



Università della Calabria

***Dipartimento di Farmacia e Scienze
della Salute e della Nutrizione***

***Relazione Scientifica sugli aspetti qualitativi e salutistici
(valutazione in vitro) dell'Olio Extra Vergine di Oliva
"Exelien Biologico"***

***Prodotto da BioXFarm -Azienda Agricola Domenico Scervino,
C. da Ciuranà Torretta di Crucoli, 88812 Pr. KR***

***Responsabile
Prof.ssa Monica Rosa Loizzo
Professore di Scienze e Tecnologie Alimentari***



LOIZZO MONICA
ROSA
04.08.2022 08:13:59
GMT+01:00

INTRODUZIONE

Oggi, molti studi confermano che la Dieta Mediterranea è uno strumento fondamentale per il mantenimento di un buono stato di salute. La dieta Mediterranea si basa su una piramide alimentare che aiuta a prevenire le principali malattie croniche, seguendo la giusta frequenza e alternanza di consumo degli alimenti. Nell'ambito di questa dieta l'olio extra vergine d'oliva (EVOO) rappresenta l'unico grasso di condimento quotidiano.

L'EVOO è fonte principale di lipidi, una riserva energetica fondamentale che l'organismo deve assumere dai cibi per compiere le maggiori funzioni. Ha virtù antiossidanti grazie alla vitamina E ed ai polifenoli che contrastano la formazione di radicali liberi nelle cellule del nostro organismo, rallentandone l'invecchiamento. In più, protegge l'organismo dal rischio di malattie croniche degenerative come quelle che interessano il cuore ed il Sistema Nervoso Centrale. Non meno importante l'EVOO migliora il metabolismo, è fonte preziosa di trigliceridi e impedisce l'aumento del colesterolo LDL (colesterolo cattivo) promuovendo l'aumento del colesterolo HDL (colesterolo buono).

Il confronto tra diete di Paesi appartenenti ad aree geografiche diverse mette in risalto come la Dieta Mediterranea, basata sull'uso dell'EVOO, sia la più salutare al mondo. La raccomandazione più diffusa è di non superare i tre cucchiaini di EVOO al giorno, per un totale di circa 40 grammi (400-600 calorie) e di prediligere questo condimento ad altri grassi alimentari in particolar modo durante particolari fasi della vita come, ad esempio, lo svezzamento e durante la terza età.

Recentemente l'EVOO, ed in particolare i suoi costituenti, hanno attirato l'interesse della comunità scientifica per le innumerevoli correlazioni positive tra consumo di EVOO e mantenimento di un buono stato di salute.

L'EVOO Exelien è stato sottoposto ad analisi per la valutazione dei parametri merceologici e anche per la valutazione del:

- contenuto in polifenoli totali;
- contenuto in flavonoidi totali;
- contenuto in carotenoidi totali;
- contenuto in vitamina E (α -tocoferolo)
- profilo in acidi grassi.

Successivamente si è proceduto alla valutazione *in vitro* delle proprietà salutistiche del fitocomplesso dell'olio ed in particolare si sono effettuati i test per la valutazione del potere:

- radical scavenging (metodica DPPH e ABTS)
- antiossidante (metodica beta-carotene bleaching test e FRAP test)
- di inibizione degli enzimi coinvolti nella digestione dei carboidrati (test per l'inibizione dell'alfa-amilasi e alfa-glucosidasi)
- di inibizione della lipasi pancreatica

CAMPIONAMENTO

Il giorno 27.07.2022 è stato effettuato il campionamento di n. 3 confezioni da 250 mL di EVOO Exelien biologico prodotto da BIOXFARM, campagna di raccolta 2021-2022 LOTTO 2903202201.

I campioni apparivano sigillati ed i confezionamenti integri. Si è quindi proceduto all'analisi del campione sulla base delle richieste dell'azienda Agricola Scervino, prelevando aliquote identiche da n. 3 confezioni diverse tutte appartenenti allo stesso lotto.

Il campione risulta una miscela di EVOO monovarietalì provenienti dalle cultivar calabresi Dolce di Rossano e Roggianella.

METODOLOGIE IMPIEGATE

Solventi e reagenti

Tutti i reagenti ed i solventi sono stati acquistati da Sigma-Aldrich Chemical Co. Ltd (Milano, Italia) e da VWR International (Milano, Italia) e a meno che non diversamente indicato tutto ciò che è stato usato è di grado analitico o superiore.

Determinazione dell'acidità organica

Questa analisi esprime la percentuale di acidi grassi liberi presente nel prodotto. Gli acidi liberi si riscontrano soltanto dopo l'estrazione dell'olio dal frutto, poiché all'interno del frutto sono legati e quindi neutri. Essi derivano come prodotto di alcune reazioni innescate da enzimi lipolitici, durante la maturazione del frutto o a causa di una cattiva conservazione del frutto stesso. Proprio per questo motivo l'analisi dell'acidità viene considerata come parametro per stabilire la qualità di un olio di oliva. La presenza elevata di questi acidi grassi liberi (superiori al 2 %) rende un olio non commestibile.

Dal punto di vista analitico si tratta di una titolazione acido-base secondo la metodica ufficiale (EU, 2016). Cinque grammi di sono stati pesati e disciolti in una soluzione 1:1 di etere dietilico ed alcool etilico assoluto, a cui sono state aggiunte 2 gocce di soluzione alcolica di fenoltaleina all'1%. La determinazione dell'acidità è stata effettuata mediante titolazione colorimetrica con una soluzione di idrossido di sodio 0,1 N fino a comparsa della colorazione rosa persistente. Dalla titolazione è stata ricavata l'acidità espressa in % di acido oleico.

Determinazione del numero di perossidi

Questa analisi esprime la quantità di ossigeno già assorbita dall'olio, il quale quindi ha già iniziato una propria attività ossidativa; tale attività, durante l'invecchiamento, porta ad un irrancidimento del prodotto che ne conferisce odori e sapori sgradevoli. Attraverso questa analisi possiamo quindi determinare il grado di ossidazione di un olio di oliva: più alto è il suo valore e più avanzato è lo stadio di irrancidimento del prodotto.

Dal punto di vista analitico si tratta di una titolazione redox secondo la metodica ufficiale (EU, 2016). Sono stati pesati 2 g e successivamente si è proceduto a solubilizzare in una soluzione 3:2 di acido acetico glaciale e cloroformio, a cui sono stati aggiunti circa 0,5 ml di soluzione satura di ioduro di potassio. Il campione è stato incubato al buio per 5 minuti, terminati i quali sono stati aggiunti circa 40 ml di acqua demineralizzata ed 1 ml di soluzione acquosa di salda d'amido 10 g/L. È stata effettuata la titolazione dello iodio liberato con una soluzione di tiosolfato di sodio 0,01 N. Il numero di perossidi è espresso in milliequivalenti di ossigeno attivo per kg di olio.

Analisi spettrofotometrica

L'analisi di un olio mediante spettrofotometria UV-visibile è effettuata correntemente per la valutazione della sua genuinità e per identificare eventuali adulterazioni. Questo tipo di analisi è espresso mediante dei coefficienti K che rappresentano l'assorbimento da parte dell'olio all'esposizione di luce ultravioletta in particolari condizioni (EU, 2016).

I doppi legami nell'olio vergine non sono mai vicini o coniugati. La presenza di doppi legami coniugati è dovuta all'azione ossidativa di alcuni reagenti impiegati fraudolentemente, che causa lo slittamento dei doppi legami. Questo slittamento comporta un assorbimento caratteristico all'ultravioletto attorno a 270 nm dove si ha un picco in presenza di olio rettificato (olio di sansa e semi) per la presenza di dieni formati per slittamento. Il coefficiente di estinzione molare alle lunghezze d'onda di 230 nm e 270 nm, indica lo stato ossidativo dell'olio, poiché si possono formare dieni e trieni coniugati durante l'ossidazione del prodotto. K₂₃₂ e K₂₇₀ sono stati determinati leggendo l'assorbanza a 232 e 270 nm in una cuvetta di quarzo da 10 mm utilizzando lo

spettrofotometro Jenway 6003 UV-Vis (Carlo Erba, Milano, Italia) di una soluzione all'1% di EVOO in isotano (EU, 2016).

Determinazione del profilo in acidi grassi

Gli acidi grassi presenti nel campione sono stati determinati a seguito della loro derivatizzazione a metil esteri secondo la procedura riportata da Leporini et al., (2018). Venti mg di campione sono stati addizionati a 2ml di KOH 5M in MeOH. La miscela è stata posta in incubazione a 90°C per 15 minuti. Trascorsi i 15 minuti, sono stati aggiunti 1,5ml di soluzione di BF₃/MeOH ed il tutto è stato lasciato ad incubare per altri 5 min. A seguito della separazione delle fasi su quella contenente i grassi sono stati addizionati 2ml di n-esano, ed il campione è stato centrifugato 10 minuti a 800 rpm. A centrifugazione ultimata, è stato prelevato 1ml di surnatante, contenente gli acidi grassi disciolti ed è stato inserito in una vials alla quale sono stati addizionati 100 µl di standard intero (methyl hercicosanoate) (1mg/ml). Gli estratti in n-esano così ottenuti sono stati sottoposti ad analisi tramite gas-cromatografia associata a spettrometria di massa (GC-MS), utilizzando un gas-cromatografo Hewlett-Packard corredato di colonna capillare non polare HP-5 (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm), associato ad uno spettrometro di massa Hewlett-Packard. La ionizzazione dei componenti del campione è stata eseguita in modalità impatto elettronico (EI, 70 eV). Le analisi sono state realizzate con la seguente programmata di temperatura: isoterma a 60 °C per 5 minuti, aumento della temperatura da 60 a 280 °C di 14 °C al minuto, infine isoterma a 280 °C per 15 minuti. Come gas di trasporto è stato utilizzato elio. Le temperature di iniettore e rivelatore sono rispettivamente 250 e 280 °C. L'identificazione dei composti si è basata sul confronto dei dati spettrali di massa con la libreria Wiley138 e facendo riferimento ai dati spettrali dei composti noti in letteratura. Gli acidi grassi sono stati quantificati impiegando un sistema cromatografo Shimadzu GC17A gas, dotato di colonna capillare SE-54 (30 m con un diametro interno di 0.25 mm e uno spessore del film di 0.25 µm). Come gas di trasporto è stato utilizzato l'azoto. Le temperature e le condizioni sono le medesime di quelle descritte per le analisi in GC-MS. I FAME (fatty acid methyl esters) sono stati identificati dal confronto dei tempi di ritenzione tra il mix di standard FAME contenente da C10 a C22.

Determinazione del contenuto in α-tocoferolo (vitamina E)

Per l'identificazione e la quantificazione del α-tocoferolo, i campioni di olio sono stati estratti seguendo il metodo descritto da Bakre et al. (2015). Dopo la preparazione degli oli, il campione è stato iniettato in cromatografia liquida ad altissime prestazioni (UHPLC) per determinare l'alfa tocoferolo. Pertanto, 5 µL sono stati iniettati nell'UHPLC PLATINblue (Knauer, Germania) dotato di un sistema di pompa binaria utilizzando una colonna Knauer C18 (1,8 µm, 150 × 3 mm) accoppiata con un rivelatore di fluorescenza Shimadzu RF-20Axs. Come eluizione isocratica sono stati usati metanolo e acetonitrile (1:1) con una portata di 4 mL/min. La colonna analitica è stata mantenuta a 30°C e il rivelatore di fluorescenza è stato impostato su una lunghezza d'onda di eccitazione di 295 nm e una lunghezza d'onda di emissione di 325 nm. Il metanolo al 100% è stato impiegato come fase mobile, in un sistema isocratico (flusso: 1,0 mL/min; lunghezza d'onda: 292 nm). L'alfa tocoferolo è stato identificato e quantificato rispetto allo standard esterno ei cromatogrammi elaborati tramite il software Clarity 6.2.

Estrazione della frazione insaponificabile dell'olio extravergine di oliva

Cinque g di campione di olio sono stati addizionati di 2 mL di metanolo:acqua (70:30) e successivamente di 2 mL di n-esano, la miscela è stata agitata al vortex per circa 1 minuto secondo la metodica descritta da Montedoro et al. (1992).

La fase idroalcolica è stata separata dalla fase oleosa attraverso centrifugazione a 6000 rpm per 10 minuti a 4°C. La frazione idrofilica è stata recuperata all'interno di una provetta, e nuovamente centrifugata a 13000 rpm, al fine di eliminare eventuali tracce di olio. L'estratto insaponificabile

così ottenuto è stato utilizzato per le successive analisi in termini di contenuto in composti bioattivi e determinazione delle attività salutistiche *in vitro*.

Determinazione dei polifenoli totali, dei flavonoidi totali, dei carotenoidi totali e dei tocoferoli totali

Il contenuto totale in fenoli (TPC) ed il contenuto totale di carotenoidi (TCC) è stato determinato seguendo la procedura precedentemente riportata (Gao et al., 2000). Per valutare il contenuto di TPC, il campione è stato miscelato con il reagente Folin-Ciocalteu, carbonato di sodio e acqua e lasciato incubare a 25°C. Dopo 2 ore l'assorbanza è stata letta a 765 nm utilizzando uno spettrofotometro UV-Vis Jenway 6003 (Carlo Erba, Milano, Italia). I risultati sono stati espressi come mg equivalenti di acido gallico (GAE)/Kg di olio. Per i TCC 1 ml dell'estratto (0,1 g/mL) è stato miscelato con 0,5 ml di NaCl al 5% e centrifugato per 10 minuti a 4500 rpm. Il supernatante così ottenuto (100 µL) è stato diluito con 0,9 mL di n-esano e misurato a 460 nm. I risultati sono stati espressi come mg equivalenti di β -carotene (β C)/Kg di olio. La determinazione spettrofotometrica del contenuto totale di flavonoidi (TFC) è stata effettuata seguendo la procedura riportata da Yoo et al. (2008). Il campione e il cloruro di alluminio sono stati miscelati in un rapporto 1:1. Dopo 15 minuti di incubazione a temperatura ambiente, l'assorbanza è stata misurata a 510 nm. I risultati sono espressi come mg equivalenti di quercetina (QE)/Kg di olio.

Determinazione dell'attività antiossidante

Le sostanze antiossidanti rappresentano uno dei più importanti meccanismi di difesa contro lo stress ossidativo, oggi riconosciuto come *primum movens* dell'insorgenza di numerose patologie cronico degenerative e del cancro. Molteplici studi effettuati su alimenti ad elevato contenuto di sostanze antiossidanti, dimostrano che aumentare l'assunzione di tali sostanze con la dieta è di grande importanza per mantenere uno stato di buona salute (Antolovich et al., 2002). Negli ultimi anni sta crescendo notevolmente l'interesse nei confronti delle caratteristiche, delle proprietà benefiche e dei meccanismi con cui queste sostanze antiossidanti agiscono a livello fisiologico. Per tale motivo è nata la necessità di disporre di metodi analitici *in vitro* per la rilevazione di tali molecole negli alimenti. I metodi usati in queste determinazioni sono basati o su una reazione di trasferimento elettronico, come nel caso del FRAP, o su una reazione di trasferimento di un atomo di idrogeno tra un ossidante e un radicale libero, come l'ABTS e il DPPH. Il campione Exelien è stato analizzato anche per la sua capacità di protezione dalla perossidazione lipidica attraverso il β -carotene bleaching test.

DPPH test

Il principio di questo metodo è l'inibizione del radicale stabile 2,2-difenil- 1picrilidrazil (DPPH). Il DPPH, che è uno dei radicali liberi più stabili e di facile utilizzo, viene solitamente usato per testare la capacità di alcuni composti di agire come scavenger (spazzino) di radicali liberi. Il DPPH è stabile grazie alla sua capacità di delocalizzare l'elettrone spaiato su tutta la molecola. La delocalizzazione dà luogo a un colore viola profondo (Loizzo, 2020), con massimo assorbimento a 517 nm, che varia da viola a giallo quando questo radicale estrae un atomo di idrogeno da un antiossidante scavenger, formando la forma ridotta DPPH-H. Questa reazione è quindi facilmente monitorabile spettrofotometricamente. La percentuale di decolorazione è proporzionale all'attività antiossidante degli estratti esaminati.

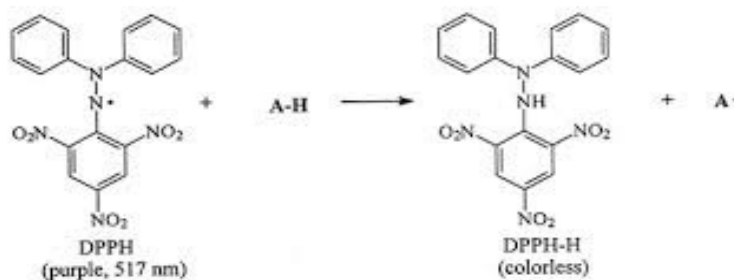


Figura 1. Struttura del DPPH prima e dopo la reazione con l'antiossidante (A-H)

Sono state testate diverse concentrazioni ottenute diluendo i campioni in metanolo. Si preparano cinque concentrazioni dell'estratto (5, 2.5, 1.25, 0.625 e 0.325 mg/mL). La lettura spettrofotometrica è stata effettuata ad una lunghezza d'onda di 492 nm utilizzando lo spettrofotometro Perkin Elmer Lambda 40 UV/VIS. L'attività antiossidante è stata calcolata come la % di inibizione del radicale DPPH. I risultati sono stati espressi come valori di IC₅₀.

ABTS test

L'attività antiossidante del campione è stata determinata attraverso il metodo spettrofotometrico di decolorazione dell'ABTS radical catione (Loizzo et al., 2021). Il metodo ABTS si basa sull'utilizzo del cromogeno 2,2 – azinobis (3ethylbenzothiazoline– 6 sulfonic acid) che, reagendo con potassio persolfato, genera un catione radicalico di colore blu/verde, mentre la sua forma neutra è incolore ed ha spettri di assorbimento massimo a 734 nm, in acqua. Questo saggio è basato sulla reazione degli antiossidanti con il radicale cationico ABTS•⁺ 2,2'-azinobis (3etilbenzotiazolin-6-sulfonato). Questo radicale può essere ridotto da un antiossidante, con conseguente perdita di assorbanza e di colore. Questo evento indica il potere antiossidante espresso come inibizione percentuale.

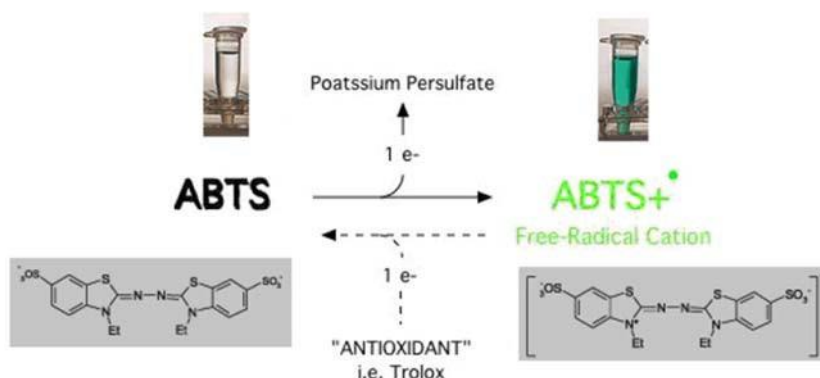


Figura 2. Reazione di formazione dell'ABTS^{•+}

La metodica dell'ABTS presenta un vantaggio rispetto al DPPH, poiché può essere utilizzata a diversi valori di pH e quindi prende in considerazione l'effetto del pH sull'attività antiossidante del campione esaminato. Il catione radicale ABTS (ABTS•⁺) viene preparato 12/16 ore prima dell'esperimento attraverso la reazione tra una soluzione di 2 mM di ABTS e una soluzione di persolfato di potassio 70 mM, tenuto al buio e a temperatura ambiente. La soluzione di ABTS

preparata viene diluita con metanolo fino a lettura spettrofotometrica con valori tra 0.70 e 0.73 nm. Per l'esecuzione del test si aggiungono in cuvetta 10 μ l di campione (opportunamente diluito) a 1 ml di soluzione di ABTS $\bullet^+$. Quindi si procede con la lettura allo spettrofotometro a 734 nm (Perkin Elmer Lambda 40 UV/VIS). Si può determinare in questo modo la percentuale di inibizione intesa come la percentuale di assorbanza persa dalla molecola a seguito dell'interazione con l'antiossidante. I risultati sono stati espressi come valori di IC₅₀.

β -carotene bleaching test

Questo metodo di valutazione dell'attività antiossidante è basato sull'ossidazione del β -carotene accoppiata a quella dell'acido linoleico. La tecnica consiste nella misurazione della decolorazione del β -carotene dovuta all'ossidazione causata dai prodotti di degradazione dell'acido linoleico per effetto della temperatura (Loizzo et al., 2022). A causa della temperatura (45°C), infatti, avviene l'ossidazione sul C13 dell'acido linoleico con formazione del radicale perossile. Questo radicale sarà responsabile della propagazione dell'ossidazione su altre molecole di acido linoleico o sulla molecola di β -carotene presente nella soluzione. La reazione con il β -carotene ne causerà la decolorazione.

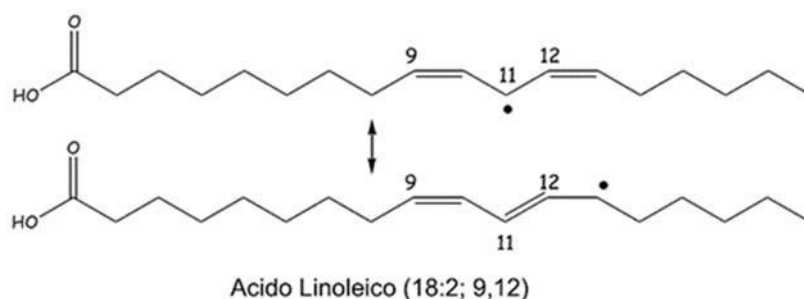


Figura 3. Reazione di formazione del radicale perossile.

L'aggiunta alla miscela di reazione (β -carotene + acido linoleico) di una sostanza antiossidante inibisce l'ossidazione del β -carotene (l'effetto visibile a livello macroscopico è la persistenza della caratteristica colorazione arancione) e mantiene costante nel tempo i valori di assorbanza. Nel saggio 1 ml di soluzione di β -carotene (0.2 mg/ml in cloroformio) sono stati aggiunti a 20 μ l di acido linoleico e 200 μ l di 100% Tween 20. La miscela è stata evaporata a 40 °C per 10 min utilizzando un evaporatore rotante per eliminare il cloroformio. La miscela è stata, quindi, diluita con 200 ml di acqua distillata. Cinque mL dell'emulsione sono trasferiti in differenti provette contenenti 200 μ l dei campioni da testare a diverse concentrazioni. Le provette vengono poi agitate e poste a 45 °C in un bagno di acqua per 60 minuti. L'assorbanza dei campioni, dello standard e del controllo, viene misurata a 470 nm usando uno spettrofotometro Perkin Elmer Lambda 40 UV/VIS ad un tempo iniziale zero ($t = 0$) e successivamente a 60 minuti. I risultati sono stati espressi come valori di IC₅₀.

FRAP test

Il metodo FRAP è un sistema in grado di determinare la capacità antiossidante basato sulla reazione di trasferimento di un singolo elettrone. Questo saggio (Ferric Reducing Antioxidant Power) misura l'abilità degli antiossidanti a ridurre il complesso di ferro (III) con 2,4,6-tripiridil-s-triazina (Fe(III)-(TPTZ)₂)³⁺ al complesso ridotto di ferro (II) (Fe(II)-(TPTZ)₂) (Loizzo et al., 2022). Quando il ferro è complessato con il TPTZ (2, 4, 6 – tripyridyl – s – trizine) in una soluzione di sodio acetato a pH acido, la sua riduzione è evidente dal cambiamento di colorazione della soluzione che da ambra diventa blu.

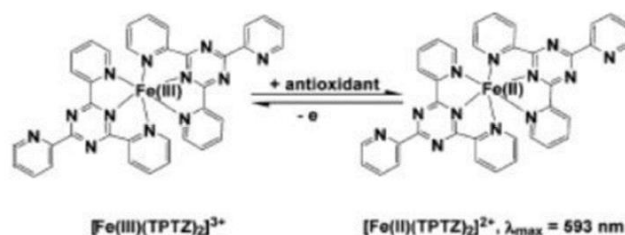


Figura 4. Sale ferrico derivato dal $\text{Fe(III)(TPTZ)}_2\text{Cl}_3$ (TPTZ = 2,4,6 – tripiridil – s – triazina) utilizzato come specie ossidante.

In breve, il reagente FRAP contiene 2,5 ml di soluzione TPTZ 10mM in HCl 40 mM, 2,5 ml di FeCl_3 20 mM e 25 ml di tampone acetato 0,3 M (pH 3,6). L'estratto viene disciolto in metanolo alla concentrazione di 2,5 mg/mL. Un'aliquota di 0,2 mL di soluzione viene quindi mescolata con 1,8 ml di reagente FRAP e l'assorbimento della miscela di reazione viene misurata spettrofotometricamente (con Perkin Elmer Lambda 40 UV/VIS) a $\lambda = 593 \text{ nm}$. Come controllo positivo è stato usato il BHT. Per costruire la retta di calibrazione sono utilizzate diverse soluzioni a concentrazione nota di Fe (II). Tale retta servirà per quantizzare la capacità antiossidante del campione testato. I risultati saranno espressi in $\mu\text{MFe (II)/g}$.

Determinazione dell'attività ipoglicemizzante

Le sostanze ipoglicemicizzanti rappresentano una sorta di meccanismo di difesa contro lo sviluppo di patologie quali l'iperglicemia, prima ed il diabete mellito di tipo 2, poi, in quanto hanno la capacità di ridurre la concentrazione di glucosio nel sangue. L' α -amilasi è coinvolta nella digestione dei carboidrati. Questo enzima idrolizza i legami α -1,4-glucosidici mantenendo la configurazione del centro anomerico dello zucchero. Ciò permette l'assorbimento intestinale dei carboidrati alimentari con conseguente aumento della glicemia post-prandiale. Pertanto, l'inibizione della α -amilasi rappresenta una validata strategia per il controllo della glicemia postprandiale in soggetti con livelli glicemici elevati.

Anche l' α -glucosidasi è un enzima chiave nella digestione dei carboidrati. Esso catalizza l'idrolisi dei legami α -1,4-glucosidici con conseguente liberazione di glucosio. Gli inibitori dell' α -glucosidasi ne antagonizzano l'attività, ritardando così l'assorbimento intestinale dei carboidrati e rallentando il forte aumento post-prandiale dei livelli di zucchero nel sangue.

Per tali motivi, nasce la necessità di avere metodi analitici *in vitro* per la rivelazione di tali sostanze ipoglicemicizzanti negli alimenti (Tundis et al., 2010).

α -Amilasi test

L' α -amilasi un enzima appartenente alla classe delle idrolasi, che catalizza l'idrolisi dei legami interni α -1,4-glucosidici dell'amido. Sono state preparate una soluzione di amido, α -amilasi (EC 3.2.1.1) e reagente colorimetrico. Sia il controllo che l'estratto sono stati aggiunti alla soluzione di amido e lasciati reagire con l'enzima a temperatura ambiente per 5 minuti (Formoso et al., 2022). L'assorbanza è stata rilevata a 540 nm. In presenza di un inibitore dell' α -amilasi è osservabile una riduzione dei valori di assorbanza. I risultati sono stati espressi come valori di IC_{50} .

α -Glucosidasi test

L' α -glucosidasi è una delle glucosidasi situate nella membrana sulla superficie dell'orletto a spazzola delle cellule intestinali. Nella prova di inibizione dell' α -glucosidasi, sono state preparate una soluzione di maltosio, una soluzione α -glucosidasi (EC 3.2.1.20) e una soluzione di o-dianisidina (DIAN) (Formoso et al., 2022). Un mix di soluzione di maltosio, estratto ed

enzima sono stati lasciati in incubazione a 37°C per 30 minuti. Poi è stato aggiunto l'acido perclorico e la miscela è stata centrifuga. Il surnatante è stato raccolto e mescolato con DIAN e PGO e lasciato incubare a 37°C per 30 minuti. L'assorbanza è stata rilevata ad una lunghezza d'onda di 500 nm. I risultati sono stati espressi come valori di IC₅₀.

Attività ipolipidemica

Le sostanze con effetto ipolipidemico rappresentano uno dei più importanti meccanismi di difesa contro dislipidemie e obesità, sono infatti responsabili di un migliore controllo dei livelli lipidici nel sangue. La lipasi pancreatica è un enzima secreto dal pancreas, che catalizza la digestione dei lipidi alimentari, scindendo il legame estereo che lega i gruppi ossidrilici del glicerolo agli acidi grassi a lunga catena. Affinché i trigliceridi possano essere assorbiti dalla mucosa intestinale, devono essere convertiti dalla lipasi in monogliceridi e acidi grassi liberi. Pertanto, l'inibizione della lipasi, riduce la digestione e l'assorbimento dei grassi ingeriti portando a una riduzione dell'assorbimento calorico complessivo e infine a una riduzione dell'obesità. L'attività inibitoria della lipasi pancreatica è stata determinata con una microplate da 96 pozzetti, basata sulla procedura proposta da Formoso et al., (2022). Sono stati preparati il 4-nitrofenil-ottanoato (NPC), 5 mM di soluzione di dimetilsolfossido, una soluzione acquosa di lipasi pancreatica (1 mg/mL) e il tampone tris-HCl (pH 8,5). Sono stati aggiunti in ogni pozzetto 3 µL di ogni campione (da 20 a 2,5 mg/mL) con 6 µL di enzima, 6 µL di NPC e 279 di tampone. La miscela è stata incubata a 37° C per 30 minuti. L'assorbanza è stata misurata a 405 nm. I risultati sono stati espressi come valori di IC₅₀. Orlistat è stato usato come controllo positivo.

Analisi statistica dei dati

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in triplicato. I dati sono stati espressi come medie ± deviazione standard (S.D.). La concentrazione con inibizione del 50% (IC₅₀) è stata calcolata mediante regressione non lineare con l'uso di Prism Graph Pad Prism versione 4.0 per Windows (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). La curva dose-risposta è stata ottenuta tracciando l'inibizione percentuale rispetto alla concentrazione.

RISULTATI

L'analisi dei parametri merceologici come evidenziabile in **Tabella 1** dimostra che l'Exelien è classificabile come olio extra vergine di oliva di alta qualità secondo il Regolamento CEE 2568/91 e s.m.

Tabella 1. Parametri merceologici

	Acidità (%)	Numero dei Perossidi (meqO ₂ /kg)	K ₃₂₂	K ₂₇₀	ΔK
Exelien	0.25±0.04	7.61 ±0.3	2.12±0.16	0.10±0.08	0.00±0.00

Dati espressi come media ± deviazione standard (SD) (n=3).

Un olio extravergine prodotto da olive sane e raccolte al giusto livello di maturazione, utilizzando corrette tecniche di raccolta, trasformazione e conservazione, avrà generalmente una acidità molto bassa. Exelien presenta un valore di acidità di 0.25% (Tabella 1). Relativamente al numero dei perossidi il campione presenta un valore di 7.61 meqO₂/Kg. In un extravergine di alta qualità, ottenuto da olive sane e molite entro poche ore dalla raccolta con adeguate tecniche estrattive, tale valore può essere contenuto al di sotto di 10 meq O₂/kg. Tanto più basso è questo valore tanto meglio si conserverà il prodotto nel tempo (shelf-life) e si ritarderà la possibilità di comparsa del fenomeno di irrancidimento, che di fatto impatta sulle

caratteristiche qualitative del prodotto. Anche i parametri spettrofotometrici risultano in linea con un olio di elevata qualità.

Oggi per la valutazione della qualità degli oli extravergini di oliva assume particolare importanza sia il contenuto che il profilo delle sostanze fenoliche, poiché queste sono correlate alla stabilità e alle caratteristiche organolettiche e salutistiche del prodotto del prodotto. L’olio extravergine di oliva è ricco di composti a struttura fenolica (antiossidanti) che lo differenziano completamente da tutti gli altri oli commestibili. Negli ultimi anni è stato accertato che tale frazione apporta il maggiore contributo alla stabilità ossidativa nell’olio extra vergine di oliva aumentando la sua shelf-life.

La principale azione dei componenti fenolici è quella di bloccare, a livello iniziale, il processo di autossidazione, ma studi recenti hanno dimostrato anche il loro insostituibile contributo alla diminuzione dell’incidenza di malattie cardio-vascolari e nella manifestazione di alcuni tipi di carcinomi nelle popolazioni che consumano abitualmente olio extra vergine di oliva (funzioni nutraceutiche) (Foscolou et al., 2018). Non meno importante è il contributo fornito dai polifenoli nella formazione del gusto tipico dell’olio extravergine di oliva (sensazioni gustative), in riferimento alle note sensoriali di amaro e piccante. L’EVOO Exelien presenta un elevato tenore in composti bioattivi con valore di TPC pari a 708.87 mg Equivalenti di Acido Gallico (GAE) /Kg, di TFC 242.60 mg Equivalenti di Quercetina (QE)/kg e di TCC pari a 5.66 mg β -carotene (β C)/kg (Tabella 2).

Tabella 2. Contenuto in composti bioattivi

	TPC (mg GAE/kg)	TFC (mg QE/kg)	TCC (mg β C/kg)	TTC (mg/kg)	α -Tocoferolo (mg/100 mL)
EVOO Exelien	708.87±23.61	242.60 ±12.91	5.66±0.09	272.38 ± 1.70	22.70 ± 0.64

TPC: Contenuto fenolico totale; TFC: Contenuto in flavonoidi totale; TCC: Contenuto in carotenoidi totale. Dati espressi come media $\pm$ deviazione standard (SD) (n=3).

Dalla comparazione con la letteratura scientifica a disposizione emerge che l’Exelien presenta un valore di TPC e TFC più elevato rispetto a EVOO competitor provenienti dalla stessa area geografica e non solo (Loizzo et al., 2022; 2021; Piscopo et al., 2021).

I tocoferoli dell’olio extra vergine di oliva sono costituiti in prevalenza dall’ α -tocoferolo che rappresenta circa il 90% dei tocoferoli totali e da quantità minori di β - e γ -tocoferolo e δ -tocoferolo. L’EVOO Exelien presenta un valore di tocoferoli totali pari a 272.38 mg/Kg e di α -tocoferolo pari a 22.70 mg/100 mL (Figura 5), paragonabile ad altri oli estratti da cultivar calabresi e superiore ad oli di differente provenienza geografica come, ad esempio, gli EVOO prodotti in Spagna e Grecia (Loizzo et al., 2022; 2021; Piscopo et al., 2021).

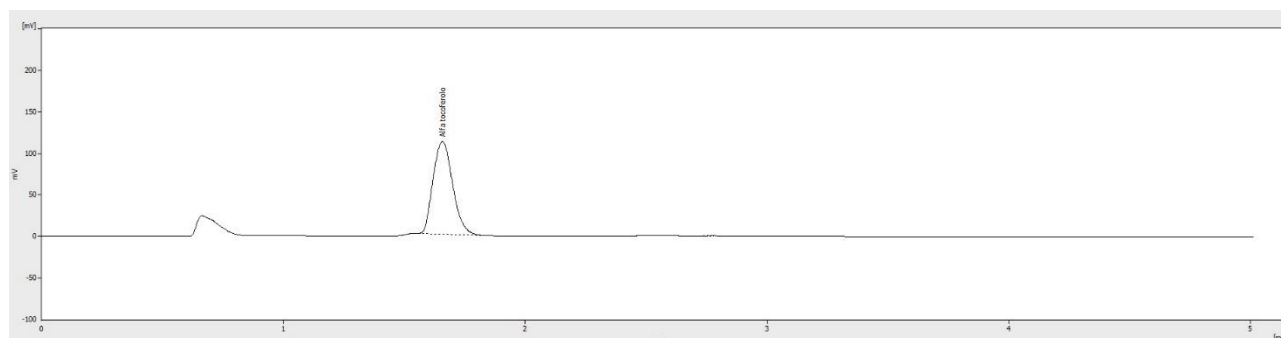


Figura 5. Analisi UHPLC per la quantificazione dell’ α -tocoferolo

La vitamina E oltre ad essere un composto dotato di una importante attività antiossidante agisce anche come vasodilatatore e contribuisce ad aumentare i livelli di colesterolo HDL (colesterolo buono) nel sangue. Per questo motivo l' α -tocoferolo previene la comparsa di placche aterosclerotiche alla base dell'insorgenza delle patologie cardiovascolari. Inoltre, questa vitamina è necessaria per consentire l'assorbimento di altri micro-nutrienti tra cui la vitamina A e C e le vitamine del gruppo B. La "European Food Safety Authority" ha fissato i livelli di assunzione di riferimento per la popolazione con età superiore a 10 anni, rispettivamente a 11 e 13 mg/die. Il Population Reference Intake (PRI) per la gravidanza è di 11 mg/die, così come per l'allattamento. Per i bambini di età compresa tra 1 e 9 anni, il PRI è compreso tra 6 e 9 mg/die. Questi PRI sono inferiori alle RDA statunitensi.

Questo indica che circa 40 g di EVOO Exelien soddisfano il fabbisogno giornaliero di vitamina E.

L'importanza di concentrarsi più sulla qualità dei grassi assunti con la dieta che sulla quantità totale dei grassi stessi emerge con chiarezza dai più recenti studi sugli effetti dei differenti acidi grassi alimentari sulla salute umana (Visioli et al., 2022). La letteratura scientifica suggerisce che una dieta ben bilanciata dovrebbe apportare una quantità di omega-6:omega-3 che soddisfi il rapporto di circa 4:1/5:1, tutto ciò per garantire una adeguata prevenzione dei fattori di rischio per l'insorgenza di patologie cronico-degenerative con particolare riferimento a quelle cardiovascolari. Dall'analisi del profilo in acidi grassi (Tabella 3, Figura 6) emerge che l'Exelien è dominato dall'acido oleico (73.80%) seguito dall'acido palmitico (12.1%) e dall'acido linoleico (7.9%). Valori di 0.7% sono stati quantificati relativamente all'acido grasso α -linolenico (omega-3) al quale sono attribuite importanti funzioni salutistiche con particolare riferimento alla prevenzione di patologie cronico degenerative a carico dell'apparato cardiovascolare e nervoso. In generale, l'EVOO Exelien presenta una percentuale di acidi grassi insaturi rispetto al totale pari all'83.52% con una percentuale di PUFA pari a 8.6%. L'acido oleico (omega-9) è noto in letteratura scientifica per i suoi effetti benefici sul sistema cardiovascolare nello specifico, agendo da antiossidante e riducendo il livello di colesterolo LDL nel sangue. Sulla base di queste proprietà L'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA), ha autorizzato l'impiego di prodotti a base di tale acido con l'indicazione: "la sostituzione di grassi saturi nella dieta con grassi insaturi come l'acido oleico contribuisce al mantenimento dei normali livelli di colesterolo nel sangue". Non meno importante gli oli ricchi di acido oleico, come ad esempio l'EVOO risultano più resistenti alle alte temperature raggiunte in fase di cottura, e pertanto più stabili. Infatti, tali oli sviluppano una quantità inferiore di composti nocivi per la salute da qui l'indicazione per l'utilizzi dell'EVOO anche per la cottura

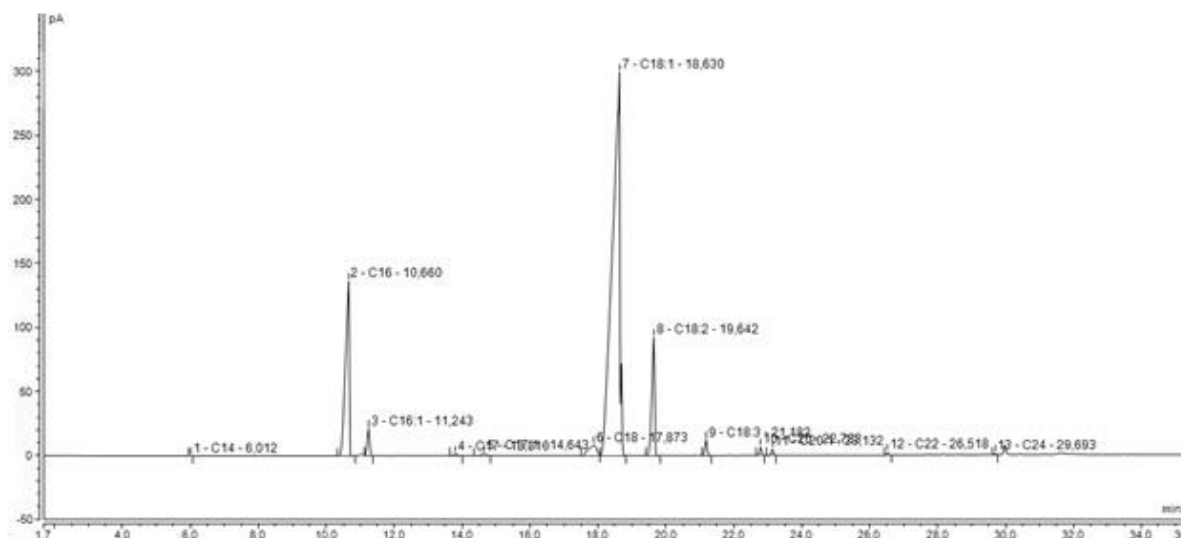


Figura 6. Analisi gas-cromatografica del profilo degli acidi grassi dell'EVOO Exelien

Tabella 3. Profilo in acidi grassi di EVOO Exelien

<i>Acidi grassi</i>	<i>EVOO Exelien (%)</i>
Acido miristico (C14:0)	0.01 ± 0.00
Acido palmitico (PA, C16:0)	12.1 ± 2.2
Acido palmitoleico (C16:1)	0.8 ± 0.1
Acido margarico (C17:0)	0.03 ± 0.00
Acido eptadecenoico (C17:1)	0.04 ± 0.00
Acido stearico (SA, C18:0)	2.4 ± 0.4
Acido oleico (OA, C18:1)	73.80 ± 6.2
Acido linoleico (LA, C18:2)	7.90 ± 0.7
Acido α-linolenico (ALA, C18:3)	0.70 ± 0.02
Acido arachidico (C20:0)	0.34 ± 0.03
Acido aadoleico (C20:1)	0.30 ± 0.01
Acido beenico (C22:0)	0.10 ± 0.01
OA/LA	9.34
ΣSFA	14.98
ΣMUFA	74.94
ΣPUFA	8.6
MUFA/PUFA	8.71

Dati espressi come media ± deviazione standard (SD), (n= 3).

Relativamente all'attività antiossidante l'Exelien ha mostrato attività radical scavenging con valori di IC₅₀ di 26.3 e 29.2 µg/mL nell'ABTS e DPPH, rispettivamente (Tabella 4). Tali valori risultano particolarmente interessanti poiché attribuiscono ai *phytochemical* presenti nell'estratto ottenuto dall'EVOO Exelien (fenoli, flavonoidi, carotenoidi e tocoferoli) attività *radical scavenging* in grado di trasformare i radicali dell'ossigeno in composti non radicalici, privi di reattività e quindi di potenziale pericolosità per la salute. La presenza di strutture o-difenoliche o fenoliche come nei principali composti identificati nell'EVOO (tirosolo e idrossitirosolo) conferisce a questi composti, la proprietà naturale di radical scavenger con capacità uguali o maggiori alla vitamina C, E ed al BHT (spesso utilizzato come conservante nelle preparazioni alimentari) (Visioli et al., 2011). L'EVOO Exelien ha anche capacità di proteggere un modello di bilayer lipidico utilizzato in laboratorio per mimare la membrana cellulare dalla perossidazione indotta da ossidanti, con un valore di IC₅₀ di 56.3 µg/mL. Il fitocomplesso di Exelien esercita una capacità di riduzione del ferro paragonabile al controllo positivo BHT con un valore di FRAP di 90.6 µM Fe(II)/g. Questo elemento, in forma ridotta, può partecipare, insieme all'ossigeno, alla generazione dei radicali liberi che come precedentemente accennato hanno capacità di indurre ossidazione, processo alla base della generazione e progressione di numerose patologie (Gutteridge, 1989).

Tabella 4. Attività antiossidante

<i>Campione</i>	<i>DPPH</i> (IC ₅₀ µg/mL)	<i>ABTS</i> (IC ₅₀ µg/mL)	<i>β-carotene bleaching</i> <i>test</i> (IC ₅₀ µg/mL)	<i>FRAP</i> (µM Fe(II)/g)
EVOO Exelien	29.2 ± 2.6***	26.3 ± 1.8***	56.3 ± 1.6***	90.6 ± 2.8 ^{ns}
<i>Controllo positivo</i>				
Ascorbic acid	5.0 ± 0.8	1.71 ± 0.03		
Propyl gallate			1.00 ± 0.01	
BHT				63.0 ± 4.1

I dati sono espressi come medie ± deviazioe standard (SD), (n= 3). Le differenze all'interno e tra i gruppi sono state valutate mediante ANOVA seguito dal test di Dunnett a confronto multiplo: ****p < 0.001, ns: non significativo rispetto al controllo positivo.

Per quanto riguarda i test *in vitro* sugli enzimi coinvolti nella metabolizzazione di carboidrati e dei lipidi si può affermare che il campione ha mostrato una attività inibitoria sugli enzimi metabolici di tipo concentrazione-dipendente. In particolare, l'estratto insaponificabile dell'Exelien risulta in grado di inibire gli enzimi coinvolti nella scissione dei carboidrati con valori di IC₅₀ di 62.2 e 71.5 µg/mL rispettivamente per α-amilasi e α-glucosidasi. In particolare, l'attività sull'enzima α-amilasi risulta paragonabile all'acarbosio utilizzato come farmaco per il trattamento dell'iperglicemia e del pre-diabete.

Tabella 5. Attività ipoglicemizzante ed ipolipidemizzante *in vitro*

<i>Campione</i>	<i>α-Amilasi</i> (IC ₅₀ µg/mL)	<i>α-Glucosidasi</i> (IC ₅₀ µg/mL)	<i>Lipasi</i> (IC ₅₀ µg/mL)
EVOO Exelien	62.2 ± 2.5 ^{ns}	71.5 ± 3.8 ^{***}	48.5 ± 3.6 ^{ns}
<i>Controllo positivo</i>			
Acarbosio	50.2 ± 1.8	35.6 ± 1.3	
Orlistat			37.4 ± 1.1

I dati sono espressi come medie ± deviazioe standard (SD), (n= 3). Le differenze all'interno e tra i gruppi sono state valutate mediante ANOVA seguito dal test di Dunnett a confronto multiplo: ****p* < 0.001, ns: non significativo rispetto al controllo positivo.

Per quanto concerne l'attività inibitoria sulla lipasi pancreatica, il test *in vitro* evidenzia un valore di IC₅₀ di 48.5 µg/mL, valore di poco superiore rispetto al controllo positivo Orlistat, utilizzato correntemente in terapia. La lipasi pancreatica è un enzima coinvolto nella digestione dei lipidi. Questo enzima, infatti, agisce nel tratto gastrointestinale scindendo i trigliceridi in acidi grassi liberi assorbibili. Una sua inibizione si traduce quindi in una riduzione dell'assorbimento dei grassi ingeriti con effetto ipolipidemico.

CONCLUSIONI/CONCLUSION

Italiano

In conclusione, dalle analisi effettuate si evidenzia che l'EVOO Exelien Biologico è un olio extra vergine di oliva di qualità ai sensi del Regolamento CEE 2568/91 e s.m. Il campione presenta un elevato contenuto in composti bioattivi tra cui si segnalano i polifenoli ed i flavonoidi a cui sono attribuiti ruoli fondamentali nella prevenzione di patologie cronico degenerative. Significativo anche il contenuto in α-tocoferolo ed in PUFA omega-3.

L'Exelien ha mostrato, attraverso test *in vitro*, promettenti attività nutraceutiche in termini di attività antiossidante, inibitoria degli enzimi deputati alla scissione degli zuccheri e all'assorbimento dei grassi.

Tutto ciò conferma, ulteriormente, il beneficio che il consumatore può trarre dal consumo dell'olio extra vergine di oliva ed in particolare da un olio extra vergine di oliva di qualità come risulta essere l'Exelien biologico durante tutta la sua vita ed in particolare nelle fasi cruciali dello svezzamento e della terza età.

English

In conclusion, from the analysis it must be highlighted that organic "Exelien" is an Extra Virgin Olive oil according to the EEC Regulation 2568/91 and subsequent amendments. The

oil was characterized by a high content of bioactive compounds including polyphenols and flavonoids which are attributed fundamental roles in the prevention of chronic degenerative diseases with references to cardiovascular and central nervous system diseases. Moreover, it contains also high level of alpha-tocopherol and omega-3 PUFA fatty acids.

In vitro test confirmed that Exelien extra virgin olive oil possesses promising nutraceutical properties in terms of antioxidant activity and inhibition of the enzymes responsible for the splitting of sugars and the absorption of fats.

All this confirms, the benefit that the consumer can derive from extra virgin olive oil and particularly from a quality extra virgin olive oil such as Exelien throughout its life and crucial phases such as weaning and old age.

Riferimenti bibliografici

- Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst*; 127 (1), 183–198.
- Bakre SM, Gadmale DK, Toche RB, Gaikwad VB. (2015). Rapid determination of alpha tocopherol in olive oil adulterated with sunflower oil by reversed phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Food Science Technology* 52, 3093-3098.
- EU, (2016) Consolidated Text on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis. 01991R2568 — IT — 04.12.2016 — 031.005.
- Formoso P, Tundis R, Pellegrino MC, Leporini M, Sicari V, Romeo R, Gervasi L, Corrente GA, Beneduci A, Loizzo MR (2022). Preparation, characterization, and bioactivity of *Zingiber officinale* Roscoe powder-based Pickering emulsions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, <https://doi.org/10.1002/jsfa.12022>
- Foscolou A, Critselis E, Panagiotakos D. (2018). Olive oil consumption and human health: A narrative review. *Maturitas*. 118, 60–66.
- Gao X, Ohlander M, Jeppsson N, Björk L, Trajkovski V. (2000). Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1485-1490.
- Gutteridge J.M.C. (1989). Antioxidant properties of the proteins caeruloplasmin, albumin and transferrin: a study of their activity in serum and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Biochimica et Biophysica Acta*; 869, 119-127.
- Leporini, Maria & Loizzo, Monica & Tenuta, Maria & Falco, Tiziana & Vincenzo, Sicari & Pellicanò, Teresa & Tundis, Rosa. (2018). Calabrian extra-virgin olive oil from Frantoio cultivar: Chemical composition and health properties. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 30, 631-637.
- Loizzo MR, Bonesi M, Falco T, Leporini M, Pagliuso M, Sicari V, Tundis R. (2021). Carolea olive oil enriched with an infusion of *Capsicum annuum* and *C. chinense* dried pepper powders to produce an added value flavoured olive oils. *Journal of Food Processing and Preservation* 45, e15776.
- Loizzo MR, Sicari V, Spizzirri, UG, Romeo R, Tundis R, Mincione A, Nicoletta FP, Restuccia D. (2022). Evaluation of Selected Quality Parameters of “Agrostigna” Monovarietal Extra Virgin Olive Oil and Its Apple Vinegar-Based Dressing during Storage. *Foods*, 11, 1113.
- Magalhaes L. M; Segundo M. A; Reis S; Lima J.L.F.C (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*; 613(1), 1-19.
- Montedoro GF, Servili M, Baldioli M, Miniati E. (1992). Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative compounds and semiquantitative evaluation by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 1571-1576.
- Piscopo A, De Bruno A, Zappia A, Ventre C, Poiana M. (2016). Characterization of monovarietal olive oils obtained from mills of Calabria region (Southern Italy). *Food Chemistry*, 213.
- Piscopo A, Mafrica R, De Bruno A, Romeo R, Santacaterina S, Poiana M. (2021). Characterization of Olive Oils Obtained from Minor Accessions in Calabria (Southern Italy). *Foods*. 10(2):305.
- Tsujita T; Shintani T; Sato H. (2013). α -Amylase Inhibitory Activity from Nut Seed Skin Polyphenols. Purification and Characterization of Almond Seed Skin Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 61, 4570–4576.
- Tundis R, Loizzo MR, Menichini F. (2010). Natural products as alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. *Mini Rev Med Chem*. 10, 315-31.
- Visioli F, Bernardini E. (2011). Extra virgin olive oil's polyphenols: biological activities. *Curr Pharm Des*. 17, 786-804.
- Visioli F, Agostoni C. (2022). Omega 3 Fatty Acids and Health: The Little We Know after All These Years. *Nutrients*. 14(2):239.
- Yoo, K.M., Lee, C.H., Lee, H., Moon, B.K., & Lee, C.Y. (2008). Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry*, 106, 929-936.