

Anno XVII • n.3/4 • luglio/agosto/settembre 2006



# Il Chimico Italiano

Periodico di informazione dei Chimici d'Italia

n. **3/4**

# Da Canzoneri ad oggi: i componenti fenolici degli oli extravergini di oliva. Struttura chimica, ruolo e metodi analitici per la determinazione

di Lorenzo Cerretani<sup>1</sup>, Alessandra Bendini<sup>1</sup>, Domenico Mencarelli<sup>2</sup>, Giuseppe Caramia<sup>2</sup>

## » Introduzione

I biofenolici, componenti idrosolubili presente negli oli vergini di oliva, differenziano questo prodotto dagli altri oli edibili. Questi composti svolgono diverse funzioni, in particolare sono importanti per la conservabilità del prodotto, intervenendo come antiossidanti, svolgono funzioni nutrizionali e infine lo caratterizzano sensorialmente conferendogli particolari sensazioni gustative. Dal 1961 ad oggi sono state utilizzate numerose tecniche analitiche sia per la fase preparativa che per la separazione e quindi quantificazione dei diversi composti. Per quanto concerne la fase preparativa si utilizzano diverse tecniche estrattive, in particolare liquido-liquido (L/L) con l'impiego di differenti miscele di solventi, o estrazione su fase solida (SPE) con varie fasi stazionarie e miscele eluenti. Per questa fase sono stati messi a confronto diversi metodi L/L con più solventi e SPE con diverse fasi stazionarie e mobili (Carasco-Pancorbo et al., 2005<sup>1</sup>). I risultati hanno evidenziato recuperi elevati e prestazioni paragonabili per quanto riguarda il metodo di estrazione L/L condotto con una miscela metanolo/acqua (60/40, v/v) e SPE con fase sta-

zionaria diolica. La differenza principale nei due metodi è rappresentata dai costi di estrazione, minore per L/L e nei tempi di analisi, più rapidi per la SPE diolica, per via della veloce fase di evaporazione del solvente di eluizione (metanolo) più volatile della miscela metanolo/acqua. Relativamente alla separazione dei singoli composti fenolici la prima tecnica utilizzata è stata la gascromatografia capillare (CGC) e la più diffusa è la cromatografia liquida ad alta prestazione in fase inversa (RP-HPLC); tuttavia, recentemente l'elettroforesi capillare (CE) è stata applicata a tale scopo con buoni risultati.

## » Importanza dell'olio di oliva e principali differenze rispetto agli altri oli vegetali

Negli ultimi 20 anni sono stati numerosi i lavori che hanno messo in evidenza l'unicità dell'olio vergine di oliva e la sua attività sulla salute umana quale sostanza grassa principalmente impiegata nella dieta mediterranea. Dalla definizione merceologica degli oli vergini di oliva (Reg CE 1513/01) si colgono le peculiarità di tali prodotti: "...ottenuti dal frutto dell'olivo soltanto median-

te processi meccanici o altri processi fisici, in condizioni che non causano alterazioni dell'olio...esclusi gli oli ottenuti mediante solvente o con coadiuvanti ad azione chimica o biochimica...". Infatti, il peculiare processo tecnologico di trasformazione delle olive ad olio vergine permette la conservazione di composti presenti nel frutto che verrebbero altrimenti persi nelle fasi di raffinazione/rettificazione utilizzate nella produzione degli altri oli vegetali.

Come tutti gli oli vegetali anche il vergine di oliva risulta costituito per il 98-99% da trigliceridi e per la restante percentuale da quelli che sono chiamati componenti minori. Tali composti caratterizzano i diversi oli vegetali e derivano dal frutto/semi da cui vengono estratti, in particolare il vergine di oliva è ricco in composti a struttura fenolica. Questi furono individuati più di 100 anni fa da un chimico italiano, Canzoneri (1906), che riportò le prime osservazioni sulla presenza di composti a struttura fenolica nell'olio vergine di oliva. Da allora, e soprattutto negli ultimi 50 anni, le ricerche in questo campo sono aumentate ed hanno portato alla conoscenza delle principali strutture chimiche dei composti che costituiscono tale frazione.

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università di Bologna, P.zza Goidanich 60, 47023 Cesena (FC), Italy

<sup>2</sup>Primario Emerito Ospedale "G. Salesi" Ancona

<sup>3</sup>Consigliere C.N.C.

<sup>4</sup>Autore corrispondente: lorenzo.cerretani2@unibo.it

In relazione alle norme di pubblicazione di contributi di interesse scientifico-professionale su "Il Chimico Italiano" il presente articolo è stato ricevuto il 2 agosto 2006 ed è stato accettato per la pubblicazione il 25 settembre 2006.

### » Composti fenolici dell'olio di oliva

Per quanto riguarda i costituenti della sola componente fenolica possiamo distinguere sei classi di molecole il cui contenuto varia in funzione di molteplici fattori: agronomici (metodi di coltivazione o epoca di raccolta delle olive), tecnologici di trasformazione (sistema di produzione degli oli vergini) e di conservazione.

**Acidi fenolici:** molecole con la struttura chimica di base degli acidi benzoico e cinnamico (come gli acidi vanillico, caffeico, ferulico e cumarico).

**Alcoli fenolici:** in maggioranza idrossitirosole e tirosolo con la possibilità di rinvenire i rispettivi composti acetati. Bianco *et al.* (1998) hanno rilevato anche la forma glucosidica dell'idrossitirosole soprattutto nei sottoprodotti (acque di vegetazione e sanse).

**Secoiridoidi:** questa classe è rappresentata solo nella famiglia delle Oleaceae (Servili *et al.*, 2002) ed è maggioritaria nel profilo fenolico dell'olio vergine di oliva. Questi sono i derivati dalle forme glicosidiche presenti nel frutto, che, a seguito delle trasformazioni occorse durante il processo di estrazione, perdono lo zucchero a loro legato originando numerosi composti agliconici (figura 1). Le forme principali sono quelle aldeidiche ed isomeriche dell'oleuropeina e ligstroside aglicone, oltre che le forme dialdeidiche della decarbossimetil-oleuropeina e decarbossimetil-ligstroside agliconi. Andrewes *et al.* (2003), indagando sulla correlazione tra le molecole a struttura fenolica e le proprietà sensoriali dell'olio vergine di oliva, hanno attribuito alla decarbossimetil-ligstroside aglicone la maggior influenza sulla sensazione di pungente-piccante; secondo Gutiérrez-Rosales *et al.* (2003), invece, l'attributo di amaro sarebbe riconducibile alle forme aldeidiche e dialdeidiche dell'oleuropeina e ligstroside agliconi.

**Flavonoidi:** luteolina e apigenina sono i principali rappresentanti considerando anche il recente ritrovamento di (+)-taxifolina in oli di oliva spagnoli (Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005a).

**Lignani:** di recente identificazione sono rappresentati da (+)-1-acetossipinoresinolo, (+)-pinoresinolo, (+)-1-idrossipinoresinolo. Owen *et al.* (2000), hanno

dimostrato, per la prima volta, che questa classe, in particolare i primi due, sono i componenti maggiormente presenti nella frazione fenolica estratta dall'olio vergine di oliva. I lignani sono stati utilizzati con successo in studi di caratterizzazione varietale mediante la loro quantificazione in oli vergini spagnoli (Brenes *et al.*, 2002).

**Idrossi-isocromani:** sono una classe di composti fenolici recentemente isolata in diversi campioni di olio extra vergine di oliva (Bianco *et al.*, 2002) originatisi dalla condensazione tra idrossitirosole ed aldeidi quali vanillina e/o benzaldeide. Secondo numerosi autori le classi preponderanti nella frazione fenolica degli oli vergini di oliva sono i secoiridoidi e i lignani (70-95%) negli oli appena prodotti, mentre è stato osservato un aumento percentuale delle altre classi durante la conservazione, ciò probabilmente a causa di processi idrolitici a carico dei primi.

### » Il potere antiossidante dei composti fenolici dell'olio vergine di oliva

La frazione fenolica dell'olio vergine di oliva rappresenta quella maggiormente protettiva nei confronti del processo ossidativo. Però, non tutti i composti hanno evidenziato la stessa attività antiossidante. Ciò è importante alla luce dell'ampio numero di molecole, più di 30, identificate nell'olio vergine di oliva (Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005a). Tra i diversi composti è stata individuata una maggiore attività antiossidante per quelli dotati di due ossidril in posizione *orto*, in virtù di una maggiore capacità di delocalizzazione della forma radicalica. In un recente lavoro (Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005b) è stata valutata con diversi test antiossidanti la capacità antiradicalica esplicita dai singoli composti e, tra questi, l'idrossitirosole, la decarbossimetil-oleuropeina aglicone e l'oleuropeina aglicone sono risultati i più attivi. Non hanno mostrato tale capacità il tirosolo, la decarbossimetil-ligstroside aglicone, il ligstroside aglicone ed i lignani. Queste evidenze dimostrano quanto sia importante esprimere i contenuti dei singoli composti fenolici per fornire un possibile valore nutraceutico più correlato con la qualità dell'olio vergine di oliva.

### » Effetto sulla salute dei composti fenolici dell'olio vergine di oliva

In numerosi lavori ed in una recente review (Tuck *et al.*, 2002) sono stati riportati gli effetti dei composti fenolici dell'olio di oliva sulla salute umana, in particolare è stato enfatizzato il rapporto tra il consumo di olio vergine di oliva e la riduzione della genesi di forme tumorali nell'uomo. I composti più studiati sono risultati l'idrossitirosole e l'oleuropeina; mentre al primo è stata attribuita la capacità di inibire l'ossidazione delle LDL in vitro, nonchè di ridurre il rischio di malattie coronariche, aterosclerotiche e più in generale i processi ossidativi; al secondo ed i suoi derivati è stata riconosciuta da alcuni scienziati (Hamdi *et al.*, 2005) una capacità antitumorale con azione in diverse fasi del processo cancerogeno.

Oltre all'azione preventiva su varie patologie ora citate, del tutto recentemente è stata evidenziata una attività farmacologica di un derivato dell'oleuropeina aglicone, l'oleocantale, responsabile della sensazione pungente al gusto, simile a quella determinata dall'assunzione di soluzioni di un farmaco antinfiammatorio quale l'ibuprofene. Partendo da questa constatazione, alcuni ricercatori hanno messo in evidenza che, oltre a determinare questa sensazione, l'oleocantale e l'ibuprofene svolgono la medesima azione inibente e dose dipendente, sulle ciclossigenasi 1 e 2 (COX-1, COX-2) cioè una potente azione analgesica -antiinfiammatoria (Beauchamp *et al.*, 2005). Questo sarebbe dovuto al fatto che le ciclossigenasi COX-1 e COX-2 danno luogo alla produzione delle prostaglandine ed in particolare alle PGE2 con spiccata attività pro infiammatoria.

Tale riscontro fa ipotizzare come il consumo costante di olio vergine di oliva, e quindi di oleocantale, possa svolgere un'azione preventiva su alcune patologie infiammatorie; è stato dimostrato, inoltre, che i farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS), ed in particolare l'ibuprofene, se assunti per lungo periodo, a basse dosi, riducono il rischio dell'insorgenza di varie neoplasie (63% per i tumori del colon, 39% per quelli del seno, 36% per quelli dei polmoni, 39% per quelli della prostata, 73% per quelli dell'esofago, 62% per quelli dello stomaco, 47% per quelli delle ovaie).

COMPOSTO	SOSTITUENTI (P.M.)	STRUTTURA
Tirosolo ( <i>p</i> -idrossifeniletanolo)	R <sub>1</sub> -H (138)	
Idrossitirosolo (3,4-diidrossifeniletanolo)	R <sub>1</sub> -OH (154)	
Oleuropeina aglicone 3,4-DHPEA-EA	R <sub>1</sub> -OH (378)	
Ligstroside aglicone <i>p</i> -HPEA-EA	R <sub>1</sub> -H (362)	
Oleuropeina aglicone forma aldeidica	R <sub>1</sub> -OH (378)	
Ligstroside aglicone forma aldeidica Oleocantale	R <sub>1</sub> -H (362)	

STRUTTURA CHIMICA DEI SECOIRIDOIDI E DEI PRINCIPALI DERIVATI PRESENTI NELL'OLIO VERGINE DI OLIVA. SONO INDICATI: IL NOME DELLA MOLECOLA, I SOSTITUENTI ED IL RELATIVO PESO MOLECOLARE (PM).

(Harris *et al* 2005). I FANS infatti inibiscono le cicloossigenasi, le COX-1, le COX-2 e, a livello del sistema nervoso centrale, le COX-3, determinando il blocco della cascata che dall'acido arachidonico porta alle prostaglandine ed in particolare alle PGE2.

Qualcuno potrebbe obiettare, come hanno rilevato gli autori dello studio, che la quantità di oleocantale presente in 50 g di olio extravergine di oliva corrisponde alla decima parte della dose raccomandata per un adulto per ottenere un effetto terapeutico simil ibuprofene sul dolore (Beauchamp *et al*, 2005). Va però rilevato, ad esempio, che dosi inferiori ai 100 mg/die di aspirina, inizialmente ritenute non terapeutiche, sono risultate efficaci, come antiaggregante piastrinico in quanto bloccano le cicloossigenasi all'interno di queste, nella prevenzione di alcune patologie cardiovascolari (Voltolini 2005).

## BIBLIOGRAFIA

- Andrewes P., Busch. J. L. H. C., De Joode T., Groenewegen A., Alexandre H.: Sensory Properties of Virgin Olive Oil Polyphenols: Identification of Deacetoxy-ligstroside Aglycon as a Key Contributor to Pungency. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, 1415-1420.
- Beauchamp G. K., Keast R. S. J., Morel D., Lin J., Pika J., Han Q., Lee C.-H., Smith A. B., Breslin P. A. S. Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature*, 2005, 437, 45-46.
- Bianco A. D., Muzzalupo L., Romeo G., Scarpati M. L., Soriero A., Uccella N. Microcomponents of olive oil-III. Glucosides of 2(3,4-dihydroxy-phenyl) ethanol. *Food Chem.*, 1998, 63, 461-464.
- Bianco A., Coccioli F., Guiso M., Marra C. The occurrence in olive oil of a new class of phenolic compounds: hydroxy-isochromans. *Food Chem.*, 2002, 77, 405-411.
- Brenes M., Garcia A., Rios J.J., Garcia P., Garrido A.: Use of 1-acetoxypinoresinol to authenticate Picual olive oils. *Int. J. Food Sci. Tech.*, 2002, 37, 615-625.

Canzoneri F., *Gazz. Chim. Ital.* 1906, 36, 372.

Carrasco-Pancorbo A., Cerretani L., Bendini A., Segura-Carretero A., Gallina Toschi T., Fernández-Gutiérrez A. Analytical determination of polyphenols in olive oils. *J. Sep. Sci.*, 2005a, 28, 837-858.

Carrasco-Pancorbo A., Cerretani L., Bendini A., Segura-Carretero A., Del Carlo M., Gallina-Toschi T., Lercker G., Compagnone D., Fernández-Gutiérrez A. Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.*, 2005b, 53, 8918-8925.

Gutiérrez-Rosales F., Rios J. J., Gómez-Rey Ma. L.: Main Polyphenols in the Bitter Taste of Virgin Olive Oil. Structural Confirmation by On-Line High Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, 6021-6025.

Hamdi H.K., Castellon R. Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 2005, 334, 769-778.

Harris R.E., Beebe-Donk J., Doss H., Burr Doss D. Aspirin, ibuprofen, and other non-steroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention: a critical review of non-selective COX-2 blockade. *Oncol. Rep.* 2005, 13, 559-583.

Owen R. W., Mier W., Giacosa A., Hull W. E., Spiegelhalder B., Bartsch H.: Identification of Lignans as Major Components in the Phenolic Fraction of Olive Oil. *Clin. Chem.*, 2000, 46, 7, 976-988.

Servili M., Montedoro G. Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2002, 104, 602-613.

Tuck K.L., Hayball P.J. Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *J. Nutr. Biochem.*, 2002, 13, 636-644.

Voltolini G. "Un'aspirina al giorno toglie il medico di turno" ovvero la seconda giovinezza dell'acido acetil salicilico (ASA). *Giorn. It. Mal. Tor.* 2005; 59: 169-171.