

LUISA MANNINA*, **, SILVIA VISTA*, RICCARDA ANTIOCHIA*,
DONATELLA CAPITANI**, ANATOLY P. SOBOLEV**, FEDERICA CAMIN***

Valorizzazione dell'olivicoltura di qualità tramite un protocollo analitico multidisciplinare: il caso studio della DOP Colline Pontine

INTRODUZIONE

L'olio extra vergine di oliva è uno dei prodotti caratteristici della tradizione e della cultura delle civiltà mediterranee. Si tratta di una matrice complessa le cui caratteristiche peculiari e la qualità dipendono dall'azione e dall'interazione di numerosi fattori quali il fattore tecnologico (gramolatura, tipo di estrazione), il fattore agronomico (tipologia di impianto, pratiche colturali: irrigazione, concimazione), il fattore genetico (cultivar di provenienza), il fattore pedoclimatico (suoli e clima), il fattore ecologico (altimetria, luce, esposizione) e l'annata di produzione.

Per caratterizzare e conoscere una matrice così complessa è necessario utilizzare diverse metodologie analitiche. L'olio di oliva viene usualmente analizzato tramite metodi ufficiali definiti da precise normative comunitarie (Regolamenti CEE 2568/1991, CE 1989/2003, CE 640/2008) che permettono di rilevare la qualità e la genuinità del prodotto. Oltre alle analisi convenzionali, una serie di analisi non disciplinate tra cui l'analisi Isotopica e la Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) si sono dimostrate utili in particolare nello studio della tracciabilità mirato ad analizzare l'origine, la sicurezza e la qualità degli oli di oliva (Camin et al., 2010a; Camin et al., 2010b; Bontempo et al., 2009; Mannina e Sobolev, 2011; D'Imperio et al., 2010; Mannina et al., 2003).

I rapporti tra isotopi stabili di H, C e O ($^2\text{H}/^1\text{H}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) nei vegetali dipendono infatti dalle caratteristiche geografiche (latitudine, altitu-

* Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco, Sapienza Università di Roma

** Istituto di Metodologie Chimiche, CNR, Area della Ricerca di Roma 1

*** Fondazione Edmund Mach - Istituto Agrario San Michele all'Adige (FEM-IASMA), San Michele all'Adige (TN)

dine, distanza dal mare) e climatiche (temperatura, umidità relativa, entità di precipitazioni, irraggiamento) della zona di coltivazione e hanno permesso di discriminare oli extra vergini di oliva DOP nazionali (Camin et al., 2010b), oli della costa tirrenica da quelli dell'adriatica (Bontempo et al. 2009) e oli di diversa origine europea (Camin et al., 2010a).

Anche la Risonanza Magnetica Nucleare si è rivelata uno strumento efficace nella differenziazione e caratterizzazione degli oli di oliva (Mannina e Sobolev, 2011). Da un punto di vista analitico l'NMR presenta il vantaggio di non richiedere alcun trattamento del campione o solo una semplice estrazione. Nel caso dell'olio di oliva l'analisi viene infatti eseguita su una goccia di olio senza alcuna procedura di estrazione o manipolazione che possa alterare il prodotto. Ciò permette di ridurre i tempi di analisi, gli errori e i costi. L'NMR consente inoltre di ottenere, attraverso un unico esperimento, informazioni qualitative e quantitative sulle diverse classi di composti dell'olio (D'Imperio et al., 2007), sia sui composti maggioritari (acidi grassi) ma anche sui composti presenti in minore concentrazione come aldeidi, terpeni e steroli che risultano particolarmente utili per la determinazione dell'origine geografica degli oli di oliva. L'analisi NMR, accoppiata a un'adeguata analisi statistica multivariata, si è dimostrata un valido metodo per la valorizzazione delle Denominazioni di Origine Protetta (DOP) (Mannina et al., 2001). La composizione dell'olio è infatti peculiare dell'ambiente pedoclimatico in cui l'ulivo cresce.

In questo contesto si inserisce lo studio svolto che si pone come obiettivo la promozione e la diffusione di un'olivicoltura di alta qualità nella zona DOP "Colline Pontine" in provincia di Latina. Il lavoro si inquadra all'interno del progetto "Olivicoltura di qualità e territorio", sviluppato nell'ambito del programma "Conoscenze Integrate per la Sostenibilità e Innovazione del Made in Italy Agroalimentare" (CISIA). La filosofia del programma è di creare un legame fra la ricerca e il mondo produttivo per garantire il successo delle iniziative imprenditoriali e una forte ricaduta di innovazione sul tessuto sociale locale. In particolare il progetto che riguarda nello specifico la DOP "Colline Pontine" ha per missione di promuovere la produzione di olio di oliva di qualità.

Negli ultimi anni l'emergere di produttori che hanno apportato innovazioni al processo di produzione tradizionale ha permesso all'olio di oliva della zona DOP "Colline Pontine" di raggiungere punte di eccellenza rese evidenti dai premi prestigiosi ottenuti e dalla risposta dei consumatori.

La tipica varietà di ulivo della zona DOP "Colline Pontine" è la cultivar Itrana, che viene utilizzata sia per la produzione di olio di oliva sia per la produzione di olive da mensa (Olive di Gaeta).

In questo lavoro sono stati analizzati oli di oliva della varietà “*Itrana*” mediante un protocollo analitico multidisciplinare che prevede l'uso dell'analisi sensoriale richiesta dal regolamento CE 640/2008, della spettrometria di Massa Isotopica e della spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare protonica.

ANALISI SENSORIALE (PANEL TEST)

L'esame organolettico è stato effettuato presso la sala di degustazione della Camera di Commercio di Latina da un Panel, riconosciuto dal Consiglio Oleicolo Internazionale (COI), composto da nove assaggiatori coordinati da un capo panel. La valutazione dei campioni è stata effettuata secondo il metodo ufficiale descritto nel regolamento CE 640/2008. A ogni assaggiatore è stato chiesto di stimare la presenza e l'intensità di attributi positivi e negativi dell'olio. L'olio è stato quindi classificato nelle varie categorie (extra vergine, vergine e lampante) in funzione della mediana dei difetti e della mediana dell'attributo fruttato.

L'analisi sensoriale ha individuato principalmente oli extra vergini, pochi oli vergini e nessun lampante.

SPETTROMETRIA DI MASSA ISOTOPICA

L'analisi dei rapporti tra isotopi stabili di H ($^2\text{H}/^1\text{H}$), C ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e O ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) è stata eseguita sui campioni di olio tal quale seguendo il protocollo tecnico per le analisi di spettrometria di massa, come riportato in precedenti lavori (Camin et al., 2010b).

Il rapporto $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ è stato misurato tramite uno Spettrometro di Massa Isotopica (DELTA V, Thermo Scientific, Germany) in seguito alla combustione completa in un analizzatore elementare (EA Flash 1112, Thermo Scientific).

I rapporti $^2\text{H}/^1\text{H}$ e $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ sono stati misurati utilizzando uno Spettrometro di Massa Isotopica (Finnigan DELTA XP, Thermo Scientific) accoppiato a un pirolizzatore (Finnigan TC/EA, Thermo Scientific).

L'analisi isotopica può essere particolarmente utile per determinare l'autenticità degli alimenti. I dati isotopici dell'olio di oliva dipendono infatti da vari fattori tra cui la cultivar, il clima e l'origine geografica. I campioni analizzati non hanno mostrato una larga variabilità dei dati isotopici e quindi si può affermare che la DOP “Colline Pontine” è caratterizzata da valori caratteristici delle variabili isotopiche.

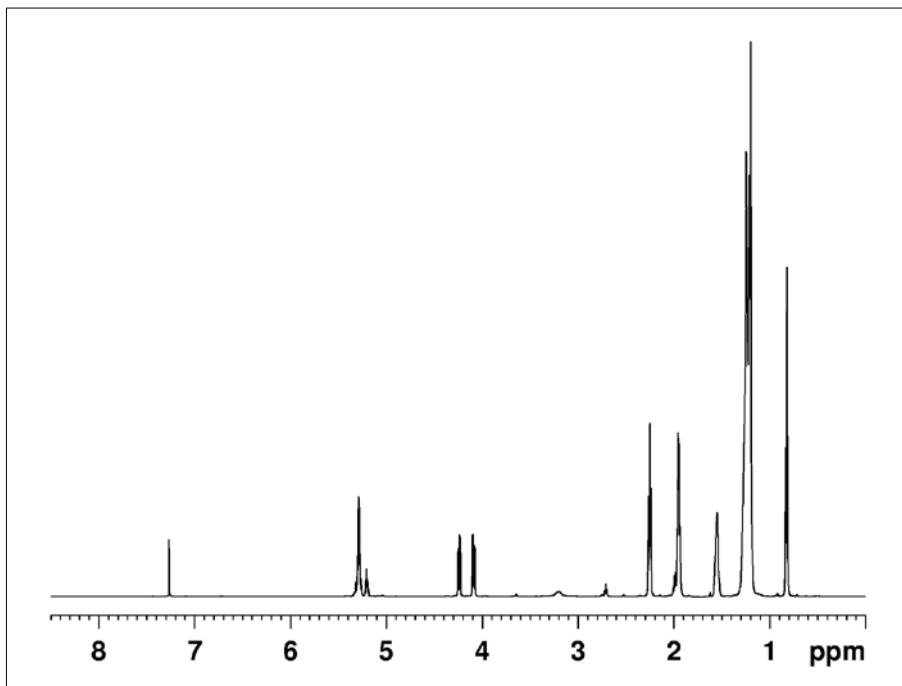


Fig. 1 *Spettro ^1H NMR di un olio di oliva*

SPETTROSCOPIA DI RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE PROTONICA (^1H NMR)

Per l'analisi ^1H NMR, 20 μL del campione di olio di oliva sono stati inseriti direttamente in un tubo NMR da 5 mm e sciolti in un solvente misto (700 μL di CDCl_3 e 20 μL di $\text{DMSO}-d_6$). Gli spettri ^1H NMR sono stati acquisiti a 27 $^\circ\text{C}$ su uno spettrometro Bruker AVANCE 600 NMR che opera alla frequenza di risonanza protonica di 600.13 MHz ($B_0 = 14.1$ T) ed equipaggiato con una sonda Bruker multinucleare da 5 mm capace di produrre gradienti lungo l'asse Z. Gli spettri sono stati acquisiti e processati secondo le condizioni sperimentali riportate in precedenti lavori (Mannina et al., 2010).

In tutti gli spettri dei campioni analizzati sono presenti i segnali caratteristici di un olio di oliva (fig. 1) e non si rilevano segnali che possano far ritenere i campioni adulterati.

I valori delle variabili NMR hanno inoltre dimostrato che gli oli di oliva della zona DOP "Colline Pontine" presentano una simile composizione chimica.

L'analisi della zona spettrale dove sono presenti i segnali dei protoni dei digliceridi ha permesso una valutazione indiretta dell'acidità degli oli di oliva. I digliceridi sono prodotti intermedi della biosintesi dei trigliceridi

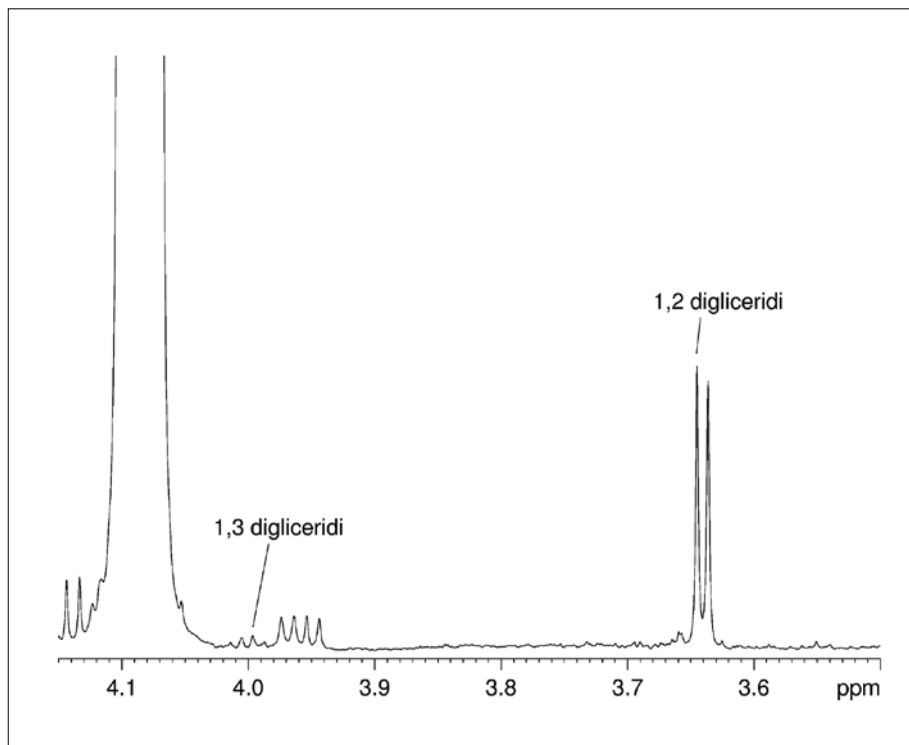


Fig. 2 Zona centrale dello spettro ^1H NMR dove ricadono i segnali dei protoni dei digliceridi

oppure possono derivare dal processo di idrolisi dei trigliceridi. L'estrazione e la conservazione dell'olio di oliva possono produrre ulteriori cambiamenti nella composizione dei digliceridi, a causa dell'isomerizzazione degli *sn*-1,2 digliceridi in *sn*-1,3 digliceridi (Belitz et al., 2009). Durante lo stoccaggio degli oli di oliva, la quantità di *sn*-1,2 digliceridi diminuisce, mentre aumentano gli *sn*-1,3 digliceridi. Di conseguenza, oli di oliva giovani e di buona qualità, contengono principalmente *sn*-1,2 digliceridi e soltanto una piccola quantità di *sn*-1,3 digliceridi. Pertanto il rapporto *sn*-1,2 / *sn*-1,3 digliceridi può essere utilizzato per valutare la freschezza e la qualità degli oli di oliva. Negli oli di oliva con un'acidità libera inferiore o uguale allo 0.8%, il rapporto *sn*-1,2 / *sn*-1,3 digliceridi è superiore a 4, mentre un rapporto *sn*-1,2 / *sn*-1,3 digliceridi inferiore a 4 indica una bassa qualità degli oli di oliva (Mannina et al., 2012).

È possibile determinare il rapporto *sn*-1,2 / *sn*-1,3 digliceridi paragonando l'intensità delle risonanze a 3.636 ppm dovuta al CH_2 del 1,2 digliceride con quella del CH a 3.988 ppm del 1,3 digliceride (fig. 2).

Nei campioni in esame il rapporto tra i segnali degli $sn-1,2$ e $sn-1,3$ digliceridi risulta relativamente alto a conferma della buona qualità, delle giovani età e del buono stato di conservazione.

CONCLUSIONI

Il protocollo adottato ha permesso quindi di caratterizzare gli oli della cultivar “*Itrana*” permettendo così di valorizzare oli monovarietalici con particolari caratteristiche salutistiche. In particolare con questo lavoro sono state messe in evidenza le ottime potenzialità che il territorio interessato presenta in termini di qualità e tipicizzazione.

La tecnica NMR e l’analisi Isotopica unite al Panel Test, indispensabile tecnica convenzionale, possono essere quindi di grande aiuto nella determinazione della qualità e della genuinità degli oli di oliva e contribuire alla valorizzazione di uno dei più importanti prodotti italiani.

RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro si inquadra all’interno del progetto “Olivicoltura di qualità e territorio”, sviluppato nell’ambito del programma “Conoscenze Integrate per la Sostenibilità e Innovazione del Made in Italy Agroalimentare” (CISIA) finanziato dal Ministero dell’Economia e delle Finanze.

Questo lavoro è stato effettuato anche grazie alla strumentazione messa a disposizione dall’Unità di Metabolomica: Studi su Alimenti, Nutraceutici e Fluidi biologici.

RIASSUNTO

L’olio extra vergine di oliva è un componente fondamentale della dieta mediterranea. Sono state stabilite diverse normative internazionali per definire la genuinità e la qualità dell’olio di oliva. I metodi ufficiali CEE sono utili per tutelare gli oli di oliva DOP (Denominazione di Origine Protetta). In questo ambito, negli ultimi anni si stanno sviluppando tecniche spettroscopiche come potenziali strumenti nell’analisi dell’olio di oliva. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di promuovere la diffusione di un’olivicoltura di alta qualità nella zona DOP “Colline Pontine”. Sono stati analizzati oli di oliva provenienti da diverse zone della provincia di Latina (Lazio) mediante un protocollo analitico multidisciplinare che prevede l’uso del Panel Test (analisi convenzionale), della spettrometria di Massa Isotopica e della spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare

protonica. I risultati hanno evidenziato l'alta qualità degli oli di oliva della zona DOP "Colline Pontine".

ABSTRACT

Extra virgin olive oil is a fundamental component of the Mediterranean diet. Different international regulations have been established to define olive oil genuineness and quality. The official EEC analytical methods are useful as a means to protect PDO (Protected Designation of Origin) olive oils. In this context, spectroscopic techniques have emerged as potential tools in the analysis of olive oils. The aim of this work was to promote the diffusion of high quality olive growing in the "Colline Pontine" PDO area. Olive oils coming from different areas of the district of Latina (Lazio) were analyzed by means of a multidisciplinary analytical protocol including Panel Test (conventional analysis), Isotope Ratio Mass Spectrometry and proton Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy. The results have suggested high quality of olive oils of the "Colline Pontine" PDO area.

BIBLIOGRAFIA

- BELITZ H.D., GROSCH W., SCHIEBERLE P. (2009): *Food Chemistry*, Springer, Berlin, p. 645.
- BONTEMPO L., CAMIN F., LARCHER R., NICOLINI G., PERINI M., ROSSMANN A. (2009): *Discrimination of Tyrrhenian and Adriatic Italian olive oils using H, O, and C stable isotope ratios*, «Rapid communications in mass spectrometry», 23, pp. 1043-1048.
- CAMIN F., LARCHER R., NICOLINI G., BONTEMPO L., BERTOLDI D., PERINI M., SCHLICHT C., SCHELLENBERG A., THOMAS F., HEINRICH K., VOERKELIUS S., HORACEK M., UEKERMANN E., FROESCHL H., WIMMER B., HEISS G., BAXTER M., ROSSMANN A., HOOGEWERFF J. (2010a): *Isotopic and elemental data for tracing the origin of European olive oils*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 58, pp. 570-577.
- CAMIN F., LARCHER R., PERINI M., BONTEMPO L., BERTOLDI D., GAGLIANO G., NICOLINI G., VERSINI G. (2010b): *Characterisation of authentic Italian extra-virgin olive oils by stable isotope ratios of C, O and H and mineral composition*, «Food chemistry», 118, pp. 901-909.
- D'IMPERIO M., GOBBINO M., PICANZA A., COSTANZO S., DELLA CORTE A., MANNINA L. (2010): *Influence of harvest method and period on olive oil composition: an NMR and statistical study*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 58, pp. 11043-11051.
- D'IMPERIO M., MANNINA L., CAPITANI D., BIDET O., ROSSI E., BUCARELLI F.M., QUAGLIA G.B., SEGRE A.L. (2007): *NMR and statistical study of olive oils from Lazio: A geographical, ecological and agronomic characterization*, «Food chemistry», 105, pp. 1256-1267.
- MANNINA L., D'IMPERIO M., GOBBINO M., D'AMICO I., CASINI A., SOBOLEV A.P. (2012): *Nuclear magnetic resonance study of flavoured olive oils*, «Flavour and Fragrance Journal», 27, pp. 250-259.
- MANNINA L., MARINI F., GOBBINO M., SOBOLEV A.P., CAPITANI D. (2010): *NMR and chemometrics in tracing European olive oils: The case study of Ligurian samples*, «Talanta», 80, pp. 2141-2148.

- MANNINA L., PATUMI M., PROIETTI N., SEGRE A.L. (2001): *P.D.O. (Protected Designation of Origin) Geographical Characterization of Tuscan Extra Virgin Olive Oils using High-Field ^1H NMR spectroscopy*, «Italian Journal of Food Science», 13, pp. 53-63.
- MANNINA L., SOBOLEV A.P. (2011): *High resolution NMR characterization of olive oils in terms of quality, authenticity, and geographical origin*, «Magnetic Resonance in Chemistry», 49, pp. S3-S11.
- MANNINA L., SOBOLEV A.P., SEGRE A.L. (2003): *Olive oil as seen by NMR and chemometrics*, «Spectroscopy Europe», 15, pp. 6-14.
- REGOLAMENTO CEE 2568/1991: *Regolamento (CEE) N. 2568/91 della Commissione dell'11 Luglio 1991 relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi ad essi attinenti*, «Gazzetta Ufficiale», L 248 del 5.9.1991, p. 1.
- REGOLAMENTO CE 1989/2003: *Regolamento (CE) N. 1989/2003 della Commissione del 6 Novembre 2003 che modifica il regolamento (CEE) N. 2568/91 relativo alle caratteristiche degli oli di oliva e degli oli di sansa di oliva nonché ai metodi di analisi ad essi attinenti*, «Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea», L 295/57.
- REGOLAMENTO CE 640/2008: *Regolamento (CE) N. 640/2008 della Commissione del 4 Luglio 2008 che modifica il regolamento (CEE) N. 2568/91 relativo alle caratteristiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi di analisi ad essi attinenti*, «Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea», L 178/11.