



#### 4. Stato di avanzamento della ricerca e principali risultati

Allo scopo di fornire una descrizione più chiara delle attività svolte e dei risultati raggiunti fino ad ora, le tre linee di ricerca verranno trattate separatamente.

##### *A2 – Revisione del metodo analitico per la determinazione del contenuto di etil esteri degli acidi grassi (EEAG) in oli d'oliva vergini*

La prima fase di questa linea di ricerca ha riguardato l'applicazione del metodo ufficiale per la determinazione degli EEAG, definito dal Reg. UE 61/2011, su 10 campioni di olio d'oliva vergine al fine di individuare le principali criticità del metodo, riconducibili soprattutto alla complessità del protocollo analitico, ai lunghi tempi di analisi ed al cospicuo uso di solventi. Il protocollo analitico prevede, infatti, la separazione della frazione di interesse mediante cromatografia liquida in fase normale, realizzata in colonne in vetro impaccate manualmente, con eluizione isocratica di una miscela di solventi poco polari, ed impiego di un indicatore di colore (Sudan I) con un tempo di eluizione intermedio tra la frazione di interesse contenente gli EEAG e quella dei trigliceridi. Infine, la frazione raccolta, dopo essere stata portata a secco e ripresa in un solvente adeguato, viene sottoposta a separazione gascromatografica. Sulla base di questo, è stata quindi valutata la possibilità di realizzare la fase analitica preparativa mediante HPLC, raccogliendo manualmente la frazione contenente gli EEAG in uscita dalla colonna. Cercando di seguire lo stesso principio del metodo ufficiale, sono state impiegate le seguenti condizioni operative:

- colonna con fase stazionaria in silice (lunghezza 25 cm; diametro interno 4,6 mm; dimensione particelle 5  $\mu\text{m}$ );
- fase mobile costituita da una miscela di *n*-esano/MTBE 95/5, in isocratica, con flusso di 0,5 mL/min;
- rivelatore UV, impostato ad una lunghezza d'onda di 460 nm, che consente di rivelare il passaggio del Sudan aggiunto al campione e, quindi, individuare il momento in cui sospendere la raccolta della frazione eluita dalla colonna.

Attualmente, sono in corso numerose prove per definire il volume di iniezione, la quantità di olio da analizzare, di standard interno ed indicatore da aggiungere e la durata della corsa cromatografica, ovvero fattori che in questo tipo di approccio possono costituire delle criticità. Gli EEAG sono, infatti, composti minoritari degli oli di oliva vergini (il limite legale per la categoria "olio extra vergine d'oliva" è di 35 mg/kg di olio) e risulta fondamentale individuare un volume di iniezione ed una quantità di campione da analizzare che consentano di raccogliere un quantitativo sufficiente di EEAG tale da poter essere sottoposto alla successiva analisi gascromatografica. Per questo motivo, il volume di iniezione è stato incrementato da 10 a 50  $\mu\text{L}$ , e sono in corso le analisi per definire se 50 mg di olio, disciolti in 0,75 mL di soluzione contenente lo standard interno (metileptadecanoato 0,02 % in eptano) e 0,75 mL di Sudan (0,00025 % in *n*-esano), siano sufficienti per ottenere una frazione adatta all'analisi gascromatografica. La durata della corsa cromatografica, invece, è stata definita partendo dal tempo di ritenzione del Sudan che, applicando le condizioni sopra descritte, è di circa 20 minuti (Figura 1).

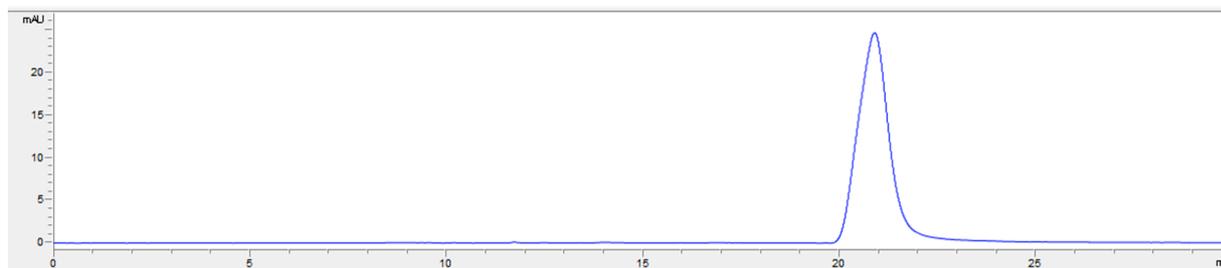


Figura 1. Cromatogramma relativo al Sudan (0,00025 % in *n*-esano) utilizzato come indicatore.

Per questo è stato impostato un tempo di analisi di 30 minuti, in modo da consentire la completa eluizione della frazione dei trigliceridi. Tuttavia, al fine di verificare che effettivamente la frazione che eluisce prima del Sudan contenga solo etil esteri e cere e che i trigliceridi siano presenti solo in quella successiva all'indicatore, è stata realizzata una TLC su cui sono state caricate due soluzioni di standard (trioleina come spot di riferimento per i trigliceridi e metileptadecanoato per gli etil esteri) e due ottenute dalla raccolta di frazioni dall'HPLC dal tempo 0 fino all'eluizione del Sudan (circa 20 minuti) e dal tempo 0 fino alla fine della corsa cromatografica. La miscela eluente utilizzata era la stessa impiegata in HPLC ed i risultati ottenuti hanno confermato la necessità di impostare un tempo di analisi di 30 minuti per garantire anche l'eluizione dei trigliceridi. Dopo aver definito questi parametri, tale approccio verrà applicato su un ampio set di campioni per valutare l'effettiva possibilità di revisione delle procedure attualmente previste dal metodo ufficiale.

##### *A3 - Studio dell'efficacia di un FGC-E-Nose per la discriminazione di campioni di olio d'oliva vergine sulla base dell'origine geografica*

Per quanto concerne le attività relative alla determinazione dei composti volatili mediante FGC-E-Nose, sulla base di quanto presente in letteratura e di alcune prove preliminari, sono state definite le condizioni cromatografiche di analisi. Lo strumento è dotato di due colonne cromatografiche di diversa polarità (MXT-5 e MXT-1701) che lavoravano in parallelo e ciascuna è collegata ad un rivelatore di tipo FID. Questo permette di ottenere, al termine di ogni analisi, due distinti cromatogrammi per ogni campione. Per quanto riguarda la preparazione del campione, all'interno di vial da 20 mL vengono pesati esattamente circa 2 g di olio ed il condizionamento del campione viene realizzato mantenendo le

vial in agitazione per 20 minuti a 40°C. Al termine della fase di agitazione, una siringa preleva un'aliquota da 5 mL dello spazio di testa della vial. Prima della separazione cromatografica, viene realizzata la concentrazione degli analiti mediante l'assorbimento dello spazio di testa su una trappola Tenax TA mantenuta a 40°C per 65 sec. Il successivo desorbimento avviene aumentando la temperatura della trappola fino a 240°C in 93 sec. Successivamente, il campione è iniettato in colonna alla temperatura di 200°C ed analizzato in programmata: temperatura iniziale di 40°C mantenuta per 2 sec, incremento di 3°C al secondo fino a 270°C mantenuti per 21 sec.

Fino ad ora, un set costituito da 84 campioni di oli di oliva vergini di diversa origine geografica (57 provenienti da stati membri dell'UE e 27 reperiti da stati extra-UE) è stato analizzato ed è in corso l'analisi multivariata dei dati con lo scopo di costruire un modello per la discriminazione dei campioni sulla base della loro origine geografica.

#### A4 - Validazione di metodi elettrochimici per il controllo della qualità degli oli d'oliva vergini

L'obiettivo di questa linea di ricerca è quello di testare ed ottimizzare un metodo rapido ed innovativo basato sulla misurazione dell'impedenza elettrica per la determinazione dell'acidità libera in campioni di olio d'oliva vergine mediante il confronto dei risultati ottenuti con quelli misurati applicando il metodo ufficiale stabilito dai regolamenti comunitari (Reg. CEE n. 2568/91 e successive modifiche). Tale metodo innovativo offre vantaggi quali la facilità d'uso, il basso costo, la possibilità di effettuare le analisi direttamente in frantoio e la rapidità (2-3 minuti per analisi).

Fino ad ora, tale approccio è stato testato su un set costituito da 99 campioni di olio d'oliva vergine che sono stati contemporaneamente analizzati anche mediante il metodo ufficiale. Poiché l'acidità libera costituisce una dei parametri validi per la classificazione merceologica del prodotto, sulla base dei valori ottenuti, è stato possibile classificare i campioni in oli d'oliva extra vergini, vergini o lampanti. Tuttavia, per 14 campioni è stato riscontrato un disaccordo riguardo alla categoria merceologica definita dai due differenti approcci. In tutti i casi, con l'eccezione di un solo campione, tale disaccordo è stato dovuto ad una sovrastima dell'acidità libera misurata mediante il metodo rapido. Successivamente è stata realizzata una correlazione dei dati ottenuti per tutti i campioni ma il valore di  $R^2$  ottenuto è risultato non soddisfacente a causa della presenza di 3 campioni outliers per cui il metodo rapido ha sovrastimato l'acidità libera valutata con la titolazione con una differenza maggiore di 1. Questi campioni sono stati, quindi, rimossi dall'elaborazione (Figura 2) ed è stato ottenuto un valore di  $R^2$  di circa 0,96.

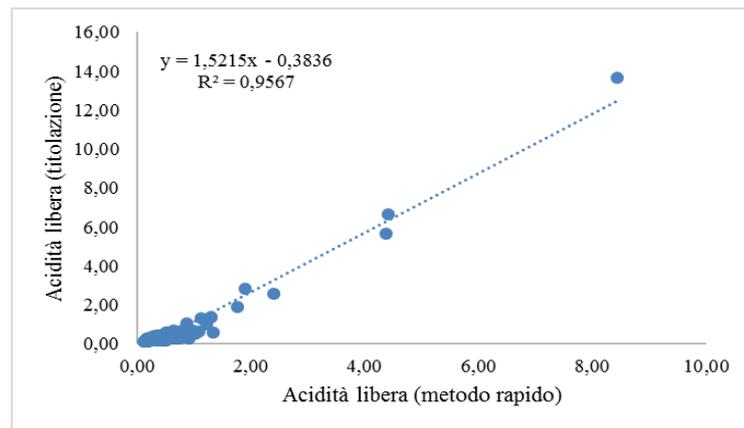


Figura 2. Correlazione di tutti i dati ottenuti escludendo i campioni outliers.

Probabilmente una sovrastima così elevata è dovuta alla presenza di una notevole quantità di composti secondari dell'ossidazione che nell'olio d'oliva vergine possono formarsi in conseguenza di un processo di irrancidimento ossidativo e che possono creare interferenza nelle condizioni analitiche impiegate.

Per approfondire questo aspetto, è in corso una sperimentazione su un set di 20 campioni sottoposti a specifiche condizioni di conservazione (esposizione alla luce a 20°C, conservazione al buio a 20, 30 e 35°C) che vengono analizzati mensilmente al fine di valutare l'influenza dei parametri di conservazione su specifici parametri analitici.

## 5. Elenco delle pubblicazioni prodotte nell'ambito dell'attività di dottorato

- El-Gharbi S, Tekaya M, Bendini A, Valli E, Palagano R, Gallina Toschi T, Hammami M, Mechri B (2018) Effects of archaic olive and oil storage methods still used in southern Tunisia on olive oil quality, *Ital. J. Food Sci.* 30: 102-5.
- Palagano R. (2017) Advanced solutions for authenticity and quality of olive oil, 22nd Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science Technology and Biotechnology.
- Valli E., Palagano R., Berardinelli A., Ragni L., Moreda W., Pérez Camino M., Bendini A., Gallina Toschi T. (2017) Time Domain Reflectometry as a promising analytical approach for the determination of fatty acid ethyl esters in extra virgin olive oils, *Atti del Convegno 3rd IMEKO Foods-Metrology Promoting Standardization and Harmonization in Food and Nutrition*, p 239.

