

MAURIZIO SERVILI<sup>1</sup>, SONIA ESPOSTO<sup>1</sup>, BEATRICE SORDINI<sup>1</sup>,  
GIANLUCA VENEZIANI<sup>1</sup>, STEFANIA URBANI<sup>1</sup>, ROBERTO SELVAGGINI<sup>1</sup>,  
ANTONIETTA LOREFICE<sup>1</sup>, LUIGI DAIDONE<sup>1</sup>, DAVIDE NUCCIARELLI<sup>1</sup>,  
AGNESE TATICCHI<sup>1</sup>

## L'acqua di vegetazione dei frantoi oleari: una risorsa da valorizzare

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università degli Studi di Perugia

### PREMESSA

La sfida della sostenibilità è ormai al centro dell'agenda di lavoro di imprese, organizzazioni e istituzioni nazionali e internazionali. Aumentano ogni anno le filiere agroalimentari che concretizzano modelli di economia circolare, impegnandosi in maniera più importante nella valorizzazione dei propri sottoprodotti, che diventano una fonte economica di composti ad alto valore aggiunto e non più una mera questione di impatto ambientale. La valutazione delle caratteristiche qualitative di tali sottoprodotti, ricchi in molecole biologicamente attive, ha orientato la comunità scientifica a considerare delle vie alternative allo smaltimento, individuando soluzioni economicamente valide per un loro recupero (Demarche et al., 2012; De Marco et al., 2007; Servili et al., 2011a). Questi costituenti possono essere: vitamine, minerali, acidi grassi, fibre alimentari oppure antiossidanti o probiotici. Tra questi particolare attenzione è stata rivolta ai composti antiossidanti. Secondo la definizione più ampiamente adottata, appartengono alla categoria degli antiossidanti: tutte le sostanze che presenti in minore concentrazione rispetto al substrato ossidabile e in specifiche condizioni sono in grado di ritardare o prevenire l'ossidazione del substrato stesso (Shahidi, Ambigaipalan, 2015). Da qui, i composti fenolici contenuti in numerose matrici alimentari di origine vegetale acquistano un'importanza strategica, che è da associare alla loro capacità di migliorare la shelf-life degli alimenti e di esplicare *in vivo*, nell'organismo umano, effetti benefici contro le malattie cronico-degenerative indotte dallo stress ossidativo o a base infiammatoria (Shahidi, Ambigaipalan, 2015).

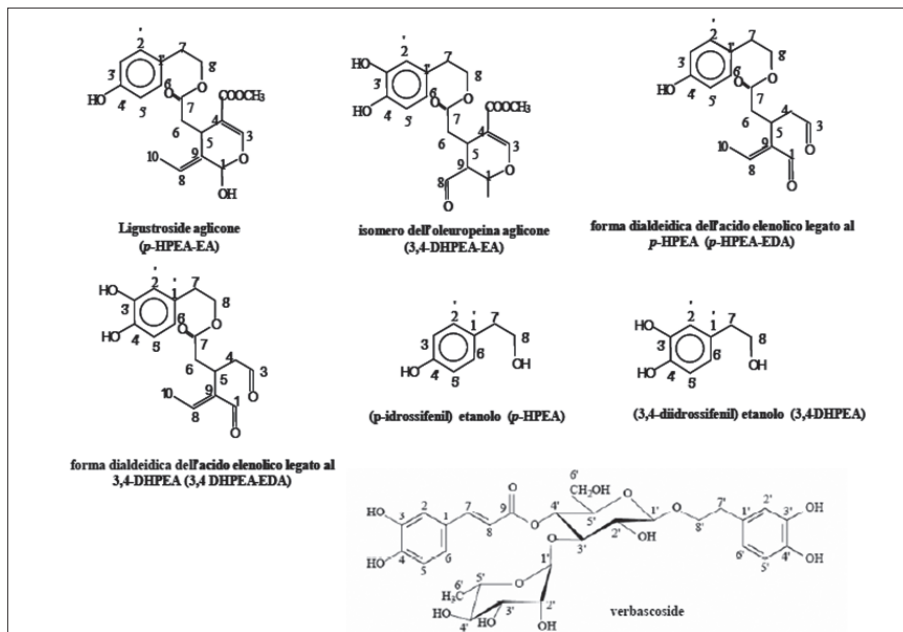


Fig. 1 *Principali composti fenolici nelle acque di vegetazione (AV) (Servili et al., 2009)*

La filiera olivicola-olearia ha un ruolo chiave nella valorizzazione dei co-prodotti dell'estrazione meccanica dell'olio extravergine di oliva, in quanto possono essere considerati una ricca fonte di molecole bioattive da riutilizzare in diversi campi come quello alimentare, farmaceutico, cosmetico e mangimistico (Araújo et al., 2015; Gullón et al., 2020).

Della frazione fenolica dell'olio extravergine di oliva e dei relativi co-prodotti sono ampiamente dimostrate, *in vivo* e *in vitro*, le proprietà antimicrobiche, antiossidanti, antiallergiche, antiinfiammatorie, antivirali e anti-cancerogene (Casaburi et al., 2013; Cicerale et al., 2011; Obied et al., 2012; Servili et al., 2004; 2013). A tale riguardo, le sostanze fenoliche presenti nell'AV appartengono a diverse classi quali: fenil alcoli, acidi fenolici, flavonoidi, lignani, i derivati dei secoiridoidi (il 3,4-DHPEA-EDA o oleaceina, forma dialdeidica dell'acido decarbossimetil elenolico legato al 3,4-DHPEA; p-HPEA-EDA o oleocantale, forma dialdeidica dell'acido decarbossimetil elenolico legato al p-HPEA; 3,4-DHPEA-EA, isomero dell'oleuropeina aglicone; p-HPEA-EA, ligustroside aglicone), oltre che il verbascoside (Servili et al., 2009) (fig. 1). A differenza degli altri composti di natura fenolica, che sono metaboliti secondari ubiquitari nel regno vegetale, i secoiridoidi sono composti esclusivi delle piante della famiglia delle Olearaceae, cui appartiene l'*Olea europaea* L.

(Servili et al., 2009). Allo stato attuale delle conoscenze proprio ai secoridoidi e loro derivati sono state riconosciute le molteplici proprietà biologiche e salutistiche, in quanto in grado di esercitare un'elevata attività antiossidante e svolgere un importante ruolo nel rapporto tra il consumo di olio e la prevenzione di eventi cronico-degenerativi su base infiammatoria ed età-dipendenti, quali malattie cardio-vascolari e tumori (Piroddi et al., 2016; Servili et al., 2013). Nel confermare queste proprietà salutistiche, l'European Food Safety Authority (EFSA) ha concesso un claim salutistico ai polifenoli dell'olio vergine di oliva, in quanto capaci di contribuire alla protezione dei lipidi ematici dallo stress ossidativo, se assunti giornalmente con un dosaggio di almeno 5 mg di idrossitirosolo e suoi derivati, nell'ambito di un consumo moderato di olio vergine di oliva (20g) (EFSA, 2012; Reg UE, 2012), quindi un buon olio vergine di oliva dovrebbe contenere almeno 250 mg/kg di composti fenolici.

Nel corso del processo di estrazione meccanica dell'olio extravergine di oliva l'intero patrimonio fenolico del frutto si ripartisce per una minima parte nella fase oleosa, circa il 2%, mentre la quasi totalità si ritrova nei sottoprodotti (AV e sansa vergine). Il recupero di una grande quantità di composti fenolici da AV sembra una strategia promettente per sfruttare un prodotto che altrimenti rappresenterebbe un costo importante di smaltimento per il settore olivicolo-oleario, rendendolo un co-prodotto piuttosto che un sottoprodotto. È importante, inoltre, considerare che le AV prodotte dal processo di estrazione dell'olio dalle olive oscillano tra 0.2 e 0.5 m<sup>3</sup>/ton di materia prima, a seconda del sistema di estrazione utilizzato, con una produzione mondiale che si attesta tra 10 ai 30 milioni di m<sup>3</sup> all'anno (Nasini et al., 2013). Le AV sono una matrice complessa, in quanto caratterizzate da un elevato carico organico e minerale (principalmente potassio, fosforo, sodio, calcio, ferro, magnesio, composti dell'azoto), una notevole quantità di solidi sospesi (190 g/L), un alto rapporto C/N, un elevato quantitativo di composti fenolici e un pH compreso tra 4,5 e 6 (Demarche et al., 2012). L'elevato carico organico e la sua composizione rendono l'AV un buon substrato per i microrganismi del suolo e dei corsi d'acqua, ma l'elevata presenza di composti fenolici, che può variare dal 0,34 al 1,13%, determina una diminuzione della biodegradabilità. Infatti, il potenziale inquinante di questo sottoprodotto, espresso da BOD5 e COD, è elevato (Niaounakis e Halvadakis, 2004) ed è per questo che la legge n. 319/76 (legge Merli) e successive, concernenti le norme sugli scarichi di qualsiasi provenienza per la tutela delle acque dall'inquinamento, hanno vietato lo scarico delle acque di vegetazione in corsi d'acqua o nelle fognature, se non dopo adeguata depurazione (che non sempre risulta essere in grado di ridurre il tasso inquinante ed è molto costosa) (Proietti et al., 2012).

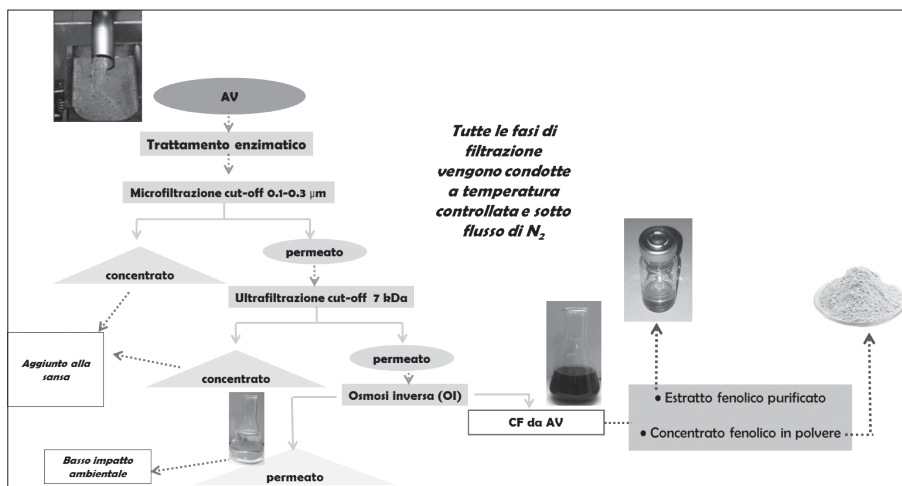


Fig. 2 *Flow-chart di processo di filtrazione su membrana delle AV e produzione di un concentrato fenolico (CF), di un estratto fenolico purificato (EF) e di un concentrato fenolico in polvere (Servili et al, 2011a)*

Da anni il mondo della ricerca sta collaborando con le aziende olearie per valutare i principali metodi studiati per il trattamento delle AV che vanno dall'applicazione diretta sul suolo, al compostaggio, ai trattamenti biologici e chimico-fisici, all'evaporazione naturale o forzata, ecc... (Gullón et al., 2020). Tra i vari metodi ipotizzati per valorizzare questo sottoprodotto c'è il recupero dei composti ad alto valore aggiunto con tecniche che siano ecocompatibili in grado di limitare gli impatti ambientali deleteri e allo stesso tempo di contribuire positivamente sulla redditività dell'industria olearia. Da questo punto di vista sono già state sviluppate molte tecnologie, alcune delle quali coperte da diversi brevetti, che si basano sull'utilizzo di resine adsorbenti, sul processo di evaporazione o attraverso l'applicazione di mezzi di filtrazione su membrana. Questi ultimi sistemi hanno un duplice scopo: ottenere AV disinquinata, e concentrati fenolici ad alto contenuto in molecole bioattive. Tuttavia, ancora oggi, permangono alcuni vincoli alla loro adozione su scala impiantistica, a causa della complessità della matrice che richiede un pretrattamento delle AV, oltre ai grandi costi di installazione dell'impianto. Servili et al. (2011a) hanno messo a punto un sistema di filtrazione su membrana, che non prevede l'utilizzo di solventi, per ottenere un concentrato fenolico (CF) da AV, dopo un pretrattamento con un pool enzimatico depolimerizzante (fig. 2). Tale approccio ecocompatibile è caratterizzato da una elevata efficienza di separazione, facile scale-up e alta produttività. Questo processo ha consentito

una riduzione del volume di AV e una consistente riduzione, oltre il 95%, del carico di inquinamento di natura organica iniziale (COD). Il CF ottenuto ha una concentrazione quattro volte maggiore del contenuto dei polifenoli iniziali di AV, dove il 3,4-DHPEA-EDA e il verbascoside sono presenti in concentrazioni più elevate. Tuttavia, la dotazione in composti fenolici delle AV è fortemente influenzata da numerosi fattori come cultivar, condizioni pedo-climatiche, tecniche agronomiche, periodo di raccolta, conservazione e sistema di estrazione (Servili et al., 2011a).

Per soddisfare differenti applicazioni nel settore alimentare, cosmetico e nutraceutico, dal CF ricco di composti bioattivi, sono state sviluppate formulazioni specifiche progettate su misura. A tale scopo, sono state condotte diverse prove sperimentali volte a raggiungere una maggiore stabilità della gamma di prodotti come uno estratto fenolico (EF) in polvere ottenuto dal CF che prima di essere disidratato mediante la tecnica dello spray dry è stato addizionato di maltodestrine e EF stabilizzati, caratterizzati da un diverso grado di purezza e tipologia di inclusione su matrici stabilizzanti. Questo approccio può rappresentare per il comparto olivicolo-oleario una nuova fonte di reddito che andrebbe a integrare e probabilmente sostenere il sistema integrato di filiera.

#### SVILUPPO DI INGREDIENTI ALIMENTARI FUNZIONALI INNOVATIVI

La sensibilità dei consumatori verso alimenti e ingredienti, ai quali sono attribuite proprietà funzionali, è in forte crescita (Kearney, 2010). Dalle nuove dinamiche alimentari appare evidente come gli alimenti funzionali costituiscano oramai un consolidato segmento di mercato e come l'industria alimentare sia alla continua ricerca di sostanze di origine naturale considerate "specialty" o "value-added ingredients", ingredienti, cioè, dotati di caratteri di funzionalità, tra i quali spicca il comparto degli antiossidanti di origine naturale (Asioli et al., 2017). Tra i componenti bioattivi di cui può servirsi l'industria alimentare, rivestono un ruolo importante i composti fenolici isolati delle AV, che si differenziano per la loro esclusività da tutti gli altri presenti in diversi alimenti di origine vegetale in termini di composizione chimica e attività biologiche associate (Servili et al., 2004; 2013). Pertanto, consumatori non abituali di olive da tavola e/o di oli extravergini di oliva potranno avere a disposizione alimenti di vasto consumo caratterizzati da proprietà salutistiche del tutto simili a quelle dimostrate per i prodotti alimentari provenienti dai suddetti alimenti. Lo sviluppo di prodotti alimentari funzionali arricchiti da

	CV. PERANZANA				CV. OGLIAROLA			
	CONTROLLO		CF		CONTROLLO		CF	
3,4-DHPEA <sup>z</sup>	2.6	(0.1)a	5.2	(0.3)b	1.7	(0.1)a	5.5	(0.3)b
<i>p</i> -HPEA	4.5	(0.2)a	5.1	(0.2)b	9.1	(0.4)a	7.5	(0.4)a
3,4-DHPEA-EDA	69.6	(3.3)a	173	(8.2)b	56.9	(2.7)a	138	(6.6)b
<i>p</i> -HPEA-EDA	48.4	(2.4)a	52.1	(2.6)a	72.3	(3.6)a	80.2	(4.01)a
3,4-DHPEA-EA	148	(7.4)a	152	(7.6)a	183	(12.2)a	213	(15.2)a
(+)-1-Acetossipinoresinolo	17.7	(0.9)a	17.1	(0.9)a	12.5	(0.6)a	15.0	(0.8)b
(+)-Pinoresinolo	19.5	(0.9)a	19.9	(0.9)a	22.1	(1.1)a	25.8	(2.6)a
Fenoli totali	311	(8.6)a	425	(11.6)b	357	(10.3)a	485	(17.3)b
	CV. MORAILOLO				CV. CORATINA			
	CONTROLLO		CF		CONTROLLO		CF	
3,4-DHPEA <sup>z</sup>	6.5	(0.32)a	11.0	(0.6)b	1.9	(0.1)a	2.9	(0.2)b
<i>p</i> -HPEA	10.3	(0.5)a	11.7	(0.9)a	6.3	(0.4)a	5.3	(0.5)a
3,4-DHPEA-EDA	114	(5.4)a	252	(12)b	282	(13.4)a	481	(39.1)b
<i>p</i> -HPEA-EDA	103	(7.2)a	119	(8.9)a	216	(10.8)a	220	(19.9)a
3,4-DHPEA-EA	136	(6.8)a	141	(7.1)a	278	(13.9)a	297	(24.1)a
(+)-1-Acetossipinoresinolo	13.2	(0.9)a	15.4	(1.1)a	13.2	(0.7)a	14.4	(1.2)a
(+)-Pinoresinolo	15.0	(1.1)a	17.4	(1.2)a	18.4	(1.2)a	18.8	(1.3)a
Fenoli totali	393	(11.4)a	567	(16.7)b	816	(22.2)a	1040	(50.1)b

<sup>z</sup> I dati sono la media di tre determinazioni indipendenti tra parentesi la deviazione standard. La significatività dei dati è stata analizzata tramite one way ANOVA ( $p < 0.05$ ). Le lettere minuscole in colonna (a-b) indicano campioni diversi gli uni dagli altri.

Tab. 1 *Composizione fenolica (mg/kg) degli oli extravergini di oliva Controllo e arricchiti con concentrato fenolico (CF) da acque di vegetazione (5%) di cultivar differenti (Peranzana, Ogliarola, Moraiolo e Coratina) (Servili et al., 2011a)*

un EF da AV costituisce l'oggetto di molti lavori (Araújo et al., 2015; Gullón et al., 2020; Servili et al., 2011a; 2011b; Veneziani et al., 2017).

Un importante contributo all'uso potenziale delle AV è stato fornito da Servili et al. (2011a; 2011b) per la preparazione di oli arricchiti e bevande funzionali a base di latte. In particolare, un CF da AV è stato aggiunto in concentrazioni del 5% e del 10% (volume/peso) nella pasta di olive di cultivar differenti (*Peranzana*, *Ogliarola*, *Coratina* e *Moraiolo*) in fase di gramolatura. Gli oli ottenuti dalla sperimentazione erano caratterizzati da una maggiore concentrazione di fenoli, che andava da un minimo del 27% a un massimo del 44% rispetto alle prove di controllo. L'aggiunta di CF da AV al 5% ha portato ad aumenti consistenti del 3,4-DHPEA-EDA in relazione della cultivar, determinando un miglioramento negli oli della stabilità all'ossidazione e delle caratteristiche qualitative salutistiche e sensoriali, date dalla nota pungente e amara associate ai composti fenolici,

	CV. PERANZANA				CV. OGLIAROLA			
	CONTROLLO		CF		CONTROLLO		CF	
Aldeidi								
Esanale <sup>2</sup>	1280	(74.4)a	1250	(68.9)a	2260	(131)a	2020	(111)a
(E)-2-Pentenale	405	(30.5)a	356	(28.6)a	299	(17.3)a	320	(17.6)a
(E)-2-Esenale	89700	(7170)a	75700	(5830)a	99400	(5770)a	89300	(4910)a
Alcoli								
1-Penten-3-olo	686	(39.8)a	684	(37.6)a	263	(18.2)a	317	(23.4)b
1-Pentanolo	23.5	(1.4)a	29.8	(1.6)b	18.0	(1.0)a	16.0	(0.9)a
(E)-2-Penten-1-olo	457	(23.5)a	480	(26.4)a	242	(17.1)a	276	(20.2)a
1-Esanolo	480	(31.8)a	575	(45.6)b	1350	(78.2)a	1060	(58.3)b
(E)-3-Esen-1-olo	10.0	(0.6)a	17.5	(1)b	19.5	(1.3)a	15.5	(1.1)a
(Z)-3-Esen-1-olo	367	(26.3)a	467	(36.7)b	193	(11.2)a	200	(13)a
(Z)-2-Esen-1-olo	867	(51.9)a	1030	(67.2)b	1160	(78.6)a	1330	(100)a
Esteri								
Esil acetato	1880	(147)a	1650	(107)a	25.5	(1.5)a	35.5	(2.0)b
(Z)-3-Esenil acetato	2130	(138)a	2690	(183.8)b	15.0	(0.9)a	27.5	(1.5)b
	CV. MORAILO				CV. CORATINA			
	CONTROLLO		CF		CONTROLLO		CF	
Aldeidi								
Esanale <sup>2</sup>	884	(70.7)a	921	(69.1)a	943	(54.7)a	782	(42.8)b
(E)-2-Pentenale	187	(11.2)a	205	(15.3)a	185	(10.7)a	210	(11.5)a
(E)-2-Esenale	103000	(4110)a	97800	(3420)a	119000	(6930)a	127000	(6990)a
Alcoli								
1-Penten-3-olo	471	(29.2)a	545	(38.1)a	521	(30.2)a	551	(32.3)a
1-Pentanolo	15.5	(1.1)a	23.3	(1.6)a	27.3	(1.6)a	13.3	(0.7)b
(E)-2-Penten-1-olo	340	(20.4)a	406	(30.4)b	377	(21.8)a	392	(21.6)a
1-Esanolo	1230	(73.6)a	1700	(127)b	509	(29.5)a	524	(28.8)a
(E)-3-Esen-1-olo	15.0	(1.4)a	21.0	(1.7)b	15.3	(1.2)a	10.3	(0.8)b
(Z)-3-Esen-1-olo	967	(58.0)a	860	(64.7)a	199	(11.6)a	223	(12.3)a
(Z)-2-Esen-1-olo	1820	(180)a	2140	(161)a	1170	(67.7)a	1040	(57.3)a
Esteri								
Esil acetato	36.5	(2.4)a	32.8	(2.5)a	11.8	(0.7)a	8.5	(0.5)b
(Z)-3-Esenil acetato	181	(11.7)a	176	(13.2)a	28.5	(1.7)a	22.0	(1.9)b

<sup>2</sup> I dati sono la media di tre determinazioni indipendenti tra parentesi la deviazione standard. La significatività dei dati è stata analizzata tramite one way ANOVA (p < 0.05). Le lettere minuscole in colonna (a-b) indicano campioni diversi gli uni dagli altri.

Tab. 2 *Composizione volatile (µg/kg) degli oli extravergini di oliva Controllo e arricchiti con concentrato fenolico (CF) da acque di vegetazione (5%) di cultivar differenti (Peranzana, Ogliarola, Moraiolo e Coratina) (Servili et al., 2011a)*

senza però modificare la composizione in sostanze responsabili delle caratteristiche olfattive (tabb. 1 e 2).

Per sfruttare la funzionalità dell'EF un opportuno veicolo è rappresentato

TEMPO INIZIALE	BLF 100		BLF 200	
3,4-DHPEA <sup>a</sup>	20,5	(1,0)a	26,6	(1,2)b
<i>p</i> -HPEA	0,8	(0,1)a	3,1	(0,2)b
3-4 DHPEA-EDA	53,9	(3,7)a	138,7	(8,4)b
Verbascoside	1,9	(0,1)a	4,1	(0,3)b
Fenoli totali	77,2	(3,9)a	172,5	(3,9)b
Dopo un mese di conservazione				
3,4-DHPEA <sup>a</sup>	30,4	(1,5)a	43,9	(2,3)b
<i>p</i> -HPEA	0,5	(0,03)a	1,8	(0,1)b
3-4 DHPEA-EDA	22,4	(1,3)a	68,2	(4,1)b
Verbascoside	n.d.		n.d.	
Fenoli totali	53,4	(2,0)a	113,9	(4,7)b

<sup>a</sup> I dati sono i valori medi di tre esperimenti indipendenti; la deviazione standard è riportata in tra parentesi. I valori in ogni riga aventi differenti lettere (a-b) sono significativamente diversi tra loro (p < 0,01). n.d.: non determinato.

Tab. 3 *Concentrazione dei composti fenolici (mg/kg) delle bevande a base di latte fermentato fortificate con 100 (BLF100) o 200 (BLF200) mg/L di EF. La conservazione è stata di 30 giorni a 4 °C (Servili et al., 2011b)*

dai prodotti a base di latte fermentato, dato il largo consumo quotidiano. Servili et al. (2011b) hanno proposto bevande funzionali a base di latte, fortificate con composti fenolici estratti da AV a due diverse concentrazioni (100 e 200 mg/L) e fermentati con acido  $\gamma$ -amino butirrico (*Lactobacillus plantarum* C48) e batteri lattici presenti nell'apparato gastrointestinale dell'uomo (*Lactobacillus paracasei* 15N). Gli autori hanno dimostrato che i composti fenolici non hanno interferito né con il processo di fermentazione e né con le attività e la sopravvivenza di batteri lattici funzionali. L'arricchimento non ha modificato la gradevolezza del prodotto in termini di profilo aromatico e di analisi sensoriale. Sebbene durante la shelf-life del prodotto (30 giorni) i composti fenolici siano diminuiti, il loro apporto di composti bioattivi era comunque in grado di garantire sempre il contributo necessario (attraverso il consumo di un vasetto da 125 mL di latte fermentato) per beneficiare degli effetti salutistici, secondo il claim dell'EFSA (EFSA, 2012) (tab. 3).

#### POTENZIALI APPLICAZIONI DI UN ESTRATTO FENOLICO DA AV COME ADDITIVO ALIMENTARE DI ORIGINE NATURALE

L'opportunità di andare incontro alle richieste di un consumatore, sempre più esigente nello scegliere alimenti con “clean label” (cioè con etichetta semplice, facilmente comprensibile e costituita da ingredienti naturali senza l'utilizzo



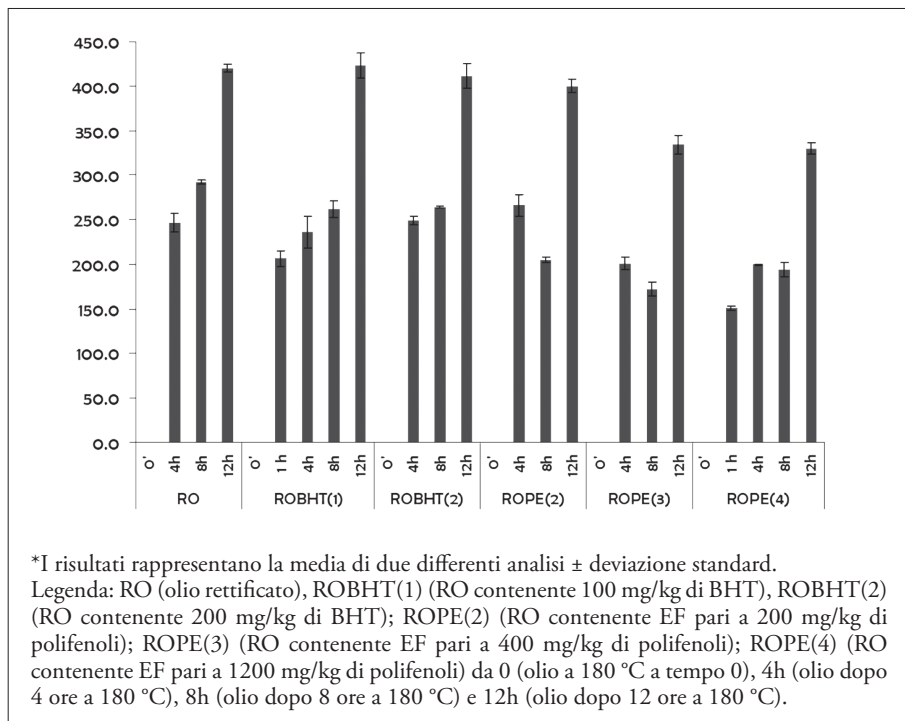


Fig. 3 *Evoluzione dei composti volatili ( $\mu\text{g/kg}$  di olio) espressi come somma dei acroleina e  $\beta,\beta$ -dimetilacroleina durante la simulazione di un processo di frittura (Esposito et. al., 2015)*

di additivi di sintesi), ha spinto l'industria alimentare verso una progressiva riduzione dell'utilizzo di additivi di origine sintetica (Asioli et al., 2017). Oltre a ciò, recenti studi ne hanno messo in evidenza l'effetto tossico e cancerogeno dovuto a una loro assunzione prolungata (EFSA, 2012). Risulta di grande interesse lo sviluppo di tecnologie innovative atte al recupero nonché la valutazione d'impiego di antiossidanti, conservanti e antimicrobici di origine naturale estratti da matrici vegetali che se aggiunti a diverse preparazioni alimentari e non solo, siano in grado di avere le funzioni tecnologiche, per estendere la shelf-life dei prodotti alimentari e di migliorarne le caratteristiche qualitative in termini di proprietà nutrizionali, salutistiche e di sicurezza. Il ruolo dei composti fenolici, e dei derivati dell'oleuropeina in particolare, di contrastare i fenomeni negativi di ossidazione e foto-ossidazione che si verificano in fase di conservazione dell'olio è stato ampiamente dimostrato (Esposito et al., 2017; 2020). Tali fenoli, infatti, reagiscono immediatamente con l'ossigeno disciolto nell'olio, così come con altri radicali liberi, che eser-

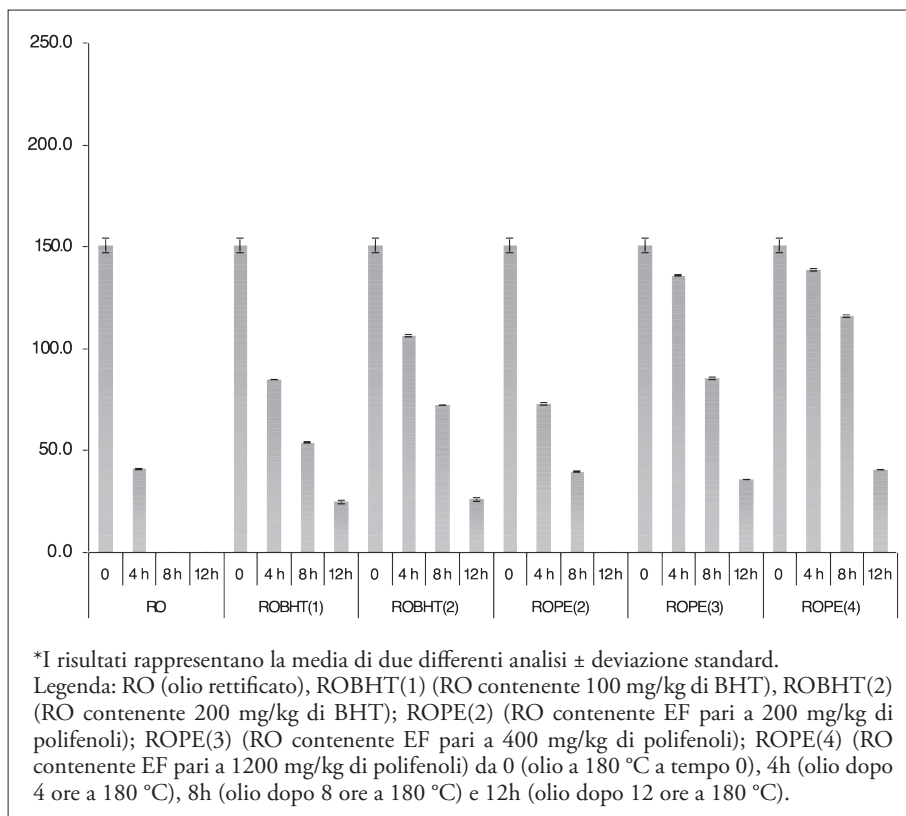


Fig. 4 Evoluzione dell' $\alpha$ -tocoferolo (mg/kg di olio) durante la simulazione di un processo di frittura (Esposito et al., 2015)

citando le loro proprietà di *O<sub>2</sub>-quenching* e *radical scavenging*, limitano, quindi, l'evoluzione dell'autossidazione (Esposito et al., 2020). Sulla base di numerose evidenze scientifiche i composti fenolici da AV rappresentano, come ingredienti naturali innovativi per l'industria alimentare, cosmetica e nutra-ceutica, un'opportunità o un'alternativa complementare agli antiossidanti di sintesi sfruttando le loro attività stabilizzanti, antiossidanti e antimicrobiche (Veneziani et al., 2017). Diverse linee di ricerca si sono orientate in questa direzione. A tale scopo, l'EF da AV, una volta caratterizzato è stato testato attraverso processi di frittura simulata, miscelandolo a oli vegetali, a differenti concentrazioni in termini di fenoli, per valutarne le sue potenzialità nel contrastare fenomeni negativi legati ai processi di termodegradazione dei grassi (Esposito et al., 2015; Sordini et al., 2019). Nello studio condotto da Esposito et al. (2015), le performances dell'antiossidante di origine naturale sono

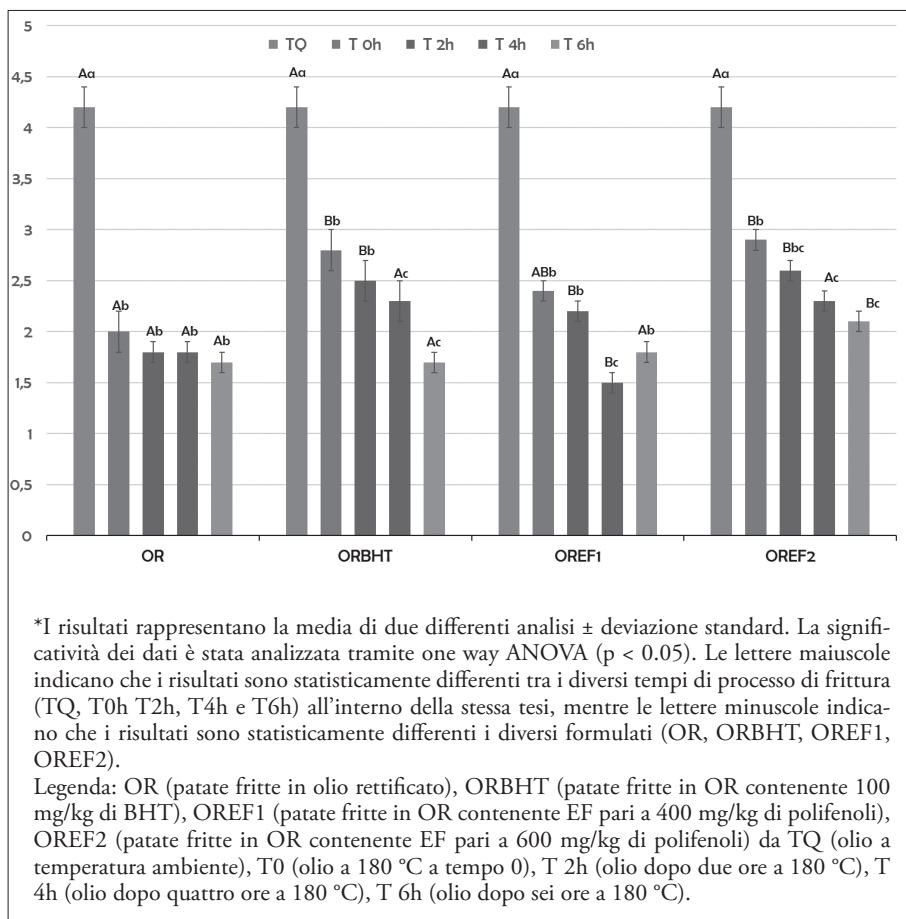


Fig. 5 Evoluzione dell'acido clorogenico (mg/100g d.w.) di patate fritte in diversi oli durante il processo di simulazione della frittura (Sordini et al., 2019)

state confrontate con oli extravergine di oliva, con oli privi di antiossidanti e con aggiunta di antiossidanti di sintesi comunemente utilizzati nei processi di frittura industriale (BHT e BHA), la cui stabilità alle alte temperature e sicurezza nei confronti della salute umana sono state messe in discussione dal panel di esperti dell'EFSA (EFSA, 2012). I risultati hanno dimostrato che l'EF è efficace nel preservare il contenuto di  $\alpha$ -tocoferolo (vitamina E) e nel ridurre la formazione e l'accumulo di sostanze volatili potenzialmente tossiche per la salute umana come l'acroleina e altre aldeidi volatili derivanti dal processo di ossidazione secondaria degli acidi grassi (figg. 3 e 4). Questi risultati incoraggianti sono stati confermati da un recente studio, dove Sor-

	TQ	T 0h	T 2h	T 4h	T 6h
OR	0.0 ± 0.0 <sup>Aa</sup>	39.6 ± 2.7 <sup>Ab</sup>	25.9 ± 1.4 <sup>Ac</sup>	29.9 ± 1.0 <sup>Ac</sup>	33.4 ± 1.5 <sup>Ad</sup>
ORBHT	0.0 ± 0.0 <sup>Aa</sup>	39.0 ± 2.4 <sup>Ab</sup>	27.0 ± 2.1 <sup>Ac</sup>	26.5 ± 1.3 <sup>Ac</sup>	22.8 ± 1.8 <sup>Bc</sup>
OREF1	0.0 ± 0.0 <sup>Aa</sup>	27.7 ± 2.0 <sup>Bb</sup>	22.9 ± 1.9 <sup>Ab</sup>	19.2 ± 1.2 <sup>Bc</sup>	20.1 ± 1.4 <sup>Bc</sup>
OREF2	0.0 ± 0.0 <sup>Aa</sup>	64.8 ± 0.9 <sup>Ca</sup>	28.7 ± 2.4 <sup>Ab</sup>	20.5 ± 1.6 <sup>Bac</sup>	19.6 ± 1.7 <sup>Bc</sup>

\*I risultati rappresentano la media di due differenti analisi ± deviazione standard. La significatività dei dati è stata analizzata tramite one way ANOVA ( $p < 0.05$ ). Le lettere maiuscole in apice indicano che i risultati sono statisticamente differenti tra i diversi tempi di processo di frittura (TQ, T0h T2h, T4h e T6h) all'interno della stessa tesi, mentre le lettere minuscole in apice indicano che i risultati sono statisticamente differenti i diversi formulati (OR, ORBHT, OREF1, OREF2).  
 Legenda: OR (patate fritte in olio rettificato), ORBHT (patate fritte in OR contenente 100 mg/kg di BHT), OREF1 (patate fritte in OR contenente EF pari a 400 mg/kg di polifenoli), OREF2 (patate fritte in OR contenente EF pari a 600 mg/kg di polifenoli) da TQ (olio a temperatura ambiente), T0 (olio a 180 °C a tempo 0), T 2h (olio dopo due ore a 180 °C), T 4h (olio dopo quattro ore a 180 °C), T 6h (olio dopo sei ore a 180 °C).

Tab. 4 *Evoluzione dell'acrilammide ( $\mu\text{g/kg}$ ) nelle patate fritte in diversi oli durante il processo di simulazione della frittura (Sordini et al., 2019)*

dini et al. (2019) testavano l'efficacia dell'EF in un processo di frittura per immersione prolungata in presenza di alimento (patate pre-fritte). Anche in questo studio è stata dimostrata la capacità stabilizzante dell'EF durante la frittura, svolgendo un ruolo importante (dose-dipendente) nel preservare gli antiossidanti sia dell'olio sia dell'alimento e nel contrastare la formazione di composti indesiderati (acroleina ed esanale), o potenzialmente tossici per la salute come l'acrilammide (fig. 5 e tab. 4). Questi risultati dimostrano chiaramente che l'EF può essere utilizzato come fonte di antiossidanti naturali per sostituire gli additivi di sintesi in impieghi dai volumi importanti come per la ristorazione o per la frittura industriale.

Un'ulteriore attività di ricerca ha riguardato nello specifico lo studio dell'effetto protettivo di un EF aggiunto ai soffritti nella preparazione di salse di pomodoro nei confronti dei fitonutrienti (carotenoidi e altre molecole bioattive) presenti in una passata di pomodoro commerciale, durante la simulazione della fase cottura di un sugo preparato in condizioni di cottura domestiche. La presenza dei fenoli della AV sia durante la cottura del soffritto sia della salsa ha contribuito a preservare i principali costituenti fenolici del pomodoro e del soffritto (flavonoidi e tocoferoli), e dei carotenoidi (alfa e beta-carotene e trans- e cis-licopene) in funzione al contenuto di sostanze fenoliche apportate con l'EF. Come illustrato in figura 6, nel prodotto finito rimanevano quantitativi più abbondanti dei composti bioattivi responsabili delle proprietà salutistiche di questo alimento e, inoltre, residuavano discrete quantità dei polifenoli apportati dall'estratto, di notevole interesse per le loro conosciute proprietà salutistiche nei confronti del consumatore.

I deterioramenti chimici e microbiologici che si verificano durante la

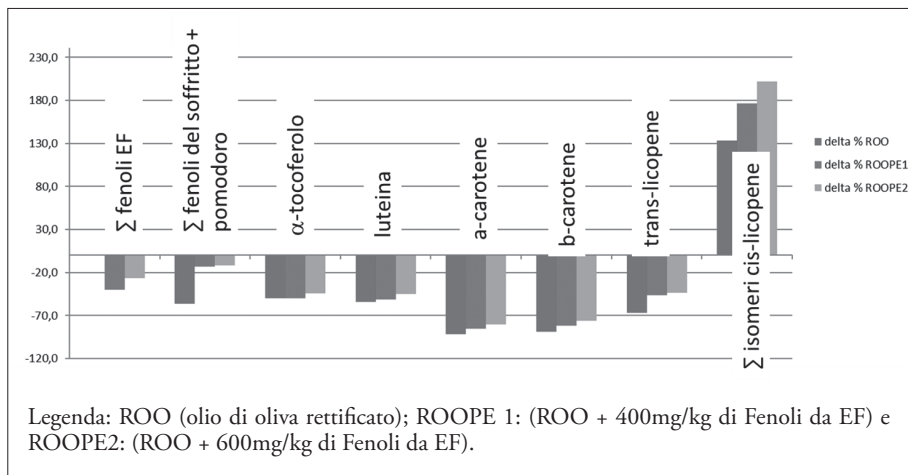


Fig. 6 *Variazione % (post-cottura vs pre-cottura) dei fitonutrienti di un sugo di pomodoro nel processo di preparazione domestica, in funzione dell'aggiunta all'olio di cottura di EF da AV, (Taticchi et al., 2017)*

manipolazione, la lavorazione e la conservazione sono tra le principali cause di perdita di qualità anche degli alimenti di origine animale. Lo sviluppo dell'odore rancido e del sapore sgradevole, i cambiamenti di consistenza e colore e la perdita del valore nutrizionale in questi prodotti possono essere prevenuti con l'uso appropriato di additivi. Diverse ricerche hanno chiaramente dimostrato che gli EF da AV esercitano un'azione antimicrobica verso specie microbiche patogene e non solo, migliorando la shelf-life di alcuni prodotti alimentari particolarmente deperibili come maionese, prodotti carnei e ittici freschi e trasformati, garantendone anche la sicurezza (Balzan et al., 2017; Fasolato et al., 2015; Menchetti et al., 2020; Miraglia et al., 2016; 2020).

In uno studio effettuato da Balzan et al. (2017) è stato aggiunto un EF purificato da AV a due concentrazioni di 0,075 e 0,15 g/100 g nella preparazione di salsicce di maiale fresche crude e cotte preparate senza additivi chimici (nitriti e nitrati o sodio lattato). Dai risultati è evidente l'efficacia dell'EF nel prevenire l'ossidazione lipidica e nel limitare la degradazione ossidativa del colesterolo sia nel prodotto crudo che nel cotto. Dal panel test effettuato risulta che l'EF modifica in qualche modo il sapore dei campioni, ma in nessuno caso tale cambiamento è stato considerato negativo e, quindi, la quantità di estratto da utilizzare per contrastare efficacemente il processo ossidativo (valori di TBARS inferiori a 1 mg/kg e livelli COPs costantemente bassi) è in perfetto equilibrio con la qualità sensoriale del prodotto finale.

In alcuni studi sono state definite per ogni attività antimicrobica le soglie

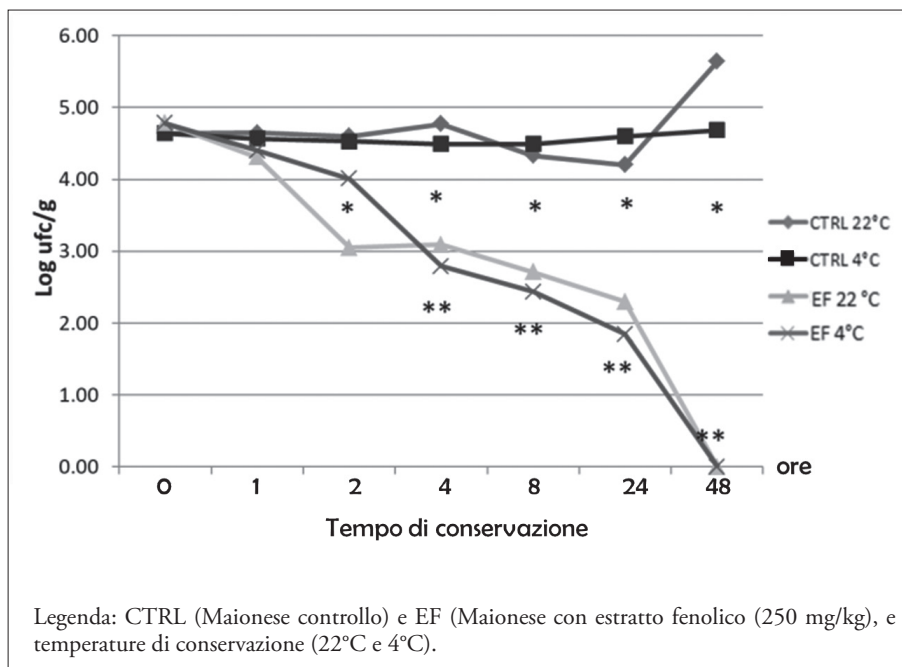


Fig. 7 Popolazione di *Salmonella Enteritidis* presente nella maionese prodotta con olio di girasole con aggiunta di estratto fenolico da AV (250 mg/kg) e Controllo durante due giorni di conservazione a due diverse temperature (22°C e 4°C) (Menchetti et al., 2020)

di attività per l'impiego dell'EF negli alimenti, attraverso test preliminari *in vitro*. In particolare, tra i batteri Gram-negativi testati, un effetto significativo è stato trovato per *Escherichia coli* per valori maggiori di 6mg/mL; mentre la maggior parte dei batteri Gram-positivi sono influenzati da concentrazioni decisamente più basse (Carraro et al., 2014; Fasolato et al., 2015; Obied et al., 2007; Roila et al., 2019a; 2019b). La capacità dei fenoli dell'EF di inibire la crescita di specie patogene come *Listeria monocytogenes* e lo *Staphylococcus aureus* è stata valutata tramite test *in vitro* su altri modelli alimentari come la salsiccia fresca italiana (Fasolato et al., 2016a). Sulla base di queste evidenze scientifiche diversi lavori hanno indagato l'impiego di tale EF come potenziale ingrediente bioattivo antimicrobico allo scopo di migliorare la durata di conservazione e lo stato igienico dei prodotti freschi di diverse matrici alimentari come la maionese, l'orata, il salmone, sul gambero rosa e il petto di pollo (Fasolato et al., 2016b; Menchetti et al., 2020; Miraglia et al., 2016; 2020). Tutti i modelli alimentari sono stati esaminati per i diversi target microbici e di ossidazione lipidica durante il periodo di conservazione refrigerata. In

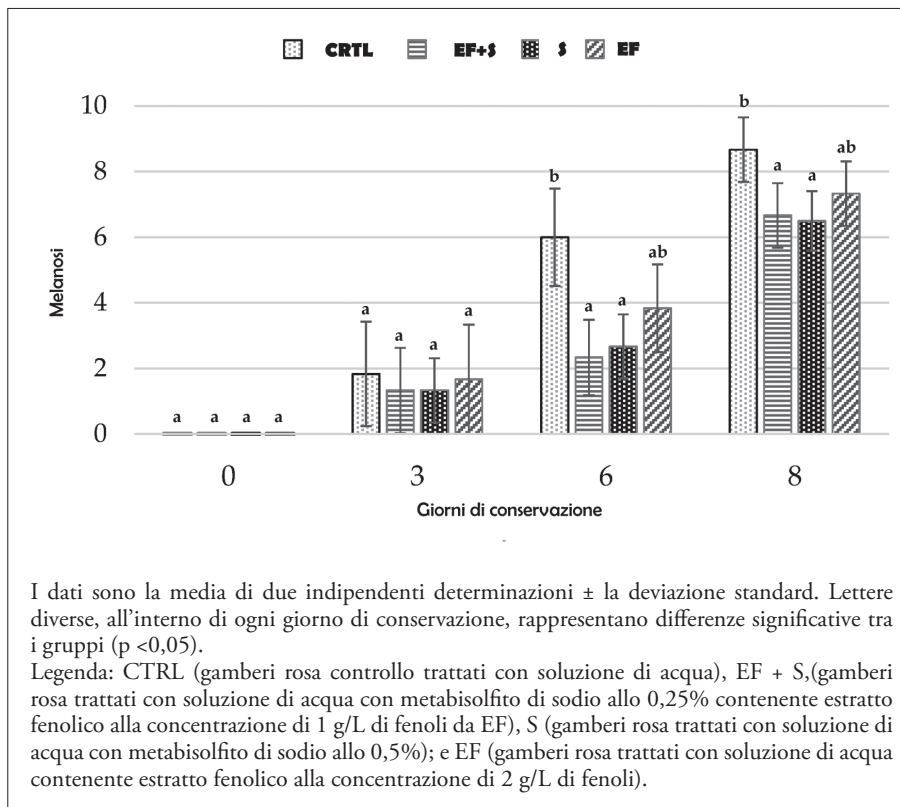


Fig. 8 *Evoluzione della melanosi in gamberi rosa durante il periodo di conservazione in funzione del trattamento (Miraglia et al., 2020)*

particolare, l'influenza dell'EF da AV e della temperatura di conservazione sulla sopravvivenza e proliferazione della *Salmonella Enteritidis* inoculata sulla maionese è stata recentemente osservata da Menchetti et al. (2020). Dallo studio emerge che l'EF ha migliorato la stabilità ossidativa, mostrando inoltre un effetto battericida sulla *Salmonella* E, con una riduzione di quasi 5 Log UFC/g in 48 ore a 4 °C (fig. 7).

Come sottolineato da Fasolato et al. (2016b), il CF ha determinato un aumento della durata di conservazione del petto di pollo di 2 giorni. Dai risultati emerge che i fenoli del CF hanno interagito con le matrici alimentari e, che, quindi, il bagno con CF risulta una modalità di trattamento efficace. Coerente con altri studi l'efficacia dell'EF, effettuando trattamenti d'immersione, può prevenire il deterioramento della qualità di tali prodotti ittici, in particolare dei filetti di salmone (Miraglia et al., 2016), costituendo anche

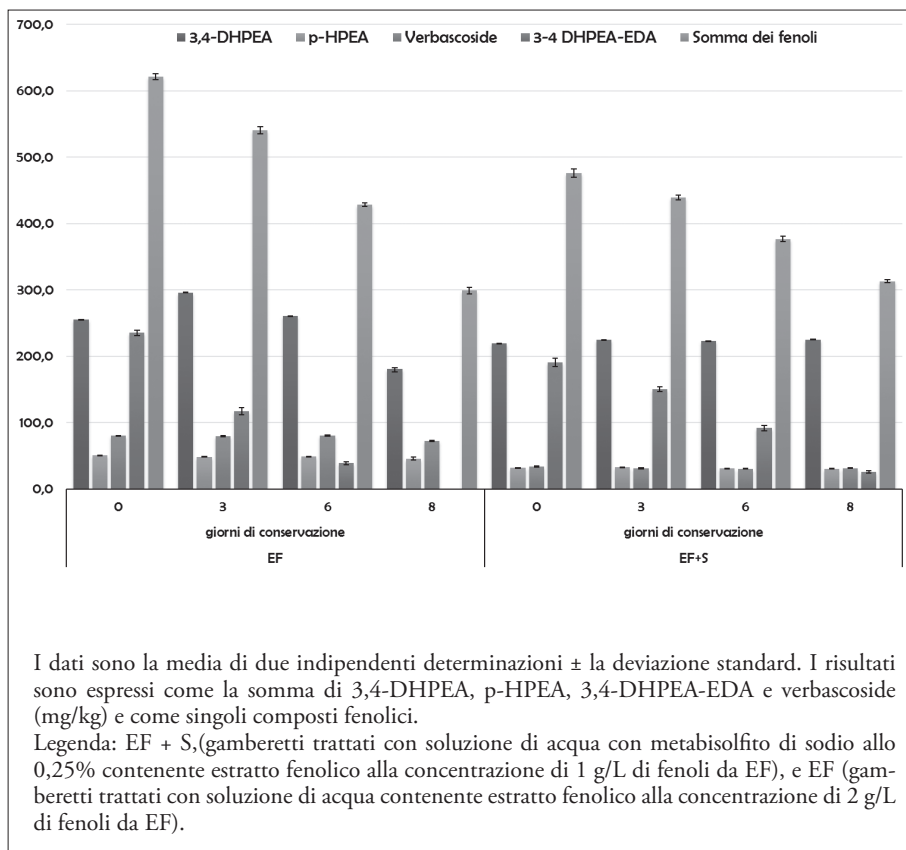


Fig. 9 *Evoluzione dei composti fenolici in gamberetti trattati con una soluzione di acqua contenente estratto fenolico 2g /L di fenoli (EF) e trattati con una soluzione di acqua con metabisolfito di sodio allo 0,25% contenente 1 g/L di fenoli (EF+S) durante la conservazione (Miraglia et al., 2020)*

una buona alternativa all'agente solforante nel ritardare il fenomeno della melanosi nei crostacei (Miraglia et al., 2020). Di recente l'EF come additivo naturale è stato valutato in studio sul gambero rosa (Miraglia et al., 2020). In particolare, l'EF ha ritardato i fenomeni alterativi rallentando l'ossidazione dei lipidi, lo sviluppo microbico e la formazione dei composti azotati volatili, in modo proporzionalmente efficace alla dose di estratto utilizzato. Tuttavia, gli effetti sulla formazione della melanosi sono stati meno evidenti. I cambiamenti nella melanosi durante il periodo di conservazione sono riportati nella figura 8. A differenza dell'effetto inibitorio marginale sulla progressione della formazione dei black spot mostrato dal trattamento con solo EF (concentrazione di 2 g/L), il trattamento 1 g/L di fenoli, aggiunto a una soluzione



di metabisolfito di sodio allo 0,25%, è stato, invece, in grado di ritardare la melanosi con un'efficacia pari alla soluzione di solo metabisolfito di sodio alla concentrazione dello 0,5%, normalmente utilizzata dai produttori per anti-melanosi nei gamberetti. Questo risultato è molto promettente, date le ben note reazioni avverse associate ai solfiti. Poter trattare, infatti, alimenti con minori quantità di solfiti, abbinandoli al potere antiossidante dei composti naturali, permetterebbe di ottenere, da un lato, un prodotto più sano e, dall'altro un prodotto accettabile per il consumatore allo stesso modo di uno trattato solo con solfiti. Inoltre, pur se assorbiti sulle diverse matrici alimentari solo per minime quantità rispetto alla quantità disponibile in soluzione, i polifenoli dell'EF consentono un significativo aumento dell'attività antiossidante delle carni rispetto al controllo, da correlare con molta probabilità al potere del 3,4-DHPEA-EDA, composto che, allo stesso tempo, era il meno assorbito ma il più consumato. Residue quantità di tali composti, significativamente diverse in funzione della concentrazione iniziale in soluzione, rappresentano inoltre, un'importante risorsa di composti bioattivi per la conservazione del prodotto ma anche per la salute del consumatore (fig. 9).

I fenoli purificati provenienti dalle acque reflue dell'olio extravergine di oliva si sono dimostrati un efficace antiossidante, rappresentando quindi un potenziale ingrediente per garantire la qualità e la sicurezza delle preparazioni dei prodotti maionese, carni, ittici e loro trasformati.

#### RIASSUNTO

Le olive e i loro derivati sono ricchi di esclusivi composti fenolici, non presenti in altre matrici alimentari, le cui proprietà biologiche e salutistiche sono ampiamente riconosciute (i secoiridoidi e i loro derivati). Durante il processo di estrazione meccanica dell'olio extravergine di oliva (OEVO), quasi il 50% dell'intero patrimonio fenolico del frutto passa nei co-prodotti (acque di vegetazione (AV) e sanse vergini), determinandone un marcato carico inquinante a causa della loro spiccata attività antimicrobica. D'altra parte, questo elevato contenuto in composti fenolici bioattivi esclusivi porta altresì a considerare le AV un'importante risorsa economica. Nel recente passato, numerosi sono stati gli sforzi per la messa a punto di un efficiente sistema di recupero dalle AV dei frantoi oleari per ottenere, da una parte un disinquinamento delle stesse, dall'altra un concentrato fenolico ricco di molecole bioattive, che opportunamente purificato e stabilizzato possa inserirsi nel mercato delle sostanze bioattive di origine naturale. Tra i molti processi tecnologici impiegati, un sistema di separazione su membrana, che non prevede l'utilizzo di solventi, risulta un valido e utile approccio ecocompatibile all'ottenimento di estratti fenolici (EF). Le più recenti attività di ricerca si sono focalizzate sulle potenziali applicazioni dell'EF in campo alimentare, sia per la produzione di alimenti funzionali sia come additivo di origine naturale, rappresentando un'alternativa a quelli alimentari conven-

zionali ad azione stabilizzante, antiossidante e antimicrobica. In particolare, l'EF è stato addizionato a diverse matrici alimentari (prodotti di origine animale e vegetale) al fine di valutare la sua efficacia nel migliorare sensibilmente la qualità finale del prodotto e la sua shelf-life, nonché nel limitare la produzione di sostanze nocive per la salute umana.

La valorizzazione dei co-prodotti dell'estrazione meccanica dell'OEVO, delle AV, in particolare, rappresenta un'enorme opportunità per ridare slancio e recuperare competitività all'intero settore, nonché per favorire la sostenibilità ambientale.

## ABSTRACT

Olives and their derivatives are rich in exclusive phenolic compounds such as secoiridoids and their derivatives, not present in other food matrices, of which biological and healthy properties are largely recognized. During the mechanical extraction process of the virgin olive oil (VOO) approximatively half of the whole phenolic heritage is loss, flowing into its co-products (olive vegetation waters (OVW) and virgin pomaces) determining a not negligible pollution load due to its strong antimicrobial activity. On the other hand, the co-products large amount of exclusive bioactive phenolic compounds let us to consider them as an important economic resource. In the recent past, many efforts have been spent towards the implementation and tuning of an efficient recovery system of OVW from olive oil mills, with the aim of obtaining both their de-pollution and a rich in bioactive molecule phenolic concentrate which, once purified and stabilized, is eligible to be placed into the bioactive natural substances market. Among the different technological processes employed, a solvent free membrane-based separation system has revealed to be a valid and useful eco-friendly approach to obtain phenolic extracts (PE). The most recent research activities have been focused on the PE potential applications in the food sector, oriented both on the production of functional food and on its use as natural additive, representing an alternative to those of synthetic origin with stabilizing, antioxidant and antimicrobial activity. In particular, PE has been added to various food matrices (both of vegetable and animal origin) in order to evaluate its effectiveness in improving the overall quality and shelf-life of the product as well as in lowering the unwanted and toxic compounds. Therefore, the valorization of OEVO mechanical extraction co-products represents a concrete opportunity to recover competitiveness and boost to the whole olive oil sector and, at the same time, to foster environment sustainability.

## BIBLIOGRAFIA

- ARAÚJO M., PIMENTEL F.B., ALVES R.C., OLIVEIRA M.B.P.P. (2015): *Phenolic compounds from olive mill wastes: Health effects, analytical approach and application as food antioxidants*, «Trends Food Sci. Technol.», 45, pp. 200-211.
- ASIOLI D., ASCHEMANN-WITZEL J., CAPUTO V., VECCHIO R., ANNUNZIATA A., NÆS T., VARELA P. (2017): *Making sense of the "clean label" trends: A review of consumer food choice behavior and discussion of industry implications*, «Food Research International», 99, pp. 58-71.

- BALZAN S., TATICCHI A., CARDAZZO B., URBANI S., SERVILI M., DI LECCE A., ZABALBA I.A., RODRIGUEZ-ESTRADA M.T., NOVELLI E., FASOLATO L. (2017): *Effect of phenols extracted from a by-product of the oil mill on the shelf-life of raw and cooked fresh pork sausages in the absence of chemical additives*, «LWT - Food Science and Technology», 85, pp. 89-95.
- CARRARO L., FASOLATO L., MONTEMURRO F., MARTINO M.E., BALZAN S., SERVILI M., NOVELLI E., CARDAZZO B. (2014): *Polyphenols from olive mill waste affect biofilm formation and motility in Escherichia coli K-12*, «Microb. Biotechnol.», 7 (3), pp. 265-275.
- CASABURI I., PUOCI F., CHIMENTO A., SIRIANNI R., RUGGIERO C., AVENA P., PEZZI V. (2013): *Potential of olive oil phenols as chemopreventive and therapeutic agents against cancer: A review of in vitro studies*, «Molecular Nutrition & Food Research», 57, pp. 71-83.
- CICERALE S., LUCAS L., KEAST R. (2010): *Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil*, «Int. J. Mol. Sci.», 1, pp. 458-479.
- DE MARCO E., SAVARESE M., PADUANO A., SACCHI R. (2007): *Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters*, «Food Chemistry», 104 (2), pp. 858-867.
- DERMECHE S., NADOUR M., LARROCHE C., MOULTI-MATI F. & MICHAUD P. (2013): *Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies*, «Process Biochemistry», 48 (10), pp. 1532-1552.
- EFSA (2012): *Scientific opinion on the re-evaluation of butylated hydroxytoluene BHT (E 321) as a food additive*, «EFSA Journal», 10 (3), pp. 2588-2631.
- EFSA PANEL ON DIETETIC PRODUCTS, NUTRITION AND ALLERGIES (NDA) (2011): *Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006*, «EFSA Journal», 9 (4), 2033, pp. 1-25.
- ESPOSTO S., SELVAGGINI R., TATICCHI A., VENEZIANI G., SORDINI B., SERVILI M. (2020): *Quality evolution of extra-virgin olive oils according to their chemical composition during 22 months of storage under dark conditions*, «Food Chemistry», 311.
- ESPOSTO S., TATICCHI A., DI MAIO I., URBANI S., VENEZIANI G., SELVAGGINI R., SORDINI B., SERVILI M. (2015): *Effect of an olive phenolic extract on the quality of vegetable oils during frying*, «Food Chemistry», 176, pp. 184-192.
- ESPOSTO S., TATICCHI A., URBANI S., SELVAGGINI R., VENEZIANI G., DI MAIO I., SORDINI B., SERVILI M. (2017): *Effect of light exposure on the quality of extra virgin olive oils according to their chemical composition*, «Food Chemistry», 229, pp. 726-733.
- FASOLATO L., CARDAZZO B., BALZAN S., CARRARO L., ANDREANI A.N., TATICCHI A., NOVELLI E. (2016b): *Using a concentrate of phenols obtained from olive vegetation water to preserve chilled food: Two case studies*, «Ital J Food Saf.», 5 (2), p. 5651.
- FASOLATO L., CARDAZZO B., BALZAN S., CARRARO L., TATICCHI A., MONTEMURRO F., NOVELLI E. (2015): *Effect of minimum bactericidal concentration of phenols extracted from oil vegetation water on spoilers, starters and food-borne bacteria*, «Ital. J. Food Saf.», 4, pp. 75-77.
- FASOLATO L., CARRARO L., FACCO P., CARDAZZO B., BALZAN S., TATICCHI A., ..., NOVELLI E. (2016a): *Agricultural by-products with bioactive effects: A multivariate approach to evaluate microbial and physicochemical changes in a fresh porksausage enriched with phenolic compounds from olive vegetation water*, «International Journal of Food Microbiology», 2 (228), pp. 34-43.

- GULLÓN P., GULLÓN B., ASTRAY G., CARPENA M., FRAGA-CORRAL M., PRIETO M.A., SIMAL-GANDARA J. (2020): *Valorization of by-products from olive oil industry and added-value applications for innovative functional foods*, «Food Res. Int.», 137, 109683.
- KEARNEY J. (2010): *Food consumption trends and drivers*, «Phil. Trans. R. Soc. B.», 365, pp. 2793-2807.
- MENCHETTI L., TATICCHI A., ESPOSTO S., SERVILI M., RANUCCI D., BRANCIARI R., MIRAGLIA D. (2020): *The influence of phenolic extract from olive vegetation water and storage temperature on the survival of Salmonella Enteritidis inoculated on mayonnaise*, «LWT», 129, 109648.
- MIRAGLIA D., CASTRICA M., MENCHETTI L., ESPOSTO S., BRANCIARI R., RANUCCI D., URBANI S., SORDINI B., VENEZIANI G., SERVILI M. (2020): *Effect of an olive vegetation water phenolic extract on the physico-chemical, microbiological and sensory traits of shrimp (Parapenaeus longirostris) during the shelf-life*, «Foods», 9, 1647.
- MIRAGLIA D., ESPOSTO S., BRANCIARI R., URBANI S., SERVILI M., PETRUCCI S., RANUCCI D. (2016): *Effect of a phenolic extract from olive vegetation water on fresh salmon steak quality during storage*, «Italian Journal of Food Safety», 5 (4):10.4081/ijfs.2016.6167.
- MONTEDORO G.F., SERVILI M., BALDIOLI M., MINIATI E., MACCHIONI A. (1993): *Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. 3. Spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives*, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», 41 (11), pp. 2228-2234.
- NIAOUNAKIS M., HALVADAKIS C.P. (2004): *The Olive-Mill Waste Management: Literature Review and Patent Survey*, Typothito-George Dardanos, Athens.
- NASINI L., GIGLIOTTI G., BALDUCCINI M.A., FEDERICI E., CENCI G., PROIETTI P. (2013): *Effect of solid olive-mill waste amendment on solid fertility and olive (Olea europaea L.)*, «Agriculture, Ecosystems and Environment», 164, pp. 292-297.
- OBIED H.K., PRENZLER P.D., OMAR S.H., ISMAEL R., SERVILI M., ESPOSTO E., TATICCHI A., URBANI S., SELVAGGINI R. (2012): *Pharmacology of olive biophenols*, Edited by Fishbein J.C., «Advances in Molecular Toxicology», 6, pp. 195-242.
- PIRODDI M., ALBINI A., FABIANI R., GIOVANNELLI L., LUCERI C., NATELLA F., ROSIGNOLI P., ROSSI T., TATICCHI A., SERVILI M., GALLI F. (2017): *Nutrigenomics of extra-virgin olive oil: A review*, «International Union of Biochemistry and Molecular Biology», 43 (1), pp. 17-41.
- PROIETTI P., NASINI L., ILARIONI L., SALAH S., TATICCHI A., SORDINI B., SERVILI M. (2012): *Utilizzazione e valorizzazione delle sanse vergini e delle acque di vegetazione*, in Collana divulgativa dell'Accademia, volume XXII.
- ROILA R., VALIANI A., RANUCCI D., ORTENZI R., SERVILI M., VENEZIANI G., BRANCIARI R. (2019a): *Antimicrobial efficacy of a polyphenolic extract from olive oil by-product against "Fior di latte" cheese spoilage bacteria*, «International Journal of Food Microbiology», 295, pp. 49-53.
- ROILA R., RANUCCI D., VALIANI A., GALARINI R., SERVILI M., BRANCIARI R. (2019b): *Antimicrobial and anti-biofilm activity of olive oil by-products against Campylobacter spp. Isolated from chicken meat*, «Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria», 18 (1), pp. 43-52.
- REGOLAMENTO (UE) n. 412/2012 della Commissione, del 15 maggio 2012.
- SERVILI M., ESPOSTO E., TATICCHI A., URBANI S., DI MAIO I., VENEZIANI G., SELVAGGINI R. (2015): *New approaches to virgin olive oil quality, technology, and by-products valorization*, «European Journal of Lipid Science and Technology», 117, pp. 1882-1892.
- SERVILI M., ESPOSTO S., FABIANI R., URBANI S., TATICCHI A., MARIUCCI F., SELVAGGINI

- R., MONTEDORO G.F. (2009): *Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and sensory activities according to their chemical structure*, «Inflammopharmacology», 17, pp. 1-9.
- SERVILI M., ESPOSTO S., VENEZIANI G., URBANI S., TATICCHI A., DI MAIO I., SELVAGGINI R., SORDINI B., MONTEDORO G.F. (2011a): *Improvement of bioactive phenol content in virgin olive oil with an olive-vegetation water concentrate produced by membrane treatment*, «Food Chemistry», 124 (4), pp. 1308-1315.
- SERVILI M., RIZZELLO C.G., TATICCHI A., ESPOSTO S., URBANI S., MAZZACANE F., DI MAIO I., SELVAGGINI R., GOBBETTI M., DI CAGNO R. (2011b): *Functional milk beverage fortified with phenolic compounds extracted from olive vegetation water, and fermented with  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)-producing and potential probiotic lactic acid bacteria*, «Int. J. Food Microb.», 147, pp. 45-52.
- SERVILI M., SELVAGGINI R., ESPOSTO S., TATICCHI A., MONTEDORO G.F., MOROZZI G. (2004): *Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil*, «Journal of Chromatography A», 1054, pp. 113-127.
- SERVILI M., SELVAGGINI R., ESPOSTO S., TATICCHI A., MONTEDORO G.F., MOROZZI G. (2004): *Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspect of production that affect their occurrence in the oil*, «J. Chromatogr. A», 1054, pp. 113-27.
- SERVILI M., SORDINI B., ESPOSTO S., URBANI S., VENEZIANI G., DI MAIO I., SELVAGGINI R., TATICCHI A. (2013): *Biological activities of phenolic compounds of extra virgin olive oil*, «Antioxidants», 3 (1), pp. 1-23.
- SHAHIDI F., AMBIGAIPALAN P. (2015): *Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects – a review*, «J. Funct. Foods», 18, pp. 820-897.
- SORDINI B., VENEZIANI G., SERVILI M., ESPOSTO S., SELVAGGINI R., LOREFICE A., TATICCHI A. (2019): *A quanti-qualitative study of a phenolic extract as a natural antioxidant in the frying processes*, «Food Chemistry», 279, pp. 426-434.
- TATICCHI A., ESPOSTO S., URBANI S., VENEZIANI G., SELVAGGINI R., LOREFICE A., SORDINI B., SERVILI M. (2017): *Effect of an olive phenolic extract added to the oily phase of a tomato sauce, on the preservation of phenols and carotenoids during domestic cooking*, «LWT, Food Science and Technology», 84, pp. 572-578.
- VENEZIANI G., NOVELLI E., ESPOSTO E., TATICCHI A., SERVILI M. (2017): *Applications of recovered bioactive compounds in food products*, Edit by Galanakis C.M., *Olive Mill Waste: Recent Advances for Sustainable Management*, pp. 231-253.