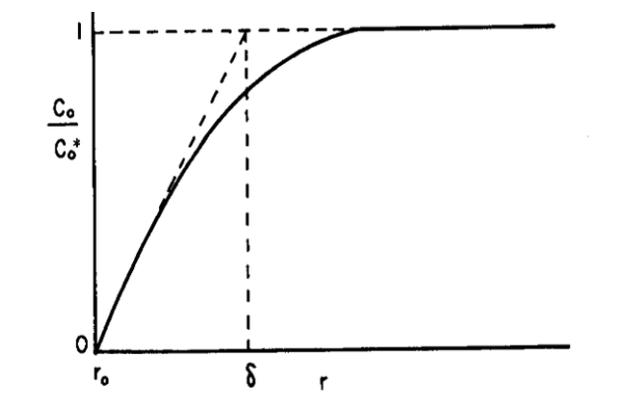
$$(\partial C_o(x,t)/\partial t) = D_o (\partial^2 C_o(x,t)/\partial x^2) \quad (2)$$

Quando il flusso in entrata è uguale al flusso in uscita la concentrazione è costante nel tempo, siamo quindi in condizioni di “stato stazionario”.

Risolvendo le equazioni 1 e 2 si può calcolare il profilo di concentrazione della specie elettroattiva, la distanza dall'elettrodo massima entro cui si propaga la perturbazione della concentrazione è detto spessore dello strato di diffusione indicato con il simbolo  $\delta$ ; nel caso dei microelettrodi è approssimato da:

$$\delta = \sqrt{\pi D_o t} \quad (3)$$

La Fig. 19 rappresenta graficamente lo spessore dello strato di diffusione e la sua approssimazione  $\delta$  (approssimazione di Nernst).



**Fig. 19** Rappresentazione dello spessore dello strato di diffusione ed approssimazione di Nernst ( $r$  distanza dalla superficie dell'elettrodo).

Quando si usano dei macroelettrodi le molecole che diffondono verso la superficie elettrodica vedono questa, a causa delle dimensioni relative, come un piano pertanto in questi casi la diffusione è detta planare. Invece nel caso degli microelettrodi le molecole che diffondono verso l'elettrodo hanno dimensioni di poco inferiori ad esso cosicché la loro diffusione può essere vista come una convergenza delle molecole verso un punto, rappresentato dal microelettrodo; in questo caso la diffusione è detta convergente.

Quando la cella è sufficientemente grande cosicché lo spessore dello strato di diffusione nel tempo dell'esperimento resta talmente piccolo da impedire che gli effetti della parete della cella siano avvertiti all'elettrodo siamo in condizioni di diffusione lineare semi-infinita descritta dalle condizioni seguenti:

$$\lim_{x \rightarrow \infty} C_o(x,t) = C_o^* \quad (4)$$

$$\lim_{x \rightarrow \infty} C_R(x,t) = 0 \quad (5)$$

Le equazioni 4 e 5 sono valide per ogni  $t$ . In esse  $C_o(x,t)$  e  $C_R(x,t)$  sono, rispettivamente, la concentrazione della specie ossidata e di quella ridotta al tempo  $t$  e alla distanza  $x$  dalla superficie dell'elettrodo;  $C_o^*$  è la concentrazione della specie ossidata nel bulk della soluzione.

Se la cella elettrochimica è sufficientemente piccola (2-100  $\mu\text{m}$ ) cosicché lo spessore dello strato di diffusione nel tempo dell'esperimento diventa di dimensioni confrontabili a quelle della cella allora la dimensione della cella condiziona i risultati sperimentali e si rientra nel caso della diffusione ristretta o thin layer.

### 3.1 TECNICHE CHEMIOMETRICHE

Le attuali strumentazioni analitiche permettono di acquisire una gran quantità di dati in tempi brevi e a costi ridotti. Questo è un vantaggio poiché permette di acquisire una gran quantità di informazioni in un singolo step, ma tale abbondanza costituisce un limite non trascurabile nell'interpretazione classica dei dati acquisiti. I metodi classici di analisi sono generalmente univariati, cioè prevedono la selezione di una caratteristica chimico/fisica (variabile) che permetta di quantificare l'analita o spiegare il comportamento del sistema.

In questo modo, per esempio, si può quantificare l'analita  $x$  correlando la sua concentrazione alla legge fisica che regola il fenomeno; ad esempio leggendo la sua assorbanza caratteristica alla lunghezza d'onda  $y$  previo opportuno trattamento del campione. L'informazione relativa al sistema viene per così dire parzializzata, nel senso che si è costretti a studiare il suo comportamento considerando una caratteristica alla volta come se questa fosse l'unica proprietà del sistema.

Tuttavia, i sistemi analitici sono in genere complessi e le loro caratteristiche sono generalmente correlate tra loro. La mole di dati raccolti (multivariati) con i moderni strumenti (ad esempio non più l'assorbanza a una singola lunghezza d'onda ma l'intero spettro) sollecita l'utilizzo di un approccio di indagine capace di usufruire di tutta l'informazione in essi contenuta.

Questi dati, per loro stessa natura multivariati, necessitano di dover essere elaborati per rendere leggibile ed interpretabile l'informazione in essi contenuta. L'elaborazione dovrà essere in grado di eliminare la maggior parte dell'informazione duplicata, le correlazioni tra variabili (nell'esempio dello spettro è facilmente ipotizzabile che a lunghezze d'onda molto vicine le assorbanze siano dovute allo stesso analita ed alla stessa caratteristica del sistema), e conservare in forma sintetica l'informazione utile all'interpretazione del fenomeno.

I dati multivariati sono generalmente descritti in spazi n-dimensionali (ad esempio n = numero di lunghezze dei potenziali a cui si legge la corrente in una voltammetria ciclica).

Lo scopo del lavoro diventa quindi la rappresentazione del sistema in esame in una struttura base più snella ma che contenga comunque tutta l'informazione utile.

Di seguito, si indicherà con **X** la matrice dei dati di N numero delle sue righe (campioni detti anche oggetti) e K numero delle sue colonne (variabili).

### *3.4.1 PRETRATTAMENTI*

Per utilizzare al meglio l'informazione contenuta nella matrice dei dati X si dovranno adottare dei metodi di elaborazione che siano capaci di considerare l'informazione complessiva contenuta nell'intera matrice conservando solo la parte utile alla risoluzione del problema ed ignorando quella contenente l'informazione ininfluente. Il successo di tali metodi dipende infatti fortemente dalla qualità dei dati in ingresso; è auspicabile quindi che tali dati contengano la minor quantità possibile di rumore e di informazione ininfluente. Spesso vengono infatti utilizzati alcuni trattamenti preliminari mirati ad eliminare o ridurre la parte di informazione non utile alla soluzione del problema esaminato o attribuibile al rumore. La scelta del tipo e del numero di pretrattamenti da eseguire dipende dal tipo di dati a disposizione e dallo scopo dell'elaborazione chemiometrica.

Attraverso tali processi le variabili vengono per così dire "pesate" in modo da fornire a ciascuna di esse la medesima importanza verso il processo di elaborazione vero e proprio che si andrà poi ad eseguire.

Di seguito viene proposta è una lista di alcune delle tecniche di pretrattamento dati più comuni.

- **Centraggio di colonna**

$$\tilde{x}_{i,v} = x_{i,v} - \bar{x}_v$$

Elimina le differenze sistematiche di locazione tra variabili evidenziando solo le variazioni delle variabili nel gruppo di dati analizzato. Le variabili trasformate avranno media zero.

- **Centraggio di riga**

$$\tilde{x}_{i,v} = x_{i,v} - \bar{x}_i$$

Elimina le differenze sistematiche di locazione fra oggetti, ad esempio potrebbe attenuare fenomeni sistematici come la deriva dei segnali; in questo caso si evidenzia la variabilità fra oggetti.

- **Standardizzazione di colonna**

$$\tilde{x}_{i,v} = \frac{x_{i,v}}{S_v}$$

Elimina gli effetti di scala. Questa tecnica permette, per esempio, di confrontare misure di diversa natura su una stessa scala. Le variabili trasformate avranno varianza unitaria.

- **Autoscaling di colonna (studentizzazione)**

$$\tilde{x}_{i,v} = \frac{x_{i,v} - \bar{x}_v}{S_v}$$

Combinando il centraggio e lo scaling di colonna ne combina anche le caratteristiche delle trasformate; elimina cioè gli effetti di locazione (offset) e riconduce le variabili ad una stessa scala. Le variabili trasformate avranno tutte media 0 e varianza unitaria.

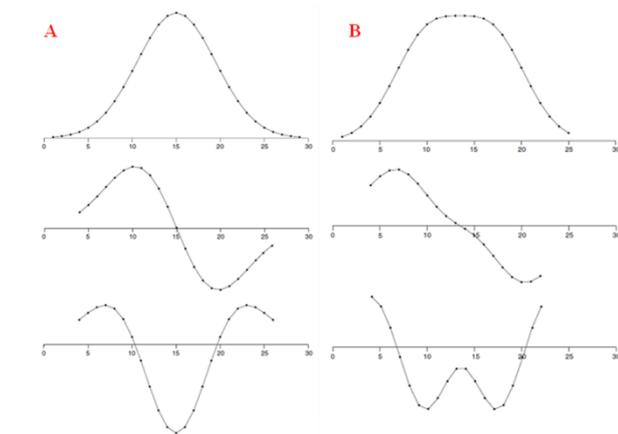
- **Autoscaling di riga (Standard Normal Variate)**

$$\tilde{x}_{i,v} = \frac{x_{i,v} - \bar{x}_i}{S_i}$$

Questo è l'analogo dell'autoscaling di colonna nello spazio degli oggetti. E' utile, per esempio, quando si trattano tecniche spettroscopiche per le quali si hanno fenomeni di scattering; questa modalità di trattamento consente spesso di ridurre i suoi effetti sul risultato dell'elaborazione evidenziando invece le caratteristiche più strettamente legate agli oggetti.

- **Derivazione**

È una tecnica che permette di evidenziare picchi sovrapposti e individuare la posizione del picco anche nei casi meno risolti. I picchi di una generica curva, nella derivata I avranno valore zero, mentre in corrispondenza dei flessi si avranno massimi e minimi della funzione derivata. La derivata II presenterà picchi ben definiti; un minimo in corrispondenza del massimo della curva di origine ed un massimo in corrispondenza del picco di minimo della curva.



**Fig. 20 A) Derivata prima e seconda di una generica curva gaussiana: il punto di massimo si azzerava sulla derivata I permettendo una più facile individuazione della posizione del picco, mentre sulla derivata II diventa un minimo ma si riduce la dimensionalità dello stesso. B) La derivata II permette l'individuazione e la risoluzione di due picchi sovrapposti che in prima analisi potrebbero essere confusi per un solo segnale.**

La derivazione consente anche di eliminare la curva del fondo. Tanto più è elevato il grado di derivazione tanto più complessi saranno gli effetti di fondo eliminati. Per esempio usando la derivata di primo grado si riesce ad eliminare un effetto di fondo lineare (quando esiste una retta come linea di base) usando invece una derivata di II grado si può eliminare una linea di base approssimabile con un polinomio di secondo grado e così via.

È da tenere in considerazione comunque che nella derivata numerica di un segnale affetto da rumore sperimentale si ha una esaltazione della rumorosità cosicché in alcuni casi l'utilizzo della tecnica di derivazione diventa pressoché inutile nonché deleterio. Tuttavia esistono alcune tecniche capaci di ridurre l'influenza del rumore; la più usata delle quali è la Savitsky-Golay [18, 19, 20] che combina la derivazione ad un algoritmo di allisciamento delle curve.

La tecnica è applicabile solo se i valori dell'ascissa sono equispaziati tra loro: ipotesi generalmente soddisfatta nelle moderne tecniche strumentali. Il metodo prevede il calcolo di un polinomio di grado  $n$  approssimato localmente su una finestra di  $2m+1$  punti, che verrà spostata di un punto alla volta, ricalcolando ogni volta il valore del suo punto centrale. Sia la dimensione della finestra ( $m$ ) che il grado del polinomio ( $n$ ) devono essere ottimizzati per la particolare applicazione. In questo modo l'algoritmo permette di calcolare le derivate del polinomio sino alla  $(n-1)$ -esima.

Le tecniche di derivazione risultano particolarmente efficaci nella "pulizia del segnale" tuttavia, vista questa loro peculiarità, vanno utilizzate con cautela poiché assieme all'effetto della linea di base spesso si rischia di "lisciare" anche parte dell'informazione utile.

#### *3.4.2 METODI DI CONVALIDA DELLE ELABORAZIONI CHEMIOMETRICHE*

Nelle elaborazioni chemiometriche uno degli aspetti fondamentali è la validazione del modello, ossia la valutazione della capacità di predizione del modello calcolato dal training set nei confronti di dati incogniti (test set).

Di seguito vengono riportate alcune importanti definizioni:

1. training set, è l'insieme dei campioni (oggetti), di cui si conoscono tutte le caratteristiche, usati per calcolare i parametri del modello;
2. evaluation set, è l'insieme dei campioni (oggetti), di cui si conoscono tutte le caratteristiche, usati per verificare la validità del modello in predizione. Questo set non è usato per calcolare i parametri del modello;
3. test set, è l'insieme dei campioni (oggetti) di cui si vuol conoscere la/le caratteristiche per cui si è calcolato il modello.

Nello sviluppo del modello si divide di solito l'insieme dei dati noti in due parti; una di esse, il training set, sarà usata per calcolare i parametri del modello mentre l'altra, l'evaluation set, sarà usata per stimare, secondo opportuni parametri, l'errore che il modello commetterà in predizione.

La convalida può quindi essere fatta misurando due dataset distinti: uno sarà il training set e l'altro l'evaluation set, ognuno di adeguata numerosità.

Questa procedura è quella ottimale quando la numerosità dei campioni è adeguata ma presenta il notevole svantaggio di richiedere la misura su molti campioni allungando i tempi di analisi ed aumentando i suoi costi. Per superare questi problemi di solito si usa un unico dataset che ciclicamente viene suddiviso in due subsets, uno dei quali, il training, più numeroso dell'altro.

I metodi più comuni di suddivisione del dataset sono:

- 1) leave-one-out: si mette nell'evaluation set un solo oggetto alla volta e si ripete la suddivisione tante volte quanti sono gli oggetti del dataset. Al termine del procedimento tutti gli oggetti sono stati una volta nell'evaluation set;
- 2) cross validation: anche in questo caso al termine del procedimento tutti gli oggetti sono stati una volta nell'evaluation set. Per far questo il dataset è suddiviso all'inizio in un numero  $M$  prefissato di subsets; si fanno poi  $M$  cicli ed in ogni ciclo solo uno degli  $M$  gruppi di oggetti sarà usato come evaluation set;
- 3) repeated cross validation: in questo caso si fissa il numero  $M$  dei cicli ed una percentuale di oggetti da assegnare all'evaluation. Ad ogni ciclo un numero di oggetti corrispondente alla percentuale prefissata viene estratto a caso ed usato come evaluation set.

La cross-validation è il metodo di suddivisione più usato in quanto rappresenta meglio la variabilità dei dati come riportato anche da R. Bro et altri [21].

### 3.4.3 PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS (PCA)

L'analisi dei componenti principali [22], Principal Component Analysis (PCA), permette di rappresentare la variabilità dei dati attraverso un numero ristretto di componenti. La tecnica quindi consente di ridurre lo spazio di rappresentazione dei dati multivariati e di cambiare punto di vista rispetto ad essi.

Immaginiamo di dover mettere in grafico i dati della matrice  $\mathbf{X}$ ; ciò vuol dire rappresentare gli  $N$  campioni in uno spazio definito dalle  $K$  variabili, cosicché il valore  $x_{i,j}$  della  $j$ -esima variabile per l' $i$ -esimo campione è il valore della proiezione del campione  $i$ -esimo sul  $j$ -esimo asse (direzione).

Applicare la tecnica della PCA vuol dire proiettare il set di punti in uno spazio diverso rispetto a quello delle variabili originali, nonché ridotto rispetto alle  $K$  direzioni di cui sopra. È come osservare un oggetto da una posizione differente rispetto a quella considerata normalmente.

Il metodo della PCA cerca di individuare le direzioni per cui la varianza dei dati è massima. Questo procedimento è realizzato con una rotazione ortogonale degli assi dopo aver centrato i dati. In questo modo si eliminano gli effetti di offset delle variabili (la nuova origine è posizionata al loro centro) e l'ortogonalità della rotazione assicura la decorrelazione (indipendenza delle nuove variabili) dei nuovi assi. L'operazione può essere riassunta nella seguente formula:

$$\mathbf{X}_{N,K} = \mathbf{T}_{N,K} \mathbf{P}_{K,K}^T$$

La matrice  $\mathbf{T}$  di  $N$  righe e  $K$  colonne rappresenta gli scores ossia le proiezioni dei dati nelle nuove direzioni (autovettori), mentre la matrice  $\mathbf{P}$  di  $K$  righe e  $K$  colonne sono i loadings ossia il contributo (peso) che le vecchie variabili hanno sui nuovi assi; cioè i loadings sono i coefficienti che moltiplicati per la matrice dei dati danno le combinazioni lineari che individuano le nuove direzioni.

La semplice rotazione degli assi conserva la dimensionalità dello spazio, però, essendo questa stata fatta in modo ortogonale, i dati sono indipendenti rispetto alle nuove direzioni; inoltre le nuove direzioni sono calcolate dai diversi algoritmi in ordine decrescente di varianza dei dati spiegata.

Poiché le prime direzioni individuate sono quelle che conservano la maggior parte della varianza dei dati, sulla maggior parte delle altre direzioni sarà rappresentata solo la variabilità dovuta al rumore e/o all'informazione non utile.

Il calcolo della sopradetta rotazione ortogonale fornisce non solo le direzioni ruotate ma ad ognuna di esse associa un autovalore,  $\lambda$ , che stima la varianza dei dati spiegata dalle loro proiezioni in quella direzione.

Gli autovalori possono essere quindi usati per individuare il numero di componenti effettivamente utili a risolvere il nostro problema. Trascurando quelle componenti per cui  $\lambda$  può essere considerato dovuto al solo rumore possiamo selezionare il numero di componenti principali  $A$  da conservare.

Si ha quindi:

$$\mathbf{X}_{N,K} = \mathbf{T}_{N,A} \mathbf{P}_{K,A}^T + \mathbf{E}_{N,K}$$

Dove la matrice  $E$  rappresenta l'errore sistematico (bias) introdotto rappresentando i dati con solo  $A$  componenti principali anziché  $K$  variabili.

La PCA permette quindi di ridurre il numero delle variabili per rappresentare il sistema in modo da ottenerne uno più snello e capace di mantenere l'informazione utile ed eliminare quella superflua.

Tuttavia è importante definire accuratamente il loro numero poiché una stima in difetto potrebbe togliere informazione utile e quindi realizzare un modello incapace di descrivere correttamente i dati; d'altro canto una stima in eccesso di PCs potrebbe significare introdurre informazione non utile e quindi rumore con il risultato di un modello poco robusto nei confronti di dati esterni da inserire in un secondo momento.

Esistono diversi metodi per far questo. Un modo per valutare il numero di PCs è lo scree plot: si rappresenta in un grafico il valore degli autovalori  $\lambda$  (varianza spiegata dal componente), o il loro logaritmo, contro il numero di componenti principali. Sono quindi da considerare significativi gli  $A$  componenti per cui si ha una brusca diminuzione della varianza residua.

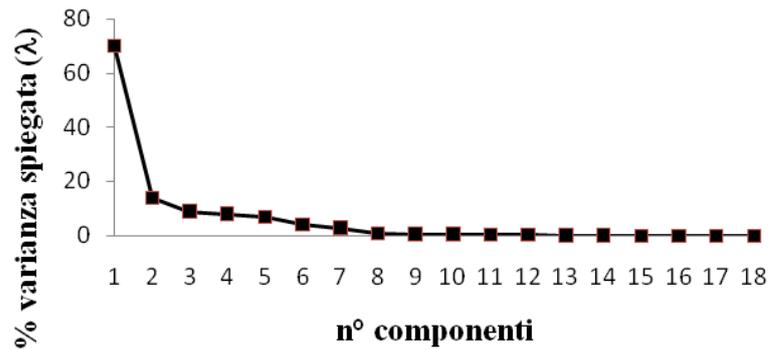


Fig. 21: Scree plot.

Una tecnica alternativa è il criterio dell'autovalore medio, detta anche regola di Kramer, secondo la quale si considerano significativi tutti quei componenti il cui autovalore  $\lambda$  sia maggiore rispetto all'autovalore medio.

$$\lambda_1 \geq \lambda_2 \geq \dots \geq \lambda_A \geq \bar{\lambda} = \frac{\sum_{m=1}^V \lambda_m}{V}$$

#### 3.4.4 PLS

La regressione ai minimi quadrati parziali [23,24] è una delle tecniche maggiormente adottate nell'elaborazione di dati multivariati. Combinando fondamentalmente i principi della PCA e della regressione multipla, PLS risulta particolarmente utile quando vi è la necessità di predire un set di variabili dipendenti a partire da un ampio set di variabili indipendenti (predittori). La tecnica differisce quando lo scopo è la predizione da una matrice dei dati  $\mathbf{X}$  (le cui colonne sono le variabili predittrici), di una variabile dipendente alla volta (PLS1) o di più variabili dipendenti simultaneamente (PLS2).

In PLS lo scopo è quindi riuscire a predire la matrice delle risposte  $\mathbf{Y}$  dalla matrice  $\mathbf{X}$  (predittori). Le tecniche PLS permettono, al contrario della regressione ai minimi quadrati multivariata, di calcolare la regressione anche quando il numero di predittori è molto maggiore del numero di osservazioni. Questo perché PLS calcola, in modo simile alla PCA, un numero ridotto di variabili latenti a partire dalle variabili indipendenti.

Mentre nel caso della PCA la selezione dei PCs viene fatta in modo da selezionare quei componenti che spiegano la maggior parte della variabilità dei dati contenuti nella matrice  $\mathbf{X}$ , nel PLS la selezione prevede la scelta di quei componenti (definiti anche variabili latenti) "rilevanti" sia per la matrice  $\mathbf{X}$  che per la matrice  $\mathbf{Y}$ . Più precisamente tali componenti debbono massimizzare la varianza ritenuta della matrice  $\mathbf{X}$  e allo stesso tempo devono anche massimizzare la covarianza con la matrice  $\mathbf{Y}$ .

In PLS1 la matrice  $\mathbf{X}$  si decompone in PCs, cosicché  $\mathbf{X} = \mathbf{T} \mathbf{P}^T + \mathbf{E}$ , nella quale la matrice  $\mathbf{E}$  indica gli errori commessi nell'usare le componenti principali anziché le variabili originali.

In PLS1 le variabili latenti sono anche ottimizzate per spiegare la loro correlazione al vettore della variabile dipendente  $\mathbf{y}$  secondo la  $\mathbf{y}_{N,1} = \mathbf{T}_{N,A} \mathbf{D}_{A,1}$ .

Questo perché non è detto che i componenti principali che conservano la maggior parte della varianza dei predittori (come nel caso della PCA), siano anche i più rilevanti ai fini della regressione.

Quando si ha a che fare con più di una variabile dipendente alla volta, si può usare PLS2 in cui le due matrici  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Y}$ , vengono decomposte in componenti principali secondo:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \mathbf{P}^T + \mathbf{E}$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{U} \mathbf{C}^T + \mathbf{F}$$

In queste le matrici  $\mathbf{E}$  ed  $\mathbf{F}$  indicano gli errori commessi nell'usare le componenti principali, rispettivamente della matrice dei predittori e di quella delle variabili dipendenti, in luogo delle rispettive variabili originali.

Questi componenti principali, meglio detti variabili latenti, sono ottimizzati con la relazione interna

$$\mathbf{U}_{N,A} = \mathbf{T}_{N,A} \mathbf{D}_{A,A}$$

che consente di correlare i PCs della matrice dipendente a quelli della matrice indipendente per massimizzare la loro covarianza.

L'algoritmo PLS è ciclico ed alla fine consente di ottenere delle variabili latenti ortogonali tra loro ma ottimizzate per rappresentare la correlazione tra i dati delle matrici  $\mathbf{X}$  ed  $\mathbf{Y}$ .

PLS permette di calcolare la matrice dei coefficienti  $\mathbf{B}$  che consentono a loro volta di calcolare i predittori  $\mathbf{Y}$  in forma chiusa secondo l'espressione:

$$\mathbf{Y} = \mathbf{X} \mathbf{B}$$

Una possibilità per ottenere un modello capace di rappresentare e di "interpolare" al meglio i dati attraverso i quali è stato costruito, è utilizzare un numero elevato di variabili latenti; tale scelta tuttavia, conduce spesso ad un fenomeno chiamato overfitting secondo il quale all'aumentare del numero delle variabili latenti utilizzate, il modello tende a interpolare sempre meglio i dati del training set ma perde capacità predittiva. Abbinando invece al PLS una delle tecniche di convalida sopra descritte è possibile sviluppare un modello capace allo stesso tempo di "calibrare" al meglio i dati del training set della matrice  $\mathbf{X}$  e mantenere una buona capacità predittiva nei confronti di dati esterni. In questo modo si evitano da un lato fenomeni di overfitting, e dall'altro perdita di informazione dovuta all'utilizzo di poche variabili latenti. I metodi PLS permettono quindi non solo di correlare un gruppo di variabili indipendenti  $\mathbf{X}$  con un gruppo di variabili dipendenti  $\mathbf{Y}$  ma anche di trovare la dimensionalità ottimale (variabili latenti significative) per rappresentare i dati e calcolare il modello.

#### *3.4.5 TECNICHE DI CLASSIFICAZIONE E MODELLAZIONE*

Esistono nella pratica di laboratorio degli insiemi di dati con proprietà intrinseche non quantificabili strumentalmente, ad esempio provenienza di un prodotto, gusto di un cibo, varietà vegetale di una certa pianta, tipo di malattia di un paziente ecc. che tuttavia sono altamente rappresentative dello stesso insieme. In questo caso si suole raggruppare i dati in base all'omogeneità delle proprietà prese in considerazione. Lo scopo delle tecniche chemiometriche di classificazione è quello di considerare una o più caratteristiche e collegarle alle proprietà chimico/fisiche misurabili sui campioni.

I campioni, le cui misure sono raccolte nella matrice  $\mathbf{X}$  dei dati, sono associati alle proprietà in esame secondo gruppi chiamati categorie o classi, omogenee e le proprietà sono generalmente a loro volta associate a variabili codificate.

Lo scopo delle tecniche di classificazione è quello di stimare la probabilità a posteriori di appartenere alla classe  $c$  dell'oggetto  $\mathbf{x}$ , che secondo il teorema di Bayes si ottiene mediante

$$p(\mathbf{c} / \mathbf{x}) = \frac{p(\mathbf{c}) p(\mathbf{x} / \mathbf{c})}{\sum_c p(\mathbf{c}) p(\mathbf{x} / \mathbf{c})}$$

in cui  $p(\mathbf{x}/\mathbf{c})$  è la probabilità a priori dell'oggetto  $\mathbf{x}$  nella classe  $\mathbf{c}$  e  $p(\mathbf{c})$  è la probabilità a priori della classe  $\mathbf{c}$ .

Considerando due classi  $\mathbf{c}_i$  e  $\mathbf{c}_k$  ad esempio, l'oggetto  $\mathbf{x}$  viene assegnato alla categoria  $\mathbf{c}_i$  se:

$$p(\mathbf{c}_i/\mathbf{x}) > a \cdot p(\mathbf{c}_k/\mathbf{x})$$

viceversa, l'oggetto  $\mathbf{x}$  viene assegnato alla categoria  $\mathbf{c}_k$  quando:

$$p(\mathbf{c}_k/\mathbf{x}) > a \cdot p(\mathbf{c}_i/\mathbf{x})$$

$a$ , se diverso da 1, definisce un intervallo di indecisione.

Quando

$$p(\mathbf{c}_i/\mathbf{x}) \leq a \cdot p(\mathbf{c}_k/\mathbf{x})$$

e

$$p(\mathbf{c}_k/\mathbf{x}) \leq a \cdot p(\mathbf{c}_i/\mathbf{x})$$

l'oggetto non può essere attribuito a nessuna delle due categorie.

Quando invece

$$p(\mathbf{c}_i/\mathbf{x}) = p(\mathbf{c}_k/\mathbf{x})$$

si ha la stessa probabilità per l'oggetto  $\mathbf{x}$  di appartenere ad ognuna delle due classi.

Esistono diverse tecniche capaci di eseguire classificazioni di questo tipo e vengono generalmente distinte in tecniche di classificazione e tecniche di modellazione.

Le prime sono concepite in modo da calcolare dei modelli aperti per ogni classe cosicché ogni oggetto dovrà essere attribuito ad una classe anche quando il campione è completamente estraneo al problema analizzato. Tecniche di questo tipo sono la linear discriminant analysis (LDA), K-Nearest Neighbours (KNN) nonché PLS-DA.

Le tecniche di modellazione invece calcolano modelli chiusi per ogni classe. In questo modo, diversamente dalla classificazione, può accadere che alcuni oggetti non vengano assegnati né all'una né all'altra classe.

Su questo principio base sono sviluppate ad esempio le tecniche di modellazione quadratic discriminant analysis (UNEQ-QDA) e SIMCA.

Nelle tecniche di classificazione e modellazione si fa riferimento ad un assunto per cui un oggetto prossimo al baricentro della classe ha una maggior probabilità di appartenervi rispetto ad uno che è invece lontano da tale baricentro. Questo permette di ipotizzare, in particolar modo per le tecniche di modellazione, una funzione di distribuzione sulla base della quale assegnare la probabilità di appartenenza alla classe del campione in esame.

Anche per le tecniche sopra citate è opportuno ricorrere alla validazione, come sopra spiegato, per valutare l'affidabilità del modello. Si possono valutare la capacità di classificazione e di predizione del modello calcolato valutando il grado di successo, espresso in percentuale, nel classificare i campioni rispettivamente del training e dell'evaluation set.

Valutare solamente la capacità di classificazione comporta spesso una sovrastima della bontà del modello ed è per questo motivo che diventa necessaria la stima della sua capacità predittiva. Se la capacità di classificazione e di predizione risultano sostanzialmente differenti, vuol dire che il modello decisionale dipende fortemente dagli oggetti attraverso i quali è stato costruito; è quindi un modello non stabile e presumibilmente con scarse potenzialità di applicazione ai dati reali (test set).

- **Classificazione con PLS**

L'algoritmo di regressione PLS può facilmente essere modificato per effettuare la classificazione [25]. Questo è possibile codificando delle variabili categoriche che possono essere usate come variabili dipendenti in PLS; in questo modo l'algoritmo consente di fare un'analisi discriminante detta PLS-DA [26].

La codifica delle variabili categoriche è fatta attribuendo dei valori discontinui di presenza/assenza. Tutti gli oggetti di una certa categoria avranno valore 1 nella relativa variabile categorica mentre tutti gli oggetti non appartenenti alla categoria saranno codificati 0 nella predetta variabile; i valori di codifica potrebbero anche essere diversi come per esempio 1, -1.

#### 4 RISULTATI E DISCUSSIONE

In questo lavoro di tesi, è stato utilizzato un nuovo metodo per eseguire misure attraverso voltammetria ciclica con un microelettrodo di platino direttamente in campioni di olio extravergine riportati nella seguente Tabella 7:

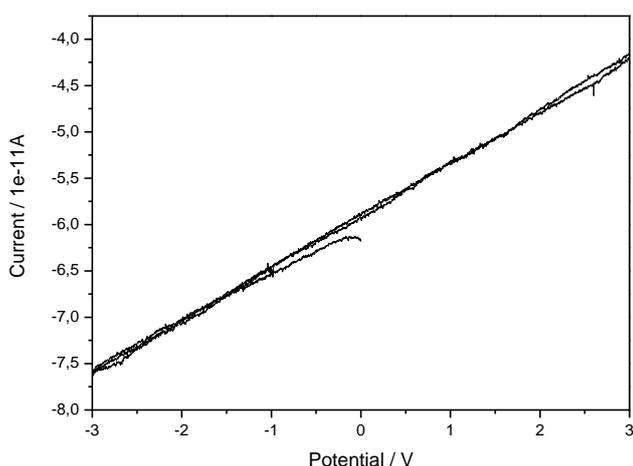
**Tabella 7: elenco campioni**

NUMERO	CODICE	Varietà di olio	NUMERO	CODICE	Varietà di olio
1	COR083	Coroncina	63	MOG063	Piantone di Mogliano
2	COR084	Coroncina	64	MIG064	Mignola
3	COR085	Coroncina	65	MIG065	Mignola
4	COR086	Coroncina	66	COR066	Coroncina
5	COR087	Coroncina	67	COR067	Coroncina
6	COR088	Coroncina	68	MOG068	Piantone di Mogliano
7	MIG093	Mignola	69	MOG069	Piantone di Mogliano
8	MIG094	Mignola	70	COR070	Coroncina
9	MIG095	Mignola	71	MOG071	Piantone di Mogliano
10	MIG096	Mignola	72	COR072	Coroncina
11	MIG097	Mignola	73	MOG073	Piantone di Mogliano
12	MIG098	Mignola	74	MOG074	Piantone di Mogliano
13	MIG099	Mignola	75	MIG075	Mignola
14	MIG100	Mignola	76	MIG076	Mignola
15	MIG101	Mignola	77	MIG077	Mignola
16	MOG089	Piantone di Mogliano	78	MOG078	Piantone di Mogliano
17	MOG090	Piantone di Mogliano	79	MIG079	Mignola
18	MOG091	Piantone di Mogliano	80	COR080	Coroncina
19	MOG092	Piantone di Mogliano	81	MIG081	Mignola
62	MOG062	Piantone di Mogliano	82	MIG082	Mignola

Il metodo è basato sull'uso di liquidi ionici a temperatura ambiente, aggiunti agli oli come elettroliti di supporto al fine di incrementare la conducibilità dei campioni [27]. Infatti l'uso diretto di macroelettrodi o microelettrodi direttamente in matrici di olio extravergine caratterizzate da alta viscosità, bassa conducibilità e l'impossibilità di solubilizzare sufficienti quantità di elettroliti di supporto, non permette di eseguire misure attraverso voltammetria ciclica.

Questi campioni mostrano scarsa solubilità nei solventi standard utilizzati per le misure elettrochimiche e non è stato proposto in letteratura nessun elettrolita di supporto adatto ad aumentarne la conducibilità. Sono state eseguite delle prove per solubilizzare piccole quantità di elettroliti di supporto quali litio perclorato, tetrabutylammonio perclorato e tetraetilammonio perclorato ma tutti con esito negativo.

Quanto riportato finora è stato dimostrato inizialmente in questo lavoro di tesi (Fig. 22) testando campioni di olio extravergine di oliva filtrati con filtro di acetato di cellulosa da 15  $\mu\text{m}$  (per rimuovere il materiale in sospensione) ed utilizzando una cella elettrochimica a 3 elettrodi: come elettrodo di lavoro si è utilizzato un Glassy Carbon (o un elettrodo di platino), avvolto in un supporto di teflon mentre per il contro elettrodo e l'elettrodo di pseudo-riferimento si è utilizzato un filo di platino.



**Fig. 22:** voltammetria ciclica con un macroelettrodo Glassy Carbon utilizzando il campione 1

Data l'elevata resistenza della soluzione (e la caduta ohmica  $iR_s$  estremamente elevata come risulta evidente in Fig. 22), si è proceduto utilizzando dei microelettrodi di platino (elettrodi con una dimensione critica nel range compreso tra 10 nm e 50  $\mu\text{m}$ ) come elettrodi di lavoro, ciò comporta una drastica diminuzione della corrente faradica e di conseguenza un'elevata riduzione della distorsione dei segnali elettrochimici dovuti a cadute ohmiche della cella elettrochimica ( $iR$  drop), perciò i microelettrodi sono usati in soluzioni ad elevata resistenza. Parallelamente alla diminuzione della superficie elettrodica si ottiene una diminuzione della corrente capacitiva, a questa proporzionale, che è un altro fattore di disturbo nelle misure elettrochimiche. Utilizzando dei microelettrodi non si necessita di una geometria della cella ben definita ed occorre soltanto una cella elettrochimica a 2 elettrodi, questo porta ad una semplificazione dell'apparato elettrochimico.

I microelettrodi sono costituiti da piccoli fili di metallo o di fibre di diametro (5-100 micron) sigillati all'interno di corpi in vetro temperato. L'estremità appiattita è lucidata a specchio. I microelettrodi sono disponibili in una varietà di materiali, tra cui fibre di carbonio, platino (Fig. 23), oro e argento. Altri materiali possono essere incorporati se sono disponibili in filo o in fibra e se formano una buona tenuta con resina epossidica. [28]

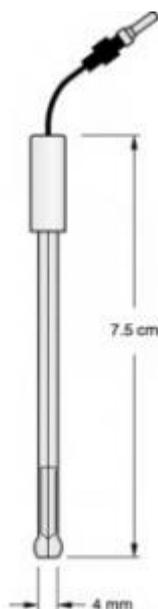
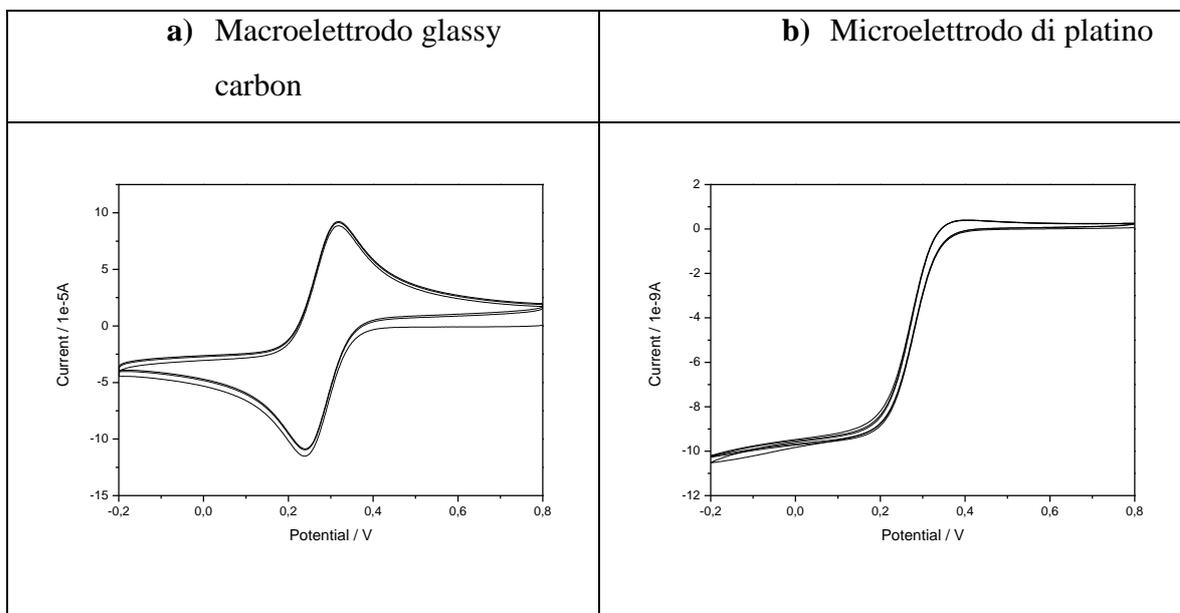


Fig. 23: un microelettrodo di platino

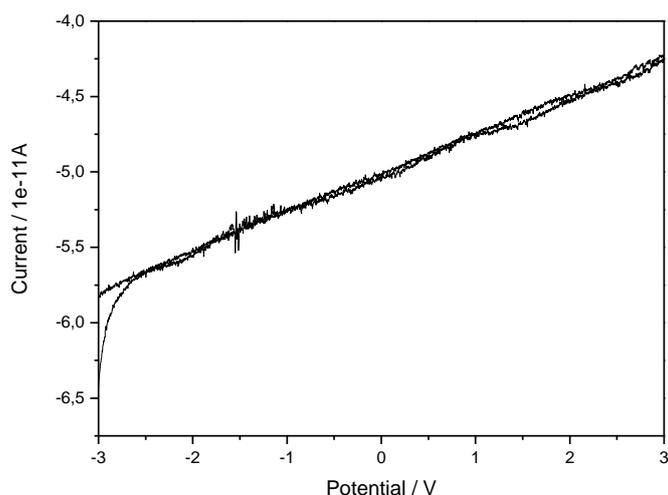
Per verificare l'effettivo comportamento da microelettrodi sono state eseguiti voltammogrammi ciclici in soluzione di ferricianuro utilizzando un microelettrodo di platino, il quale è stato paragonato a quello eseguito utilizzando un macroelettrodo di glassy carbon. Di seguito vengono riportate le due Fig. 24 a) e b) che mostrano le due CV a confronto:



**Fig. 24 Voltammogramma ciclico di un sistema redox reversibile in soluzione di  $K_3Fe(CN)_6$   $5.0 \cdot 10^{-3}$  M in KCl 1.0 M utilizzando a) macrolettrodo di glassy carbon e b) microlettrodo di platino.**

Le figure confermano il comportamento da microelettrodo, come spiegato precedentemente nella parte sperimentale.

In seguito sono stati quindi utilizzati microelettrodi di platino come elettrodi di lavoro per eseguire misure voltammetriche direttamente sui campioni di olio ma nessun segnale di corrente è stato ottenuto nell'intero range di potenziale studiato, come mostrato nelle seguente Fig. 25:



**Fig. 25** voltammetria ciclica con microelettrodo di platino utilizzando il campione 1 puro

Questo conferma che anche utilizzando microelettrodi, le cui proprietà vantaggiose per analisi elettroanalitiche dirette in mezzi a conducibilità molto bassa sono ben documentate in letteratura, non è possibile eseguire misure voltammetriche dirette in oli vegetali puri.

Agli oli sono stati quindi aggiunti liquidi ionici a temperatura ambiente (RTILs) in modo da renderli adeguatamente conducibili.

I liquidi ionici sono sali organici con temperature di fusione inferiori ai 100°C. Quelli che si presentano liquidi a temperatura ambiente costituiscono i cosiddetti “Room Temperature Ionic Liquids”, o RTIL.

Il primo rappresentante di sale liquido a temperatura ambiente, il nitrato di etilammonio ( $T_f = 12^\circ\text{C}$ ) risale al 1914, anche se solo successivamente la chimica di questi sali ha riscontrato un ampio interesse. I cloroalluminati organici, prima sintetizzati nel 1951, e poi studiati in dettaglio dal 1970, sono oggi considerati la prima generazione dei liquidi ionici.

Costituiti semplicemente da ioni, i liquidi ionici presentano un ampio range liquido, una bassa infiammabilità, una scarsa tossicità e un’alta stabilità termica, che li rendono solventi *green* (anche se queste caratteristiche sembrano non appartenere a tutte le classi di liquidi ionici).

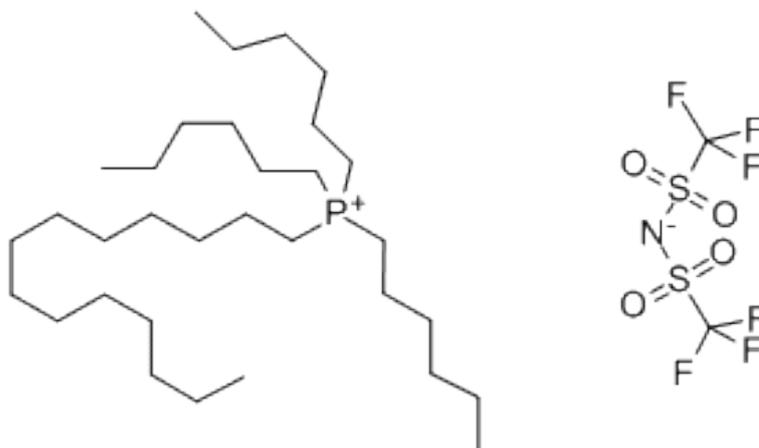
Le loro strutture gli consentono di essere altamente miscibili in un ampio range di solventi, includendo solventi a polarità molto bassa come ad esempio il toluene.

Inoltre le loro peculiari proprietà hanno consentito applicazioni in diversi campi, tra cui sintesi organica, catalisi, biocatalisi, tecniche di separazione, elettrochimica, chimica analitica e nanotecnologia.

Generalmente sono costituiti da un catione organico come lo ione ammonio, fosfonio, solfonio, pirrolidinio, piperidinio o da un catione aromatico come l'1,3-dialchilimidazolio e il piridinio (i più largamente usati).

In questo lavoro di tesi è stato utilizzato il liquido ionico trihexyl(tetradecyl)phosphonium bis(trifluoromethylsulfonyl) imide ([TETDP]<sup>+</sup>[imide]<sup>-</sup>), il quale agisce come elettrolita di supporto e fornisce la sufficiente conducibilità per gli esperimenti voltammetrici.

In Fig. 26 viene riportata la formula di struttura del reattivo.



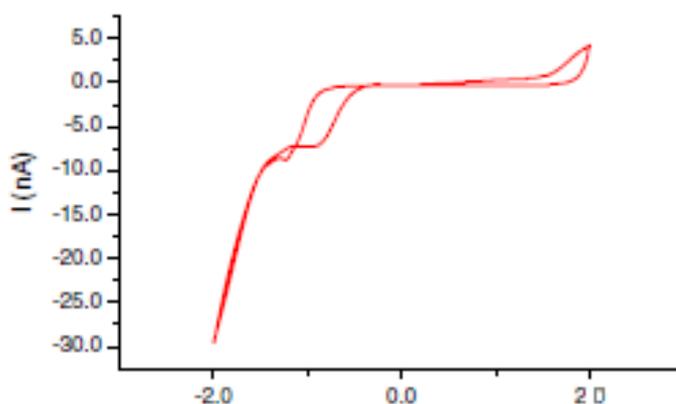
**Fig. 26 Formula di struttura del liquido ionico trihexyl(tetradecyl)phosphonium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide ([TETDP]<sup>+</sup>[imide]<sup>-</sup>)**

Inizialmente è stato studiato il comportamento voltammetrico del [TETDP]<sup>+</sup>[imide]<sup>-</sup> puro attraverso voltammetria ciclica.

La Fig. 27 mostra il tipico voltammogramma ciclico registrato a 50 mV s<sup>-1</sup> utilizzando il microelettrodo di Pt nell'RTIL. Si può osservare come nel liquido ionico investigato, i limiti catodici e anodici si trovino a potenziali generalmente più bassi di circa -2.0 V e più alti di circa +2.0 V rispettivamente, fissando quindi un'ampia "electrochemical window".

Questa stabilità elettrochimica che risulta essere di notevole importanza (ed è una proprietà fondamentale al fine di utilizzare gli RTILs come elettroliti di supporto), è collegata alla stabilità catodica intrinseca del sale di fosfonio quaternario e per quanto riguarda la parte ossidativa, alla “forza” dell’anione imide.

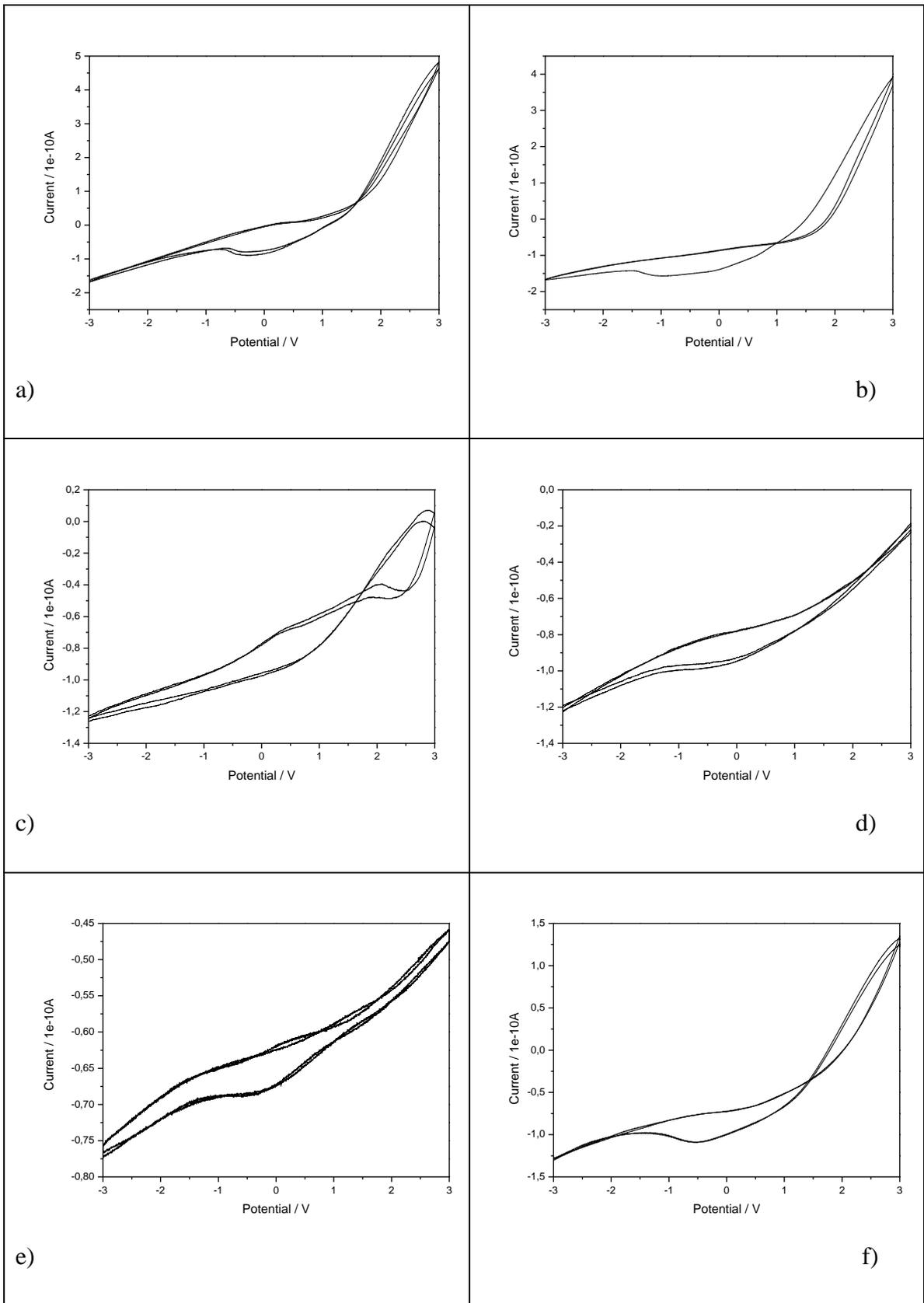
Va sottolineato che sia il limite catodico che quello anodico è influenzato da tracce di acqua presenti nel liquido ionico.



**Fig. 27 Voltammogramma ciclico registrato in [TETDP]<sup>+</sup>[imide]<sup>-</sup> puro utilizzando un microelettrodo di platino.**

I campioni di olio sono stati accuratamente mescolati con il liquido ionico, il quale ha dimostrato una buona miscibilità con tutti i campioni di olio extravergine di oliva.

Le figure riportate di seguito mostrano tipici voltammogrammi registrati utilizzando diversi campioni di olio mescolati con [TETDP]<sup>+</sup>[imide]<sup>-</sup> 0.1 M (con questa concentrazione si conferisce una sufficiente conducibilità alla matrice naturale, senza perdere le caratteristiche dell’olio).



**Fig. 28:** ciclovoltammogrammi di diversi campioni. Dall'altro al basso e da sinistra a destra: campione 1, campione 5, campione 6, campione 7, campione 8, campione 17.

I voltammogrammi ciclici mostrano un picco quasi reversibile, ma notevoli differenze sono osservate nella forma e nella posizione dei picchi.

Confrontando i voltammogrammi ciclici in Fig. 28 con quello in Fig. 27, si può osservare chiaramente che il profilo I/E ottenuto dai campioni di olio mescolati con [TETDP]+[imide]<sup>-</sup> 0.1 M differiscono totalmente dal profilo I/E del liquido ionico puro, ciò indica quindi che possa essere effettivamente rappresentativo della natura dell'olio.

Il contenuto di acqua negli oli può influenzare significativamente la forma della voltammetria ciclica, soprattutto al limite catodico ed anodico. L'acqua è un componente minore degli oli di oliva e gioca un ruolo importante nella stabilità o nelle caratteristiche antiossidanti degli oli di oliva. Il suo contenuto può variare da circa 300 a 2,000 mg/kg di olio e rappresenta un fattore importante nel determinare la qualità dei campioni. I contributi di corrente dovuti al contenuto di ossigeno e di acqua dei campioni, possono essere utili per la caratterizzazione e la discriminazione degli oli.

I voltammogrammi, registrati utilizzando olio/RTIL, sono stati elaborati attraverso tecniche chemometriche per estrarre informazioni sulle caratteristiche dei campioni, per valutare la capacità del sistema di discriminazione e di predizione. Le curve voltammetriche sono state quindi pre-elaborate e utilizzate come fonte di dati per le analisi statistiche.

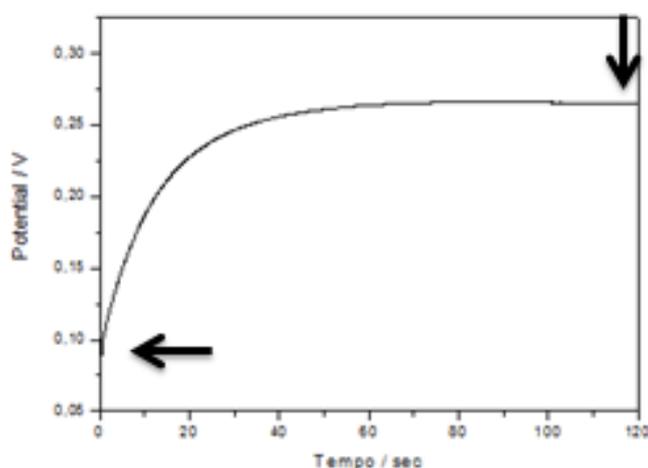
Le tecniche elettrochimiche sono state utilizzate anche nella seconda parte di questo lavoro di tesi, per studiare la componente antiossidante dei diversi campioni di olio extravergine di oliva. I composti fenolici sono antiossidanti naturali presente in oli di oliva vergine (VOOs) e giocano un ruolo molto importante nella qualità degli oli poiché essi contribuiscono significativamente alla loro stabilità verso i processi di ossidazione.

I composti fenolici possiedono un importante “comportamento” elettrochimico e questa attività redox può essere utilizzata per caratterizzare il contenuto fenolico di un campione attraverso metodi elettrochimici [29]

In questo lavoro è stato misurato il potenziale a circuito aperto OCV (Open Circuit Potential, che in letteratura elettrochimica è anche chiamato “zero-current potential” o “rest potential”) cioè il potenziale che viene misurato quando un voltmetro, la cui resistenza interna è così alta che nessuna corrente rilevante fluisce attraverso di esso durante la misura, è posto nella cella.

I valori degli OCV sono molto importanti poiché ci forniscono una misura indiretta del potere ossidante o riducente della soluzione e ci permette quindi di correlare il potenziale con la componente fenolica presente negli oli e caratterizzare il relativo potere antiossidante.

I valori di OCV sono stati misurati per tutti i campioni sia a  $t=0$  cioè appena l'elettrodo è stato posizionato nella soluzione di olio sia a  $t=120$  sec cioè quando il potenziale ha raggiunto il valore asintotico, come mostrato nella seguente Fig. 29:



**Fig. 29: OCV di un campione di olio d'oliva**

Sono stati misurati entrambi i valori di OCV poiché utilizzando gli oli, i quali hanno una viscosità elevata, il valore asintotico potrebbe risultare non veritiero in quanto la matrice vegetale potrebbe contaminare la superficie dell'elettrodo irreversibilmente e falsare il valore di potenziale misurato, mentre il valore di potenziale iniziale risulta più attendibile poiché l'elettrodo appena immerso viene precedentemente pulito meccanicamente.

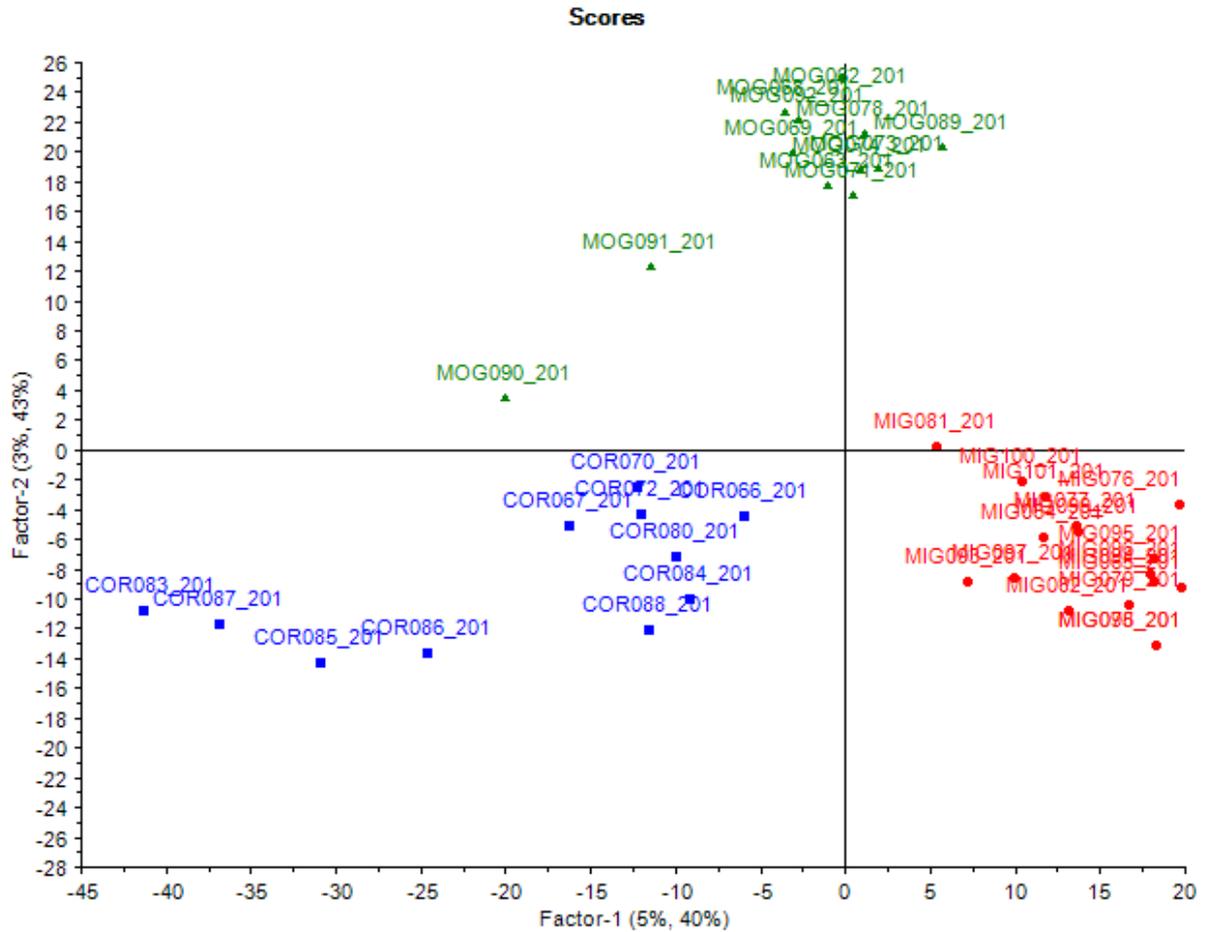
Di seguito viene mostrata la tabella che riporta i campioni di olio ed i relativi valore di OCV misurati sia a  $t=0$  che al valore asintotico:

**Tabella 8: Catalogo campioni di olio d'oliva e relativi OCV**

CAMPIONE	CODICE	OCV $E_{asint}$	OCV $E_{t=0}$	CAMPIONE	CODICE	OCV $E_{asint}$	OCV $E_{t=0}$
1	COR083	0,2649	0.0855	63	MOG063	0.3239	0.6589
2	COR084	0,5615	0.1625	64	MIG064	0.1808	0.5782
3	COR085	0,7261	0.0547	65	MIG065	0.1047	0.6116
4	COR086	0,8478	0.3757	66	COR066	0.2291	0.6538
5	COR087	0,4879	0.1651	67	COR067	0.0028	0.6472
6	COR088	0,7781	0.1929	68	MOG068	0.4004	0.6664
7	MIG093	0,8018	0.1438	69	MOG069	0.3373	0.6053
8	MIG094	0,8639	0.4460	70	COR070	0.2719	0.5948
9	MIG095	0,7911	0.3037	71	MOG071	0.2519	0.9044
10	MIG096	0,8396	0.2007	72	COR072	0.2438	0.9667
11	MIG097	0,5222	0.0207	73	MOG073	-10.0008	0.5645
12	MIG098	0,6608	0.1166	74	MOG074	0.0616	0.8260
13	MIG099	0,7315	0.0764	75	MIG075	-7.1108	0.7168
14	MIG100	1,4008	0.5244	76	MIG076	0.4451	0.7619
15	MIG101	1,0245	0.1887	77	MIG077	0.0384	0.6946
16	MOG089	0,9448	0.3408	78	MOG078		
17	MOG090	0,8478	0.3689	79	MIG079	0.4714	0.7596
18	MOG091	0,8451	0.1899	80	COR080	0.3806	0.7271
19	MOG092	0,841	0.4011	81	MIG081	0.227	0.5714
62	MOG062	0.1833	0.6923	82	MIG082	0.3642	0.5957



La Fig. 31 riporta le stesse informazioni ottenute utilizzando tutta la voltammetria ciclica per un totale di 6000 variabili.



**Fig. 31** Proiezione dei campioni sulle prime due variabili latenti (componenti principali) di PLS ottenuta utilizzando tutta la voltammetria ciclica.

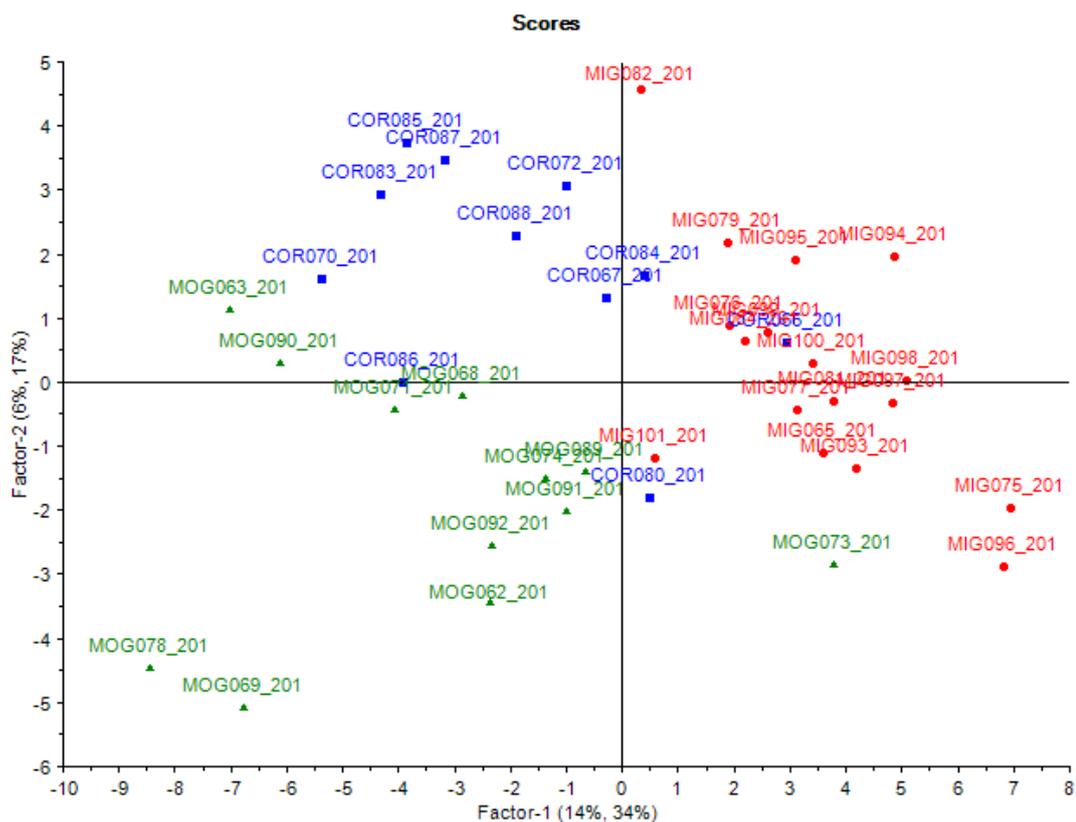
Il confronto delle due figure evidenzia inequivocabilmente un netto miglioramento del raggruppamento delle varie tipologie di olio. In particolare si osserva una buona omogeneità per la qualità Mignola mentre per le qualità Mogliano e Coroncina abbiamo una maggiore dispersione che potremmo imputare, in prima approssimazione alla contiguità geografica delle due cultivar, come si può osservare nella seguente Fig. 32:



**Fig. 32** Mappa con le località di produzione delle tre cultivar

Ovviamente la bontà del risultato ottenuto è senz'altro dovuta all'elevato numero di variabili utilizzate.

Il passo successivo consiste nel ripetere la stessa procedura imponendo la riduzione delle variabili (da 6000 a 136 variabili). Questo porta ai risultati della Fig. 33.

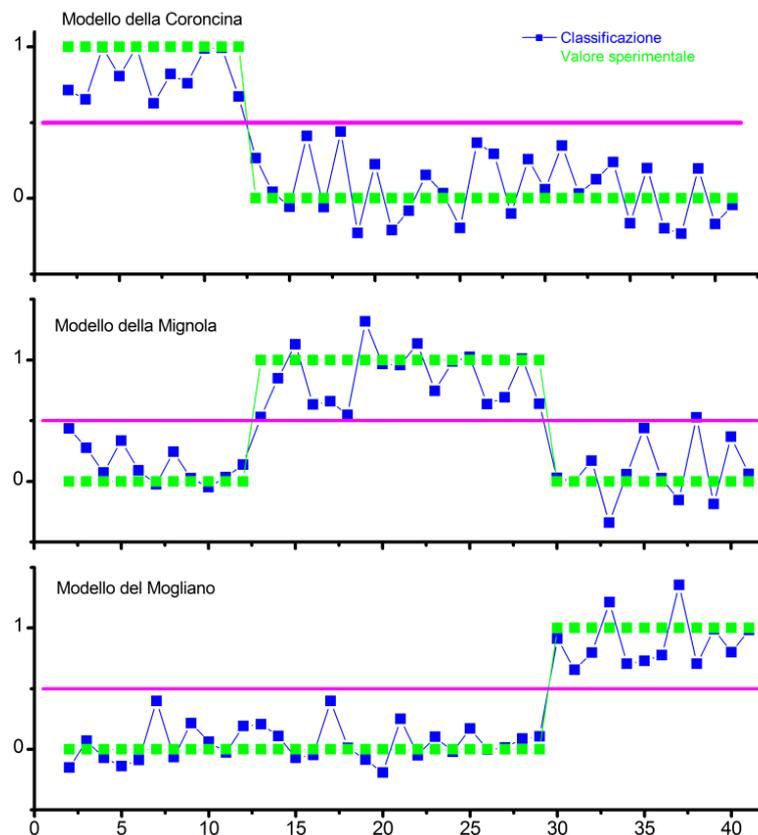


**Fig. 33** Proiezione dei campioni sulle prime due variabili latenti (componenti principali) di PLS ottenuta utilizzando tutta la voltammetria ciclica e 136 variabili selezionate con apposito algoritmo.

Ad una prima osservazione sembra che quest'ultima elaborazione porti a risultati peggiori dei casi precedenti. In realtà dobbiamo evidenziare che, per brevità di trattazione, sono state riportate solo le proiezioni sui primi due componenti principali e dunque solo una piccola parte dell'informazione complessiva ottenute nelle varie elaborazioni. Tuttavia a seguito di una forte semplificazione del modello che è passato da 6000 a 136 variabili, manteniamo un'apprezzabile separazione e concentrazione delle tre varietà.

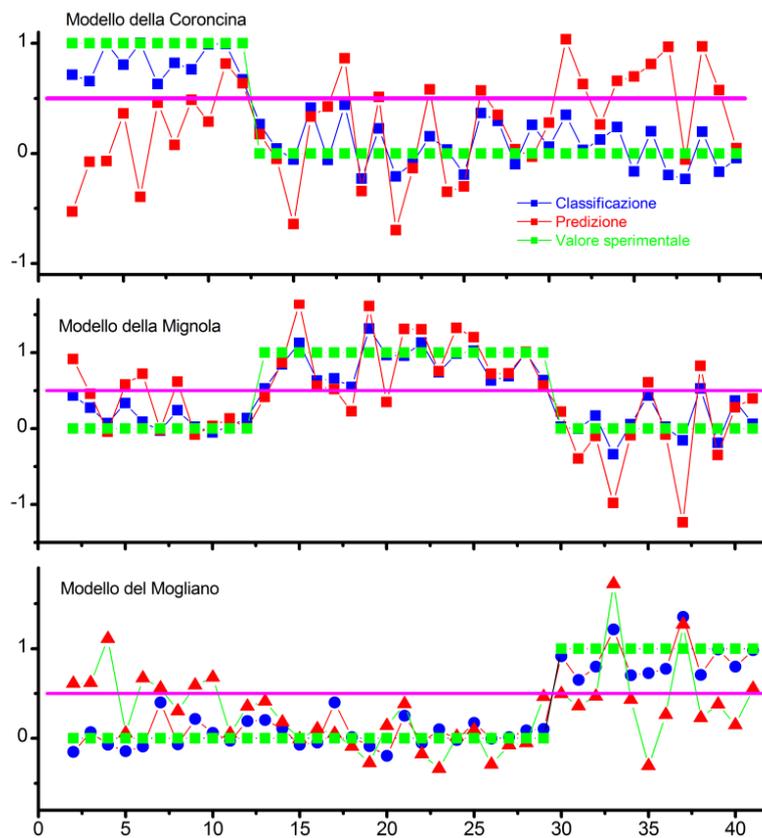
La Fig. 34 riporta in maniera grafica la capacità di classificazione di quest'ultima elaborazione. Il valore 1 del punto (in verde) assegna il campione alla varietà considerata mentre il valore 0 lo esclude da quella varietà. Nel caso dei risultati dell'elaborazione il punto blu viene assegnato positivamente alla varietà se supera lo score di 0.5.

Come si può osservare, tutti i campioni analizzati sono assegnati correttamente alla propria varietà.



**Fig. 34: capacità di classificazione attraverso l'uso di 136 variabili**

La Fig. 35 riporta oltre ai risultati della classificazione, discussi precedentemente, anche quelli in predizione (punti in rosso). In questo caso si osserva un tasso di successo piuttosto basso, come viene descritto di seguito nella discussione sulle matrici di confusione.



**Fig. 35:** capacità di classificazione attraverso l'uso di 136 variabili con anche l'uso dei dati in predizione

La bontà di questa analisi è stata verificata mediante il calcolo delle matrici di confusione sia in classificazione sia in predizione.

Per avere un'idea visiva delle variabili utilizzate (136) la Fig. 36 riporta tre CV, una per ciascuna varietà, con un marker (X) posizionato sul valore di potenziale in corrispondenza del valore della corrente utilizzato.

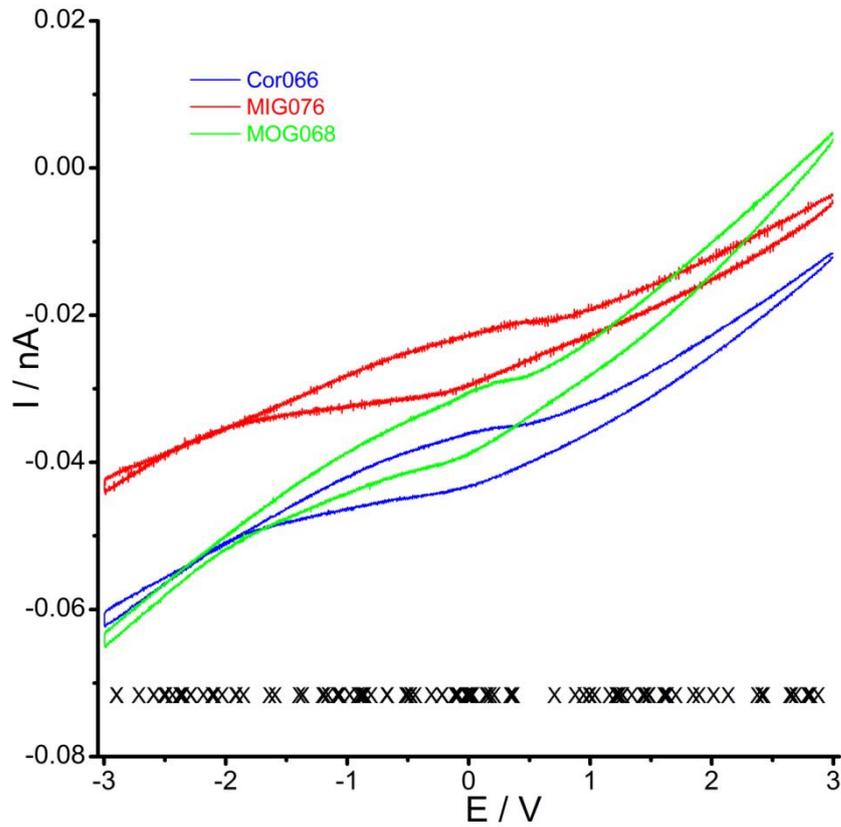


Fig. 36 Individuazione grafica delle variabili utilizzate, le x marcano i potenziali selezionati.

## 4.2 CLASSIFICAZIONI CON V-PARVUS

Queste classificazioni sono state eseguite sui dati derivati usando solo le 136 variabili ottenute utilizzando tutta la voltammetria ciclica.

Le categorie nei metodi Parvus [30, 31, 32] sono così codificate:

Tabella 9: risultati di codificazione a due variabili latenti

<b>Nome categoria</b>	<b>Codice in V-Parvus</b>	<b>Numero di campioni della categoria</b>
Coroncina	1	11
Mignola	2	17
Mogliano	3	12

Tutte le elaborazioni sono fatte su dati autoscalati con cross-validation con Number of cancellation groups for Cross Validation: 3

Basandoci sui risultati precedenti, è stato utilizzato il package Parvus per costruire le matrici di confusione in funzione del numero di variabili latenti da utilizzare.

La tabella 9 riporta i risultati ottenuti utilizzando solo due variabili latenti sia in classificazione (a) sia in predizione (b). Le successive tabelle sono simili utilizzando 4 e 5 VL rispettivamente. Come è prevedibile la bontà della classificazione aumenta e raggiunge il 100% con l'aumentare del numero delle VL usate.

Al contrario, non si osserva lo stesso trend crescente di successo nella predizione che vale 52% (2VL), potere percentuale predittivo medio, 42% (4VL) e 40% (5VL). Questo dimostra che il nostro sistema totale "misura + elaborazione" riesce a classificare le varietà di olio monocoltivar in maniera pressoché perfetta mentre è inaffidabile in predizione.

In particolare, si può evidenziare una capacità predittiva soddisfacente solo per la varietà Mignola.

### 4.3 PLS-DA

Nella sequenza qui sotto si evidenzia che la miglior predizione si ha con 2 variabili latenti mentre con 5 variabili latenti si ha una ottima classificazione ma scarsissima predizione.

**Tabelle 10 a) e 10 b): Matrice di confusione in classificazione a) ed in predizione b) utilizzando 2 variabili latenti.**

With 2 latent variables:

**a) CLASSIFICATION matrix**

	Assigned to class		
True Class	1	2	3
1	6	4	1
2	1	16	0
3	0	1	11
% correct classifications (order of category)	54.55	94.12	91.67

Total corrected classifications: 82.50

**b) PREDICTION matrix**

	Assigned to class		
True Class	1	2	3
1	4	4	3
2	3	14	0
3	7	2	3
% correct predictions (order of category)	36.36	82.35	25.00

Total corrected predictions: 52.50

**Tabelle 11 a) e 11 b): Matrice di confusione in classificazione a) ed in predizione b) utilizzando 4 variabili latenti.**

With 4 latent variables:

**a) CLASSIFICATION matrix**

	Assigned to class		
True Class	1	2	3
1	10	1	0
2	0	17	0
3	0	0	12
% correct classifications (order of category)	90.91	100.00	100.00

Total corrected classifications: 97.50

**b) PREDICTION matrix**

	Assigned to class		
True Class	1	2	3
1	4	3	4
2	6	11	0
3	7	3	2
% correct predictions (order of category)	36.36	64.71	16.67

Total corrected predictions: 42.50

**Tabelle 12 a) e 12 b): Matrice di confusione in classificazione a) ed in predizione b) utilizzando 5 variabili latenti.**

With 5 latent variables:

**a) CLASSIFICATION matrix**

	Assigned to class		
True Class	1	2	3
1	11	0	0
2	0	17	0
3	0	0	12
% correct classifications (order of category)	100.00	100.00	100.00

Total corrected classifications: 100.00

**b) PREDICTION matrix**

	Assigned to class		
True Class	1	2	3
1	3	4	4
2	6	11	0
3	8	2	2
% correct predictions (order of category)	27.27	64.71	16.67

Total corrected predictions: 40.00

## 5 CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi è stato proposto un nuovo metodo per eseguire misure voltammetriche con un microelettrodo di platino direttamente in campioni di olio extravergine di oliva.

Agli oli sono stati aggiunti liquidi ionici a temperatura ambiente, RTILs (i quali risultano essere anche importanti solventi green), in modo da rendere le matrici di origine vegetale adeguatamente conducibili.

I voltammogrammi, registrati utilizzando miscele olio/RTIL, sono stati elaborati attraverso tecniche chemiometriche per estrarre informazioni sulle caratteristiche dei campioni, per valutare la capacità del sistema di discriminazione e di predizione. Le curve voltammetriche sono state quindi pre-elaborate e utilizzate come fonte di dati per le analisi statistiche.

Dalla proiezione dei campioni sulle prime due variabili latenti (componenti principali) di PLS, si evidenzia un'apprezzabile separazione delle varie tipologie di olio e concentrazione delle tre varietà. In particolare si osserva una buona omogeneità per la qualità Mignola mentre per le qualità Mogliano e Coroncina abbiamo una maggiore dispersione che è stata imputata, in prima approssimazione alla contiguità geografica delle due cultivar.

Le tecniche elettrochimiche sono state utilizzate anche nella seconda parte di questo lavoro di tesi, per studiare la componente antiossidante dei diversi campioni di olio extravergine di oliva. I composti fenolici possiedono un importante "comportamento" elettrochimico e questa attività redox può essere utilizzata per caratterizzare il contenuto fenolico di un campione attraverso metodi elettrochimici. In questo lavoro è stato quindi misurato il potenziale a circuito aperto OCV (Open Circuit Potential) i quali ci forniscono una misura indiretta del potere ossidante o riducente della soluzione e ci permette quindi di correlare il potenziale con la componente fenolica presente negli oli e caratterizzare il relativo potere antiossidante.

## 6 BIBLIOGRAFIA

- [1] Caramia G.26 (2004) Med.Surg. Ped 433-447
- [2] Olivo e olio, supplemento n.6 giugno 2010 anno XIII
- [3] Frank D. Gustone, “Vegetables oils in food technology: composition, proprieties and uses” Blackwell Publishing 2002 ISBN 1-84127-331-7
- [4] Bianco, Serilli, Melchioni, AEKIVOC 2007 (vii) ISSN 1424-637
- [5] H. Chomi, J. Cillard, P. Cillard, M. Rahmani, Rev. Fr. Corps Gras 68 (1991) 307
- [6] H. Chomi, A. Sadik, B. Le Tutour, M. Rahmani Rev. Fr. Corps Gras 35 (1988) 339
- [7] G. Papadopoulos, D. Boskou, J.Am Oil Chem. Soc 68 (1991) 669
- [8] M. Baldioli, M. Servili, G. Perretti, G.F. Montedoro, J.Am Oil Chem. Soc . 73 (1996) 1589
- [9] R. Gutierrez Gonzales-Quijano, C. Janer del Valle, M.L. Janer del Valle, F.Gitirrez Rosales, A. Vasquez Roncero, Grasas y Aceites 28 (1977) 101
- [10] M.Zeiner, I.Steffan, I.Juranovic Cindric, Microchemical Journal 81 (2005) 171-176
- [11]C.Benincasa, J.Lewis, E. Perri, G.Sindona, A.Tagarelli Analytica Chimica Acta 585 (2007) 366-370
- [12]Marzia Migliorini, Bruno Zanoni, Andrea Berti, Chiara Cherubini, Enrico Cini, Marco Daou, Marco Mucelli, “protocolli innovativi per la produzione di olio extravergine di oliva nella realtà aziendale toscana. Risultati dell’attività sperimentale 2005-2007”, Camera di commercio di Firenze, stampato da 365 s.r.l. di Tavernelle Val di Pesa (FI) 2008
- [13] [Dall’Olivo all’Olio: “Classificazione, Chimica e Frodi dell’Olio” Capitolo VI].
- [14] Siti del progetto “oli monovarietalitaliani”  
<http://www.olimonovarietalitaliani.it/database>
- [15] [www.ansa.it](http://www.ansa.it)
- [16]PANNELLI G., ALFEI B., SANTINELLI A., 2001. “Varietà di olivo nelle Marche”, ASSAM. Nuova edizione
- [17]Bollettino Ufficiale della Regione Marche. Anno XXXIII, n.° 63, 20 maggio 2002]

- [18] Savitsky, A. Golay M. J. E., "Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures." *Anal. Chem.*, 36 (1964) 1627-1639, DOI: 10.1021 /ac60214a047
- [19] Steiner, J. Termonia, Y. Deltour, Jules "Smoothing and differentiation of data by simplified least square procedure" *Anal. Chem.* 44(1972) 1906-1909, DOI: 10.1021 /ac60319a045
- [20] Vivó-Truyols, G. Schoenmakers, Peter J., "Automatic Selection of Optimal Savitzky-Golay Smoothing" *Anal. Chem.*, 78 (2006) 4598-4608 , DOI: 10.1021/ac0600196
- [21] R. Bro, K. Kjeldahl, A. K. Smilde, H. A. L. Kiers, "Cross-validation of component models: A critical look at current methods" *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 1241– 1251
- [22] D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, S. N. Deming, Y. Michotte, L. Kaufman, "Chemometrics a textbook" Elsevier 1988 ISBN: 0 444 42660 4
- [23] Harald Martens, Tormod Naes, "Multivariate Calibration" John Wiley&Sons 1989 ISBN: 0 471 93047 4
- [24] Richard G. Brereton, "Chemometrics data analysis for the laboratory and chemical plant" John Wiley&Sons 2003 ISBN: 0 471 48978 6
- [25] Hai-Ni Qu, Guo-Zheng Li, Wei-Sheng Xu, "An asymmetric classifier based on partial least squares" *Pattern Recognition* 43 (2010) 3448-3457
- [26] M. Barker and W. Rayens, "Partial least squares for discrimination" *Journal of Chemometrics* 17 (2003) 166–173
- [27] Paolo Oliveri, Antonetta Baldo, Salvatore Daniele, Michele Forina, "Development of a voltammetric electronic tongue for discrimination of edible oils", 2009
- [28] Gary A. Mabbott, "an introduction to Cyclic Voltammetry" (1983)
- [29] Electrochemical behavior of polyphenol rich fruit juice using disposable screen-printed carbon electrodes: towards a rapid sensor for antioxidant capacity and individual antioxidants.
- [30] The Unscrambler 9.8, Camo Software AS, 1986-2008. [www.camo.com](http://www.camo.com)
- [31] Forina, M., Lanteri, S., Armanino, C., Casolino, C., & Casale, M. 2007. V-PARVUS: "An extendable package of programs for explorative data analysis, classification and regression analysis" *Dip. Chimica e Tecnologie Farmaceutiche ed Alimentari*, University of Genova. Freely available at <http://www.parvus.unige.it>

- [32] Paolo Conti, Mario Berrettoni, Fabio Buzzechesse, Mirko Maragoni, Fabio Paparoni, Demetrio Ruffini, Mauro Tiberi, Paolo Trobbiani, Silvia Zamponi, “Investigation on the possibility of characterizing three monovarietal extravirgin olive oil from Marche by spectroscopic and chemometric method”