

***Analytical solutions addressing olive oil  
authentication issues***

***Soluzioni analitiche rivolte alla possibile risoluzione  
di problemi di autenticità***

# OLIVE OIL MIXTURES. PART ONE: DECISIONAL TREES OR HOW TO VERIFY THE OLIVE OIL PERCENTAGE IN DECLARED BLENDS

Raquel B. GÓMEZ-COCA<sup>a,✉</sup>, María del Carmen PEREZ-CAMINO<sup>a</sup>, José M. MARTÍNEZ-RIVAS<sup>a</sup>, Alessandra BENDINI<sup>b</sup>, Tullia GALLINA TOSCHI<sup>b</sup>, Wenceslao MOREDA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Instituto de la Grasa (CSIC), Campus Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, Spain; <sup>b</sup>Department of Agricultural and Food Sciences, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Bologna, Italy

✉Corresponding Author: Ctra. Utrera km 1, 41013 Sevilla, Spain. Phone: +34954611550, E-mail address: raquel.coca@ig.csic.es

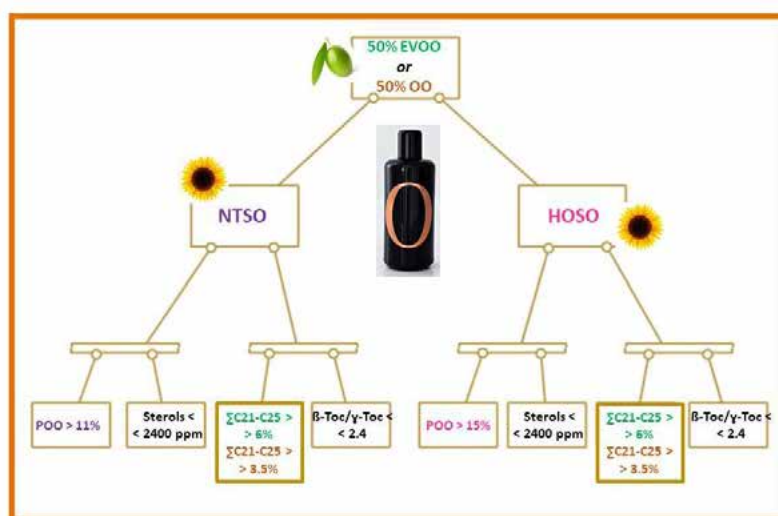
## INTRODUCTION

The commercialization of legal blends consisting of olive oil and other vegetable oils is possible thanks to the authorization of the European Commission according to which it is allowed not only to market those mixtures but also to highlight the presence of olive oil on the labelling, and not just on the ingredient list. However, in such case olive oil must account for at least 50% of the blend [1]. This last requirement evidenced a major issue: The lack of analytical methods to control that percentage. Furthermore, bibliography on this matter is scarce. Thus, it is the purpose of the present work to design an analytical strategy to confirm if the amount of olive oil in a label-claimed blend is at least 50%. In order to do this, both extra virgin olive oil and olive oil mixed with two of the most representative seed oils, as normal type and high oleic sunflower oils, were used. It is possible to claim that there is actually no need of developing new methods of analysis, but that it would be enough if one combines properly information obtained applying some of the analytical methods already in use and/or requested by the legislation for purity control [2].

## RESULTS

In this work it is recommended the use of decisional trees (see Figure) to check if the percentage of olive oil in declared blends reaches at least 50%.

This approach relies on the determination of those compositional parameters in which the greatest differences between olive and seed oils are shown: triacylglycerols, acyclic saturated hydrocarbons, free sterols, and tocopherols. In this way, to guarantee the presence of (extra virgin) olive oil at 50% the following conditions should be satisfied: i) palmitidolein above 11-15%; ii) the  $\beta/\gamma$ -tocopherol ratio below 2.4; iii) the alkane sum C21-C25 higher than 3.5-6%; iv) the total sterol content not surpassing 2400 mg/kg.



**Figure** - Decision tree of olive oil (OO) and extra virgin olive oil (EVOO) with normal type or high oleic oils (NTSO or HOSO), where POO stands for dioleoyl palmitin, Toc for tocopherols, and  $\Sigma$ C21-C25 corresponds to the group of alkanes that includes those with odd C-atom number from C21 to C25.

## BIBLIOGRAPHY

- [1] European Commission. Commission Implementing Regulation (EU) No 29/2012 of 13 January 2012 on marketing standards for olive oil. Official Journal of the European Union L12, 14-21 (2012)
- [2] International Olive Council. Trade standard applying to olive oils and olive pomace oils. COI/T.15/NC No 3/Rev. 11, 1-17 (2016)

This abstract is based on the published article R.B. Gómez-Coca, M.C. Pérez-Camino, J.M. Martínez-Rivas, A. Bendini, T. Gallina Toschi, W. Moreda. Olive oil mixtures. Part one: decisional tress or how to verify the olive oil percentage in declared blends. *Food Chemistry*, 315 (2020).

# MISCELE DI OLIO D'OLIVA. PARTE PRIMA: ALBERI DECISIONALI UTILI ALLA VERIFICA DELLA PERCENTUALE DI OLIO D'OLIVA NELLE MISCELE DICHIARATE CON OLI VEGETALI

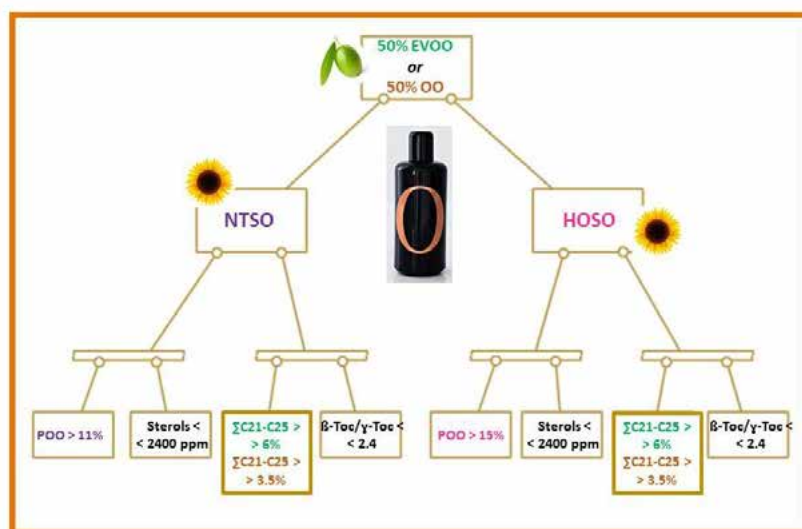
Raquel B. GÓMEZ-COCA<sup>a,✉</sup>, María del Carmen PEREZ-CAMINO<sup>a</sup>, José M. MARTÍNEZ-RIVAS<sup>a</sup>, Alessandra BENDINI<sup>b</sup>, Tullia GALLINA TOSCHI<sup>b</sup>, Wenceslao MOREDA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Instituto de la Grasa (CSIC), Campus Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, Spain; <sup>b</sup>Department of Agricultural and Food Sciences, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Bologna, Italy

✉Corresponding Author: Ctra. Utrera km 1, 41013 Sevilla, Spain. Phone: +34954611550, E-mail address: raquel.coca@ig.csic.es

## INTRODUZIONE

La commercializzazione di miscele legali tra olio di oliva ed altri oli vegetali è possibile in virtù dell'autorizzazione dell'Unione Europea che permette di evidenziare in etichetta la presenza di olio di oliva se questo è presente perlomeno al 50% [1]. Tale requisito ha messo in evidenza un'importante limitazione: non sono disponibili metodi direttamente finalizzati al controllo di questa percentuale minima. La letteratura scientifica su questa tematica è piuttosto scarsa. Partendo da tale presupposto, la finalità del presente lavoro è di proporre una strategia analitica utile a confermare se la quantità di olio di oliva dichiarata in etichetta è pari ad almeno il 50%. Per questo, sono stati impiegati sia oli extra vergini di oliva che oli di oliva che sono stati miscelati con due dei più rappresentativi oli di semi, il girasole convenzionale e quello ad alto contenuto di acido oleico. Sulla base delle evidenze ottenute, è possibile affermare che non sia necessario sviluppare nuovi metodi analitici, ma che sia sufficiente combinare in maniera opportuna le informazioni ottenibili da alcuni metodi già in uso e/o previsti dalla legislazione vigente per il controllo della purezza [2].



**Figura** - Albero decisionale per olio di oliva (OO) ed extra vergine di oliva (EVOO) miscelati con olio di girasole convenzionale o ad alto contenuto di acido oleico (NTSO or HOSO), dove POO sta per palmitildioleina, Toc per tocoferoli e  $\Sigma$ C21-C25 corrisponde al gruppo degli alcani con numero dispari di atomi di carbonio da C21 a C25.

## RISULTATI

In questo lavoro si raccomanda l'uso di alberi decisionali (vedere la Figura relativa) proposti per verificare se la percentuale di olio di oliva nelle miscele dichiarate raggiunga almeno il 50%.

Questo approccio è basato sulla determinazione di quei parametri compositivi per i quali sono note le maggiori differenze tra olio di oliva e di semi: trigliceridi, idrocarburi lineari saturi, steroli liberi e tocoferoli. In questo modo, per garantire la presenza di almeno il 50% di olio di oliva (o extra vergine di oliva) dovrebbero essere soddisfatte le seguenti condizioni: i) il contenuto di palmitoildioleina maggiore del 11-15%; ii) il rapporto  $\beta/\gamma$ -tocoferolo inferiore a 2,4; iii) la somma degli alcani C21-C25 più elevato di 3,5-6%; iv) il contenuto totale in steroli non superiore a 2400 mg/kg.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] European Commission. Commission Implementing Regulation (EU) No 29/2012 of 13 January 2012 on marketing standards for olive oil. Official Journal of the European Union L12, 14-21 (2012).
- [2] International Olive Council. Trade standard applying to olive oils and olive pomace oils. COI/T.15/NC No 3/Rev. 11, 1-17 (2016).

*Questo abstract è basato sulla pubblicazione R.B. Gómez-Coca, M.C. Pérez-Camino, J.M. Martínez-Rivas, A. Bendini, T. Gallina Toschi, W. Moreda. Olive oil mixtures. Part one: decisional tress or how to verify the olive oil percentage in declared blends. Food Chemistry, 315 (2020).*

# DETERMINATION OF VEGETABLE OILS IN OLIVE OIL MIXTURES USING A STEPWISE STRATEGY BASED ON <sup>1</sup>H-NMR FINGERPRINTING AND PATTERN RECOGNITION

Rosa María ALONSO-SALCES<sup>a,b,✉</sup>, Luis Ángel BERRUETA<sup>c</sup>, Beatriz QUINTANILLA-CASAS<sup>d</sup>, Stefania VICHI<sup>d</sup>, Alba TRES<sup>d</sup>, Carlos ASENSIO-REGALADO<sup>c</sup>, Gabriela Elena VIACAVA<sup>a,b</sup>, Aimaré Ayelén POLIERO<sup>b</sup>, Enrico VALLI<sup>e</sup>, Alessandra BENDINI<sup>e</sup>, Tullia GALLINA TOSCHI<sup>e</sup>, José Manuel MARTÍNEZ-RIVAS<sup>f</sup>, Wenceslao MOREDA<sup>f</sup>, Blanca GALLO<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina; <sup>b</sup>Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP), Argentina; <sup>c</sup>Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Spain; <sup>d</sup>Universidad de Barcelona (UB), Spain; <sup>e</sup>Department of Agricultural and Food Sciences, Alma Mater Studiorum – Università di Bologna, Bologna, Italy; <sup>f</sup>Instituto de la Grasa (CSIC), Spain.

✉Corresponding autor: Email: rosamaria.alonsosalces@gmail.com

## INTRODUCTION

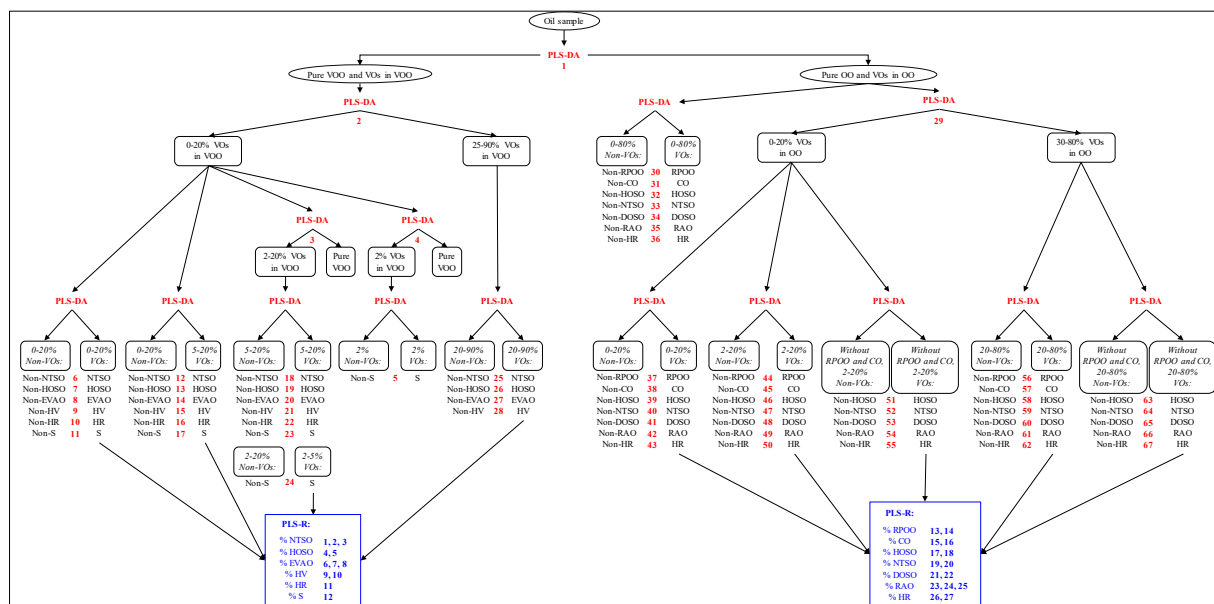
The high price of olive oil, its distinctive sensory profile and its reputation as a healthy source of dietary fats make olive oil a target for fraud. The most common types of olive oil fraud are illegal blending with other vegetable oils (VOs) or low-quality olive oils, deliberate mislabelling of less expensive classes of olive oils, other vegetable oils or their blends with olive oils, among others. Olive oil adulteration, being one of the biggest financial frauds in the agricultural sector, evidenced the need to update and harmonize analytical methods for quality and authenticity control of olive oil [1]. Oils of the 'virgin olive oil' (VOO) and 'olive oil' (OO) categories and their mixtures with the most common VOs, i.e. sunflower, high oleic sunflower, hazelnut, avocado, soybean, corn, refined palm olein and desterolized high oleic sunflower oils, were studied. A novel stepwise strategy based on the <sup>1</sup>H-NMR fingerprint of edible oils and chemometrics is proposed in order to assure the authenticity and traceability of olive oils and their declared blends with VOs, as well as to detect fraud when olive oil is illegally blended with VOs or a 'legal' blend is falsely labelled respect to the botanical nature of the oils mixed and/or the percentage of each oil in the declared mixture.

## RESULTS

<sup>1</sup>H-NMR fingerprinting of edible oils and a set of multivariate classification and regression models organised in a decision tree (Figure) allowed to (i) confirm the presence of VOO or OO in an oil sample; (ii) discriminate between pure olive oils and their blends with VOs; (iii) identify the VO in the blend with VOO or OO; (iv) differentiate between blends made with different VOs in VOO or OO; (v) distinguish blends made with the same VO in different proportions; and (vi) determine the % VO blended with VOO or OO. Partial least squares (PLS) discriminant analysis provided stable and robust binary classification models to identify the olive oil type and the VO in the blend. PLS regression afforded models with excellent precisions and acceptable accuracies to determine the percentage of VO in the mixture. The reliability of these validated models was supported by the chemical interpretation of the most influential variables on them. The % VO in the blend was determined with uncertainties under 20% of R-RMSEP for contents as low as 5-17% VO in VOO and 2-5% VO in OO. Detection limits were under 5% VO in VOO and 4% VO in OO. The satisfactory performance of this approach, tested with blind samples, confirmed its potential to support regulations and control bodies.

## BIBLIOGRAPHY

- [1] L. Conte, A. Bendini, E. Valli, P. Lucci, S. Moret, A. Maquet, F. Lacoste, P. Brereton, D.L. García-González, W. Moreda, T. Gallina Toschi, Olive oil quality and authenticity: A review of current EU legislation, standards, relevant methods of analyses, their drawbacks and recommendations for the future. *Trends in Food Science & Technology* 105, 483-493 (2020).



**Figure** - Decision tree constituted of PLS-DA classification and PLS-R regression models to determine the composition of binary mixtures of oils of the ‘virgin olive oil’ or ‘olive oil’ categories and other vegetable oils. Abbreviations: VOO, virgin olive oil; OO, olive oil; VO, vegetable oil; NTSO, refined conventional sunflower oil (normal type sunflower oil); HOSO, refined high oleic sunflower oil; DOSO, desterolized and deodorized high oleic sunflower oil; HR, refined hazelnut oil; HV, virgin hazelnut oil; S, refined soybean oil; EAVO, virgin avocado oil; RAO, refined avocado oil; RPOO, refined palm olein oil; CO, refined corn oil.

This abstract is based on the published article R.M. Alonso-Salces, L.A. Berrueta, B. Quintanilla-Casas, S. Vichi, A. Tres, M.I. Collado, C. Asensio-Regalado, G.E. Viacava, A.A. Poliero, E. Valli, A. Bendini, T. Gallina Toschi, J.M. Martínez-Rivas, W. Moreda, B. Gallo, Stepwise strategy based on <sup>1</sup>H-NMR fingerprinting in combination with chemometrics to determine the content of vegetable oils in olive oil mixtures. *Food Chemistry* 366, 130588 (2022).

## DETERMINAZIONE DI OLI VEGETALI MISCELATI CON OLI DI OLIVA MEDIANTE UNA STRATEGIA GRADUALE BASATA SUL PROFILO <sup>1</sup>H-NMR

Rosa María ALONSO-SALCES<sup>a,b,✉</sup>, Luis Ángel BERRUETA<sup>c</sup>, Beatriz QUINTANILLA-CASAS<sup>d</sup>, Stefania VICHI<sup>d</sup>, Alba TRES<sup>d</sup>, Carlos ASENSIO-REGALADO<sup>c</sup>, Gabriela Elena VIACAVA<sup>a,b</sup>, Aimaré Ayelén POLIERO<sup>b</sup>, Enrico VALLI<sup>e</sup>, Alessandra BENDINI<sup>e</sup>, Tullia GALLINA TOSCHI<sup>e</sup>, José Manuel MARTÍNEZ-RIVAS<sup>f</sup>, Wenceslao MOREDA<sup>f</sup>, Blanca GALLO<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina; <sup>b</sup>Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP), Argentina; <sup>c</sup>Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Spain; <sup>d</sup>Universidad de Barcelona (UB), Spain;

<sup>e</sup>Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Alma Mater Studiorum – Università di Bologna, Bologna, Italia;

<sup>f</sup>Instituto de la Grasa (CSIC), Spain.

✉ Corresponding Author: Email: rosamaria.alonsosalces@gmail.com

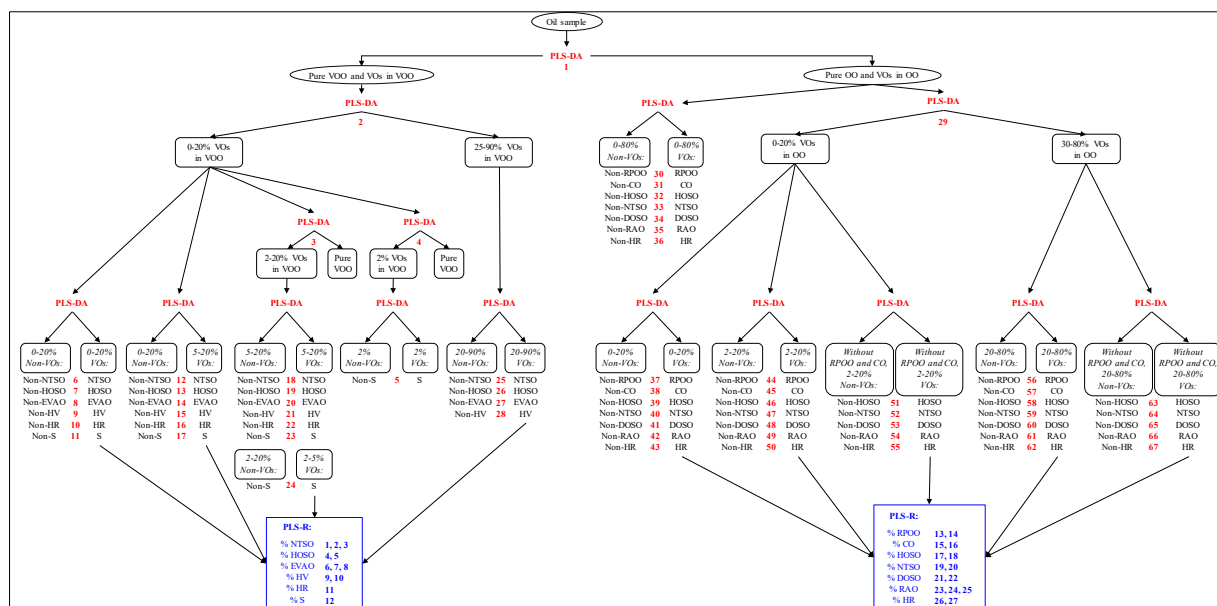
### INTRODUZIONE

L'alto prezzo a cui è venduto l'olio di oliva, il suo profilo sensoriale peculiare e la sua reputazione come fonte salutare di grassi alimentari lo rendono un ottimo bersaglio per le frodi. Le tipologie più comuni di frode nell'olio di oliva sono, tra le altre, la miscelazione illegale con altri oli vegetali (VO) o con oli di oliva di più bassa qualità, l'etichettatura deliberatamente errata di categorie merceologiche di oli di oliva a più basso prezzo, di altri oli vegetali e le loro miscele con oli di oliva. L'adulterazione nell'olio di oliva, essendo una delle principali frodi nel settore alimentare, ha messo in luce la necessità di aggiornare e armonizzare i metodi analitici per il controllo della qualità e autenticità dell'olio di oliva [1]. In questo lavoro sono stati studiati oli delle categorie merceologiche “olio di oliva vergine” (VOO) e “olio di oliva” (OO) e loro miscele con i VO più comuni quali: girasole, girasole alto oleico, nocciola, avocado, soia, mais, oleina di palma e olio di girasole alto oleico desterolato. Inoltre, viene proposta una nuova strate-

gia progressiva basata sull'impronta digitale <sup>1</sup>H-NMR degli oli commestibili e successiva elaborazione chemiometrica al fine di garantire l'autenticità e la tracciabilità degli oli di oliva e delle loro miscele dichiarate con VO. Inoltre, tale approccio, può essere utilizzato sia per rilevare miscele illegali tra OO e VO, sia miscele "legali" falsamente etichettate rispetto alla natura botanica degli oli miscelati e/o alla percentuale di ciascun olio nella miscela dichiarata.

## RISULTATI

L'impronta digitale <sup>1</sup>H-NMR degli oli e l'insieme di modelli di classificazione e regressione multivariati organizzati in un albero decisionale (Figura) hanno permesso di (i) confermare la presenza di VOO o OO; (ii) discriminare tra oli di oliva puri e le loro miscele con VO; (iii) identificare il VO nella miscela con VOO o OO; (iv) distinguere tra miscele realizzate con diversi VO in VOO o OO; (v) distinguere miscele realizzate con lo stesso VO in proporzioni diverse; (vi) determinare la % VO miscelata con VOO o OO. L'analisi discriminante dei minimi quadrati parziali (PLS) ha fornito modelli di classificazione robusti per identificare il tipo di olio di oliva e il VO nella miscela con eccellenti precisioni e accuratezze accettabili. L'affidabilità di questi modelli validati è stata supportata dall'interpretazione chimica delle variabili più influenti. La % VO nella miscela è stata determinata con incertezze inferiori al 20% di R-RMSEP per contenuti a partire da 5-17% di VO in VOO e 2-5% di VO in OO. I limiti di rilevabilità sono stati inferiori al 5% di VO in VOO e al 4% di VO in OO. Le prestazioni soddisfacenti di questo approccio, testato con campioni "alla cieca", hanno confermato la sua potenzialità come strumento utile per gli organismi di controllo.



**Figura** - Albero decisionale costituito dalla classificazione PLS-DA e dai modelli di regressione PLS-R per determinare la composizione di miscele binarie di oli delle categorie merceologiche "olio di oliva vergine" o "olio di oliva" e altri oli vegetali. Abbreviazioni: VOO, olio di oliva vergine; OO, olio di oliva; VO, olio vegetale; NTSO, olio di girasole convenzionale raffinato (olio di girasole di tipo normale); HOSO, olio di girasole raffinato alto oleico; DOSO, olio di girasole alto oleico desterolato e deodorato; HR, olio raffinato di nocciola; HV, olio di nocciola vergine; S, olio di soia raffinato; EVAO, olio di avocado vergine; RAO, olio di avocado raffinato; RPOO, olio raffinato di oleina di palma; CO, olio di mais raffinato.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] L. Conte, A. Bendini, E. Valli, P. Lucci, S. Moret, A. Maquet, F. Lacoste, P. Brereton, D.L. García-González, W. Moreda, T. Gallina Toschi, Olive oil quality and authenticity: A review of current EU legislation, standards, relevant methods of analyses, their drawbacks and recommendations for the future. *Trends in Food Science & Technology* 105, 483-493 (2020).

Questo abstract è basato sull'articolo pubblicato R.M. Alonso-Salces, L.A. Berrueta, B. Quintanilla-Casas, S. Vichi, A. Tres, M.I. Collado, C. Asensio-Regalado, G.E. Viacava, A.A. Poliero, E. Valli, A. Bendini, T. Gallina Toschi, J.M. Martínez-Rivas, W. Moreda, B. Gallo, Stepwise strategy based on <sup>1</sup>H-NMR fingerprinting in combination with chemometrics to determine the content of vegetable oils in olive oil mixtures. *Food Chemistry* 366, 130588 (2022).

# IN-HOUSE VALIDATION OF AN SPE-GC-FID METHOD FOR THE DETECTION OF FREE AND ESTERIFIED HYDROXYLATED MINOR COMPOUNDS IN VIRGIN OLIVE OILS

Enrico VALLI<sup>a</sup>, Andrea MILANI<sup>b</sup>, Ana SRBINOVSKA<sup>b</sup>, Erica MORET<sup>b</sup>, Sabrina MORET<sup>b</sup>, Alessandra BENDINI<sup>a</sup>, Wenceslao MOREDA<sup>c</sup>, Tullia GALLINA TOSCHI<sup>a</sup>, Paolo LUCCI<sup>b,✉</sup>

<sup>a</sup>Department of Agricultural and Food Sciences, Alma Mater Studiorum – Università di Bologna, Bologna, Italy; <sup>b</sup>Department of Agri-Food, Animal and Environmental Sciences, University of Udine, Udine, Italy; <sup>c</sup>Instituto de la Grasa (CSIC), Sevilla, Spain.

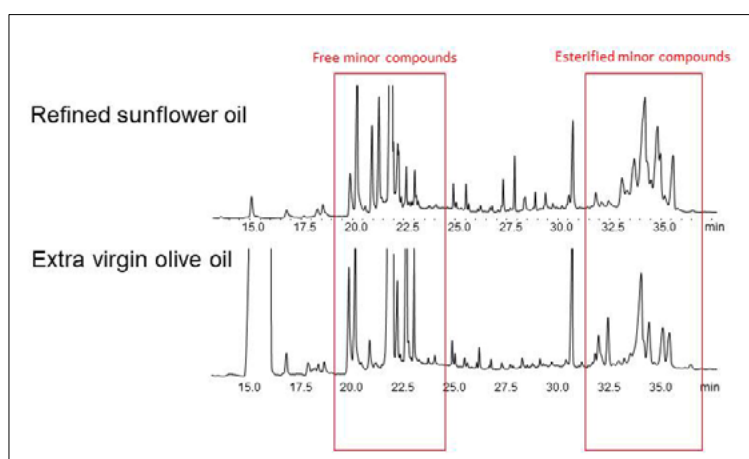
✉Corresponding Author: Via Sondrio 2/a, 33100 Udine, Italy. Phone: +39-0432-55817  
E-mail address: paolo.lucci@uniud.it or paololucci2001@yahoo.it

## INTRODUCTION

Virgin olive oils suffer from adulterations as observed in the EC reports related to food fraud [1]. In this context, the analytical evaluation of the composition of sterols is a well-established tool for assessing the purity of olive oils, as it depends on the botanical origin. The available official methods are suitable to determine the total composition of sterols, not depending on being in the free or in the esterified form [2, 3]. However, it should be highlighted that, in different vegetable oils, sterols can be differently distributed between these two forms. Information related to the esterified fraction of minor compounds (hydroxylated minor compounds, HMCs) in oil is inevitably lost when applying official procedures involving a saponification step. A method for the determination of the free and esterified minor components (waxes, alkyl esters, free fatty alcohols, free and esterified sterols, free and esterified triterpenic alcohols, sterenes, and free and esterified tocopherols) in olive and seed oils has been developed and in-house validated in this experimental work. The proposed offline SPE-GC-FID methodology, that takes inspiration from previous research works [4, 5], has been applied to pure olive and sunflower oil samples and tested for its ability to reveal extra virgin olive oil (EVOO) adulteration with small percentages (up to 10%, w/w) of refined sunflower oil (RSO).

## RESULTS

A simplified method based on offline SPE-GC-FID for analysis of free and esterified HMCs in olive and seed oils has been developed and in-house validated. This method is accessible to most analytical laboratories and replace toxic solvents usually employed in sterol analysis while reducing at minimum the



**Figure** - Free and esterified minor compounds detected in an extra virgin olive oil and in a refined sunflower oil.

amounts of reagents needed. The procedure allows the conversion of free minor compounds into silyl derivatives, in such a way, their polarity become the same of esterified minor components. Oil is then fractionated by silica solid-phase extraction and the fraction with free and esterified minor compounds is



analyzed by capillary GC with on column injection. The method has been optimized and then in-house validated using three different oils [EVOO, refined pomace oil (PO), and RSO] samples. The method has been applied to pure EVOO and RSO samples (see Figure).

As an example, results showed three times higher level of esterified minor compounds in RSO compared to EVOO, thus confirming that the esterified fraction could represent the most diagnostic one for detecting the fraudulent addition of RSO to EVOO. Additionally, the ability of the method to quantify free and esterified HMCs has been investigated by analyzing EVOO samples added with small amounts of RSO.

## BIBLIOGRAPHY

- [1] E. Casadei, E. Valli, F. Panni, J. Donarski, J. Farrús Gubern, P. Lucci, L. Conte, F. Lacoste, A. Maquet, P. Brereton, A. Bendini, T. Gallina Toschi. Emerging trends in olive oil fraud and possible countermeasures. *Food Control* 124, 107902 (2021).
- [2] International Standard Organization (ISO). ISO 12228-1:2014 Animal and Vegetable Fats and Oils - Determination of Individual and Total Sterols Contents - Gas Chromatographic Method & Part 2: Olive Oils and Olive Pomace Oils; International Organisation for Standardization: Geneva, Switzerland, 2014.
- [3] International Olive Council (IOC). Determination of the Sterol Composition and Content and Alcoholic Compounds by Capillary Gas Chromatography; International Olive Council (IOC): Madrid, Spain, 2020.
- [4] K. Grob, M. Lanfranchi, C. Mariani. Evaluation of olive oils through the fatty alcohols, the sterols and their esters by coupled LC-GC. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67, 626-634 (1990).
- [5] C. Mariani, E. Fedeli, K. Grob. Valutazione dei componenti minori liberi ed esterificati nelle sostanze grasse. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 68, 233-236, (1991).

*This abstract is based on the published article E. Valli, A. Milani, A. Srbínovska, E. Moret, S. Moret, A. Bendini, W. Moreda, T. Gallina Toschi, P. Lucci, In-House Validation of an SPE-GC-FID Method for the Detection of Free and Esterified Hydroxylated Minor Compounds in Virgin Olive Oils. Foods 10(6), 1260 (2021).*

# VALIDAZIONE INTERNA DI UN METODO SPE-GC-FID PER LA RILEVAZIONE DI COMPOSTI MINORI IDROSSILATI LIBERI ED ESTERIFICATI NEGLI OLI VERGINI DI OLIVA

Enrico VALLI<sup>a</sup>, Andrea MILANI<sup>b</sup>, Ana SRBINOVSKA<sup>b</sup>, Erica MORET<sup>b</sup>, Sabrina MORET<sup>b</sup>, Alessandra BENDINI<sup>a</sup>, Wenceslao MOREDA<sup>c</sup>, Tullia GALLINA TOSCHI<sup>a</sup>, Paolo LUCCI<sup>b,✉</sup>

<sup>a</sup>Department of Agricultural and Food Sciences, Alma Mater Studiorum – Università di Bologna, Bologna, Italy; <sup>b</sup>Department of Agri-Food, Animal and Environmental Sciences, University of Udine, Udine, Italy; <sup>c</sup>Instituto de la Grasa (CSIC), Sevilla, Spain.

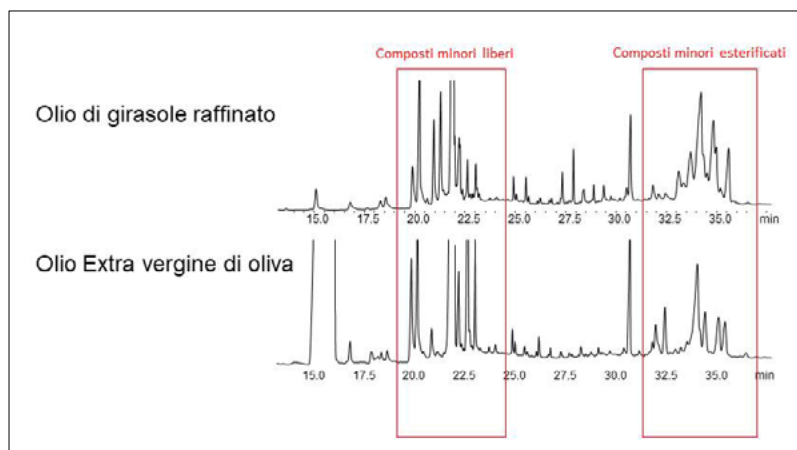
✉Corresponding Author. via Sondrio 2/a, 33100 Udine, Italy. Phone: +39-0432-55817  
E-mail address: paolo.lucci@uniud.it or paololucci2001@yahoo.it

## INTRODUZIONE

Gli oli di oliva vergini sono oggetto di adulterazioni come si può notare nei report della CE relativi alle frodi alimentari [1]. In questo contesto, la determinazione analitica della composizione in steroli, in quanto dipendente dall'origine botanica, è uno strumento consolidato per valutare la purezza degli oli di oliva. I metodi ufficiali disponibili permettono di determinare la composizione totale in steroli, indipendentemente dal fatto che siano presenti in forma libera o esterificata [2-3]. Tuttavia, va sottolineato che, negli oli vegetali, gli steroli possono essere distribuiti in modo diverso tra queste due forme. Le informazioni relative alla frazione esterificata dei composti minori (composti minori idrossilati, HMC) nell'olio vengono inevitabilmente perse quando si applicano procedure ufficiali che comportano una fase di saponificazione. In questo lavoro sperimentale è stato sviluppato e validato internamente un metodo per la determinazione dei componenti minori liberi ed esterificati (cere, esteri alchilici, alcoli grassi liberi, steroli liberi ed esterificati, alcoli triterpenici liberi ed esterificati, stereni e tocoferoli liberi ed esterificati) negli oli di oliva e di semi. La metodologia proposta SPE-GC-FID non in linea, che prende ispirazione da precedenti studi [4, 5], è stata applicata a campioni genuini di olio di oliva e di girasole e testata per la sua capacità di rivelare l'adulterazione a carico dell'olio extra vergine di oliva (EVOO) con piccole percentuali (fino al 10%, p/p) di olio di girasole raffinato (RSO).

## RISULTATI

Un metodo semplificato, basato sulla tecnica SPE-GC-FID non in linea, è stato sviluppato e validato internamente per l'analisi degli HMC liberi ed esterificati negli oli di oliva e di semi. Il metodo è accessibile alla maggior parte dei laboratori di analisi e sostituisce i solventi tossici normalmente impiegati nell'analisi degli steroli, riducendo al minimo le quantità necessarie di reagenti. Il procedimento consente la conversione di composti minori liberi in derivati sililici, in modo tale che la loro polarità diventi la stessa dei componenti minori esterificati. L'olio viene, quindi, frazionato mediante estrazione in fase solida su gel di silice e la frazione contenente i composti minori liberi ed esterificati viene analizzata mediante GC capillare con iniezione on-column. Il metodo è stato ottimizzato e, quindi, validato internamente utilizzando tre diversi campioni di oli [EVOO, olio di sansa raffinato (PO) e RSO]. Il metodo è stato applicato a campioni genuini di EVOO e RSO (vedere la relativa Figura).



**Figura** - Composti minori liberi ed esterificati identificati in un olio extra vergine di oliva ed in un olio di girasole raffinato.

Ad esempio, i risultati hanno mostrato un contenuto tre volte superiore di composti minori esterificati negli RSO rispetto agli EVOO, confermando il fatto che la frazione esterificata potrebbe essere quella maggiormente diagnostica per rilevare l'aggiunta fraudolenta di RSO a EVOO. Inoltre, la capacità del metodo di quantificare HMC liberi ed esterificati è stata testata analizzando campioni di EVOO aggiunti di piccole quantità di RSO.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] E. Casadei, E. Valli, F. Panni, J. Donarski, J. Farrús Gubern, P. Lucci, L. Conte, F. Lacoste, A. Maquet, P. Brereton, A. Bendini, T. Gallina Toschi. Emerging trends in olive oil fraud and possible countermeasures. *Food Control* 124, 107902 (2021).
- [2] International Standard Organization (ISO). ISO 12228-1:2014 Animal and Vegetable Fats and Oils - Determination of Individual and Total Sterols Contents - Gas Chromatographic Method & Part 2: Olive Oils and Olive Pomace Oils; International Organisation for Standardization: Geneva, Switzerland, 2014.
- [3] International Olive Council (IOC). Determination of the Sterol Composition and Content and Alcoholic Compounds by Capillary Gas Chromatography; International Olive Council (IOC): Madrid, Spain, 2020.
- [4] K. Grob, M. Lanfranchi, C. Mariani. Evaluation of olive oils through the fatty alcohols, the sterols and their esters by coupled LC-GC. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67, 626-634 (1990).
- [5] C. Mariani, E. Fedeli, K. Grob. Valutazione dei componenti minori liberi ed esterificati nelle sostanze grasse. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 68, 233-236 (1991).

*Questo abstract è basato sull'articolo pubblicato E. Valli, A. Milani, A. Srbínovska, E. Moret, S. Moret, A. Bendini, W. Moreda, T. Gallina Toschi, P. Lucci. In-House Validation of an SPE-GC-FID Method for the Detection of Free and Esterified Hydroxylated Minor Compounds in Virgin Olive Oils. Foods 10(6), 1260 (2021).*

# LARGE-SCALE EVALUATION OF SHOTGUN TRIACYLGLYCEROLS PROFILING FOR THE FAST DETECTION OF OLIVE OIL ADULTERATION

Beatriz QUINTANILLA-CASAS<sup>a,b</sup>, Giulia STROCCHI<sup>a</sup>, Julen BUSTAMANTE<sup>a,b</sup>, Berta TORRES-COBOS<sup>a,b</sup>, Francesc GUARDIOLA<sup>a,b</sup>, Wenceslao MOREDA<sup>c</sup>, José Manuel MARTÍNEZ-RIVAS<sup>c</sup>, Enrico VALLI<sup>c</sup>, Alessandra BENDINI<sup>c</sup>, Tullia GALLINA TOSCHI<sup>c</sup>, Alba TRES<sup>a,b,✉</sup>, Stefania VICHI<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Departament de Nutrició, Ciències de l'Alimentació i Gastronomia, Campus de l'Alimentació de Torribera, Universitat de Barcelona (UB), Santa Coloma de Gramenet, Spain; <sup>b</sup>Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB), Universitat de Barcelona (UB), Santa Coloma de Gramenet, Spain; <sup>c</sup>Instituto de la Grasa (CSIC), Sevilla, Spain; <sup>d</sup>Department of Agricultural and Food Sciences, Alma Mater Studiorum – Università di Bologna, Bologna, Italy.

✉Corresponding Author: Phone: +34934020916, E-mail address: atres@ub.edu

## INTRODUCTION

The blending with oils of lower economic value is among the most common economically motivated adulterations in olive oil (OO). Fast and effective analytical screening tools providing new suitable authenticity markers and applicable to a large number of samples are required to efficiently control the global OO production, and allow the rapid detection of low levels of adulterants even with fatty acid composition similar to OO. Innovative high-dimensional methods are emerging besides the conventional targeted approach. These approaches are usually based on high-throughput analyses identifying specific patterns to distinguish authentic from adulterated samples, rather than only a few markers as target methods do [1] providing a higher efficiency in fraud detection. In this regard, shotgun lipid profiling based on High Resolution Mass Spectrometry (HRMS) enabled the fast speciation of a large number of triacylglycerol (TAG) molecules by accurate mass measurement and elemental formulae assignment in a single run, with high selectivity and minimal sample preparation [2]. The present study aims to develop authentication models for the comprehensive detection of illegal blends of OO with adulterants including different types of high linoleic (HL) and high oleic (HO) vegetable oils at low concentrations (2-10%) based on shotgun TAG profile obtained by Flow Injection Analysis-Heated Electrospray Ionisation-HRMS (FIA-HESI-HRMS) at a large-scale experimental design.

## RESULTS

The sample set covered a large natural variability of both OO and adulterants, resulting in more than one thousand samples analysed. A combined PLS-DA binary modelling based on shotgun TAG profiling proved to be a fit-for-purpose screening tool in terms of efficiency and applicability. This fast method allowed the comprehensive detection of both HO and HL adulterants at  $\geq 2\%$  and  $\geq 5\%$ , respectively, based on a large-scale sampling and supported by the external validation of the classification model. The external validation resulted in the correct classification of the 86.8% of the adulterated samples (diagnostic sensitivity = 0.87), and the 81.1% of the genuine samples (diagnostic specificity = 0.81), with an 85.1% overall correct classification (efficiency = 0.85) (Table). The results also revealed the high diagnostic role of minor compounds conforming OO's TAG profile for the detection of HL and HO adulterant oils in OO. These diagnostic minor TAGs, formed by short-chain, long chain or odd-chain FAs, are hardly detectable by conventional methods. Moreover, the high number of variables showing significant contributions to each model confirmed the importance of disposing of high dimensional multi-component approaches for the identification of specific patterns to distinguish authentic from adulterated samples.

**Table** - Global outcome of external validation of the classification approach based on combining two consecutive binary PLS-DA. Results are mean values obtained from three randomly selected validation sets.

	n	Predicted category		Correct class (%)	FN <sup>a</sup>	FP <sup>b</sup>
		Adulterated	Genuine		(%)	(%)
<b>ADULTERATED</b> <sup>c</sup>	156	135 ± 7	21 ± 7	<b>86.8 ± 4.4</b>	13.4	
HL blends <sup>d</sup>	64	57 ± 6	7 ± 6	88.5 ± 8.6	11.6	
HO blends <sup>e</sup>	92	79 ± 2	13 ± 2	85.5 ± 1.7	14.1	
<b>GENUINE</b>	67	13 ± 1	54 ± 1	<b>81.1 ± 0.9</b>		19.4
Total	223			<b>85.1 ± 3.0</b>		

<sup>a</sup>: false negatives (percent of adulterated samples classified as genuine); <sup>b</sup>: false positives (percent of genuine samples classified as adulterated); <sup>c</sup>: sum of blends of OO with HL ( $\geq 2\%$ ) and HO ( $\geq 5\%$ ) adulterants; <sup>d</sup>: blends of OO with HL ( $\geq 2\%$ ); <sup>e</sup>: blends of OO with HO ( $\geq 5\%$ ) adulterants.

## BIBLIOGRAPHY

- [1] S. Esslinger, J. Riedl, C. Fauhl-Hassek, Potential and limitations of nontargeted fingerprinting for authentication of food in official control. *Food Research International*, 60, 189–204 (2014).
- [2] S. Vichi, N. Cortés-Francisco, J. Caixach, Ultrahigh resolution mass spectrometry and accurate mass measurements for high-throughput food lipids profiling. *Journal of Mass Spectrometry*, 47, 1177–1190 (2012).

*This abstract is based on the published article B. Quintanilla-Casas, G. Strocchi, J. Bustamante, B. Torres-Cobos, F. Guardiola, W. Moreda, J.M. Martínez-Rivas, E. Valli, A. Bendini, T. Gallina Toschi, A. Tres, S. Vichi, Large-scale evaluation of shotgun triacylglycerol profiling for the fast detection of olive oil adulteration. Food Control 123, 107851 (2021)*”.

# VALUTAZIONE SU LARGA SCALA DEL PROFILO DEI TRIACILGLICEROLI PER IL RILEVAMENTO RAPIDO DELL'ADULTERAZIONE DELL'OLIO D'OLIVA

Beatriz QUINTANILLA-CASAS<sup>a,b</sup>, Giulia STROCCHI<sup>a</sup>, Julen BUSTAMANTE<sup>a,b</sup>, Berta TORRES-COBOS<sup>a,b</sup>, Francesc GUARDIOLA<sup>a,b</sup>, Wenceslao MOREDA<sup>c</sup>, José Manuel MARTÍNEZ-RIVAS<sup>c</sup>, Enrico VALLI<sup>c</sup>, Alessandra BENDINI<sup>e</sup>, Tullia GALLINA TOSCHI<sup>e</sup>, Alba TRES<sup>a,b,✉</sup>, Stefania VICHI<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Departament de Nutrició, Ciències de l'Alimentació i Gastronomia, Campus de l'Alimentació de Torribera, Universitat de Barcelona (UB), Santa Coloma de Gramenet, Spain; <sup>b</sup>Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB), Universitat de Barcelona (UB), Santa Coloma de Gramenet, Spain; <sup>c</sup>Instituto de la Grasa (CSIC), Sevilla, Spain; <sup>d</sup>Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Alma Mater Studiorum – Università di Bologna, Bologna, Italia

✉Corresponding Author: Phone: +34934020916, E-mail address: atres@ub.edu

## INTRODUZIONE

Tra le frodi più comuni ed economicamente convenienti troviamo la miscelazione dell'olio di oliva (OO) con altri oli vegetali di minor valore. Per controllare in modo efficiente la produzione globale di OO e consentire il rilevamento rapido di bassi livelli di adulteranti anche con oli vegetali aventi composizione in acidi grassi molto simile all'OO, sono necessari strumenti analitici di monitoraggio rapidi ed efficaci che forniscano nuovi indicatori di autenticità applicabili a un gran numero di campioni. Attualmente, in parallelo ad un approccio convenzionale mirato alla ricerca di specifici marcatori, stanno emergendo metodi innovativi basati su modelli che considerano il profilo complessivo in analiti, in grado di discriminare i campioni autentici da quelli adulterati [1] con una maggiore efficienza nel rilevamento delle frodi. A questo proposito, l'analisi del profilo lipidico attraverso l'impiego della spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS) ha consentito la speciazione rapida di un gran numero di molecole di trigliceridi (TAGs) con misurazioni di massa accurate, assegnazione di formule elementari, elevata selettività e preparazione minima del campione [2]. Il presente studio ha permesso di sviluppare modelli di autenticazione per il rilevamento completo di miscele illegali di OO con adulteranti quali oli vegetali ad alto contenuto in acido linoleico (HL) ed alto contenuto in acido oleico (HO), presenti a basse concentrazioni (2–10%), in base al profilo TAGs ottenuto mediante *Flow Injection Analysis-Heated Electrospray Ionisation-HRMS (FIA-HESI-HRMS)* applicando un disegno sperimentale su larga scala.

## RISULTATI

Sono stati analizzati più di mille campioni così da considerare l'elevata variabilità naturale sia dell'OO che delle tipologie di adulteranti. La modellazione binaria PLS-DA basata sulla profilazione di TAGs, si è rivelata uno strumento di monitoraggio adatto allo scopo in termini di efficienza ed applicabilità. Questo metodo rapido ha consentito il rilevamento completo di adulteranti sia HO che HL a  $\geq 2\%$  e  $\geq 5\%$ , rispettivamente, con validazione esterna del modello di classificazione che ha portato alla corretta classificazione dell'86,8% dei campioni adulterati (sensibilità diagnostica = 0,87) e dell'81,1% dei campioni autentici (specificità diagnostica = 0,81) ed una classificazione complessivamente corretta dell'85,1% (efficienza = 0,85) (Tabella). I risultati hanno anche evidenziato l'elevato ruolo diagnostico di alcuni TAGs minori, formati da acidi grassi a corta catena, a lunga catena o a catena dispari, difficilmente rilevabili con i metodi convenzionali. Inoltre, l'elevato numero di variabili aventi contributi significativi per ciascun modello ha confermato l'importanza di disporre di approcci multicomponente ad alta dimensione per potere distinguere i campioni autentici da quelli adulterati.

**Tabella** - Risultato globale della validazione esterna ottenuto mediante approccio di classificazione basato sulla combinazione di modelli PLS-DA binari consecutivi. I risultati sono relativi ai valori medi ottenuti da tre set di validazione selezionati casualmente.

	n	Categoria prevista		Classe corretta (%)	FN <sup>a</sup> (%)	FP <sup>b</sup> (%)
		ADULTERATO	GENUINO			
<b>ADULTERATO<sup>c</sup></b>	156	135 ± 7	21 ± 7	<b>86.8 ± 4.4</b>	13.4	
HL blends <sup>d</sup>	64	57 ± 6	7 ± 6	88.5 ± 8.6	11.6	
HO blends <sup>e</sup>	92	79 ± 2	13 ± 2	85.5 ± 1.7	14.1	
<b>GENUINO</b>	67	13 ± 1	54 ± 1	<b>81.1 ± 0.9</b>		19.4
Totale	223			<b>85.1 ± 3.0</b>		

<sup>a</sup>: falsi negativi (percentuale di campioni adulterati classificati come autentici); <sup>b</sup>: falsi positivi (percentuale di campioni autentici classificati come adulterati); <sup>c</sup>: somma delle miscele di OO con adulteranti HL (≥2%) e HO (≥5%); <sup>d</sup>: miscele di OO con adulteranti HL (≥2%); <sup>e</sup>: miscele di OO con adulteranti HO (≥5%).

## BIBLIOGRAFIA

- [1] S. Esslinger, J. Riedl, C. Fauhl-Hassek, Potential and limitations of nontargeted fingerprinting for authentication of food in official control. *Food Research International*, 60, 189-204 (2014).
- [2] S. Vichi, N. Cortés-Francisco, J. Caixach, Ultrahigh resolution mass spectrometry and accurate mass measurements for high-throughput food lipids profiling. *Journal of Mass Spectrometry*, 47, 1177-1190 (2012).

*Questo abstract è basato sull'articolo pubblicato B. Quintanilla-Casas, G. Strocchi, J. Bustamante, B. Torres-Cobos, F. Guardiola, W. Moreda, J.M. Martinez-Rivas, E. Valli, A. Bendini, T. Gallina Toschi, A. Tres, S. Vichi, Large-scale evaluation of shotgun triacylglycerol profiling for the fast detection of olive oil adulteration. Food Control 123, 107851 (2021).*

# FATTY ACID ETHYL ESTERS IN VIRGIN OLIVE OILS: IN-HOUSE VALIDATION OF A REVISED METHOD

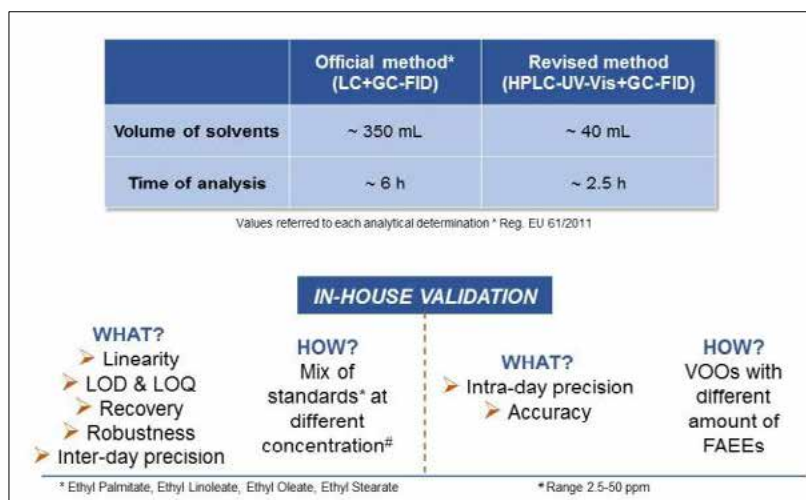
Rosa PALAGANO<sup>a</sup>, Enrico VALLI<sup>a</sup>, Matilde TURA<sup>a</sup>, Chiara CEVOLLI<sup>a</sup>, María del Carmen PEREZ-CAMINO<sup>b</sup>, Wenceslao MOREDA<sup>b</sup>, Alessandra BENDINI<sup>a,✉</sup>, Tullia GALLINA TOSCHI<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Agricultural and Food Sciences, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Bologna, Italy; <sup>b</sup>Instituto de la Grasa (CSIC), Campus Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, Spain

✉Corresponding author. Piazza Gabriele Goidanich, 47521 Cesena (FC), Italy. Phone: +390547338121  
E-mail address: alessandra.bendini@unibo.it

## INTRODUCTION

As well known, the content in fatty acid ethyl esters (FAEEs) represents a direct quality parameter to define the quality grade of virgin olive oil (VOOs) (limit set at  $\leq 35$  mg/kg oil for extra virgin olive oil category for EU regulation), and it is also considered an indirect parameter to detect fraudulent mixtures of EVOO with lower quality oils such as soft deodorized olive oils [1]. In this work, the official method has been revised to propose an alternative off-line procedure based on HPLC-GC-FID, more suitable in terms of time of analysis, volume of solvents and level of complexity. Specifically, the analytical protocol proposed HPLC for collecting FAEEs from VOOs instead of the traditional liquid chromatography of the official method. Moreover, a programmed temperature vaporizer (PTV) injector was tested as an alternative to the on-column one because PTV is considered a more versatile option as the temperature control is time-programmed and the injection mode (split/splitless) can be optimized. The performance of the alternative method was evaluated, checking the results in terms of several parameters regarding in-house validation protocol [2]. For this control, specific kinds of samples as refined olive oil spiked with five concentrations of a pure standard of analytes of interest and real VOOs characterized by different contents of FAEEs (low, medium, high) were analyzed applying in parallel the two methods (alternative vs official) (see the Figure).



**Figure** - Scheme of the parameters checked for the in-house validation of the alternative procedure to the official method and advantages in terms of time of analysis and volume of solvents needed.

## RESULTS

The main advantages of this revised protocol may be summarized as:

i) significant reduction in time and solvents needed (reduction of more than 50% and 80% for time and solvents, respectively compared to the official procedure);

- ii) simplification of the separation step of FAEEs fraction avoiding the manual packing of the glass column for the liquid chromatography;
- iii) satisfactory performance in terms of in-house validation results: linearity showed linear response between 2.5 and 50 mg/L; percentages of standard deviation related to intra-day and inter-day precision were lower than 15%; LOD and LOQ were lower than 1 and 1.5 mg/kg, respectively; in the case of the concentration of FAEEs closer to the legal limit, the recoveries of each analyte were higher than 94%;
- iv) no significant differences were evidenced for analytes of interest when the alternative procedure off-line HPLC-GC-FID with PTV injector was applied to actual samples with low, medium and high content of FAEEs with respect to the official method.

#### BIBLIOGRAPHY

- [1] M.C. Pérez-Camino, A. Cert, A. Romero-Segura, R. Cert-Trujillo, W. Moreda. Alkyl esters of fatty acids a useful tool to detect soft deodorized olive oils. *J. Agric. Food Chem.* 56, 6740–6744 (2008).
- [2] F.T. Peters, O.H. Drummer, F. Mussho. Validation of new methods. *Forensic Sci. Int.* 165, 216-224 (2007).

*This abstract is based on the published article R. Palagano, E. Valli, M. Tura, C. Cevoli, M. Perez-Camino, W. Moreda, A. Bendini, T. Gallina Toschi. Fatty Acid Ethyl Esters in Virgin Olive Oils: In-House Validation of a Revised Method. *Foods* 9, 924 (2020).*

## ESTERI ETILICI DI ACIDI GRASSI IN OLI VERGINI DI OLIVA: VALIDAZIONE INTERNA DI UN METODO REVISIONATO

Rosa PALAGANO<sup>a</sup>, Enrico VALLI<sup>a</sup>, Matilde TURA<sup>a</sup>, Chiara CEVOLLI<sup>a</sup>, María del Carmen PEREZ-CAMINO<sup>b</sup>,  
Wenceslao MOREDA<sup>b</sup>, Alessandra BENDINI<sup>a,✉</sup>, Tullia GALLINA TOSCHI<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Agricultural and Food Sciences, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Bologna, Italy; <sup>b</sup>Instituto de la Grasa (CSIC), Campus Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, Spain

✉Corresponding Author. Piazza Gabriele Goidanich, 47521 Cesena (FC), Italy. Phone: +390547338121  
E-mail address: alessandra.bendini@unibo.it

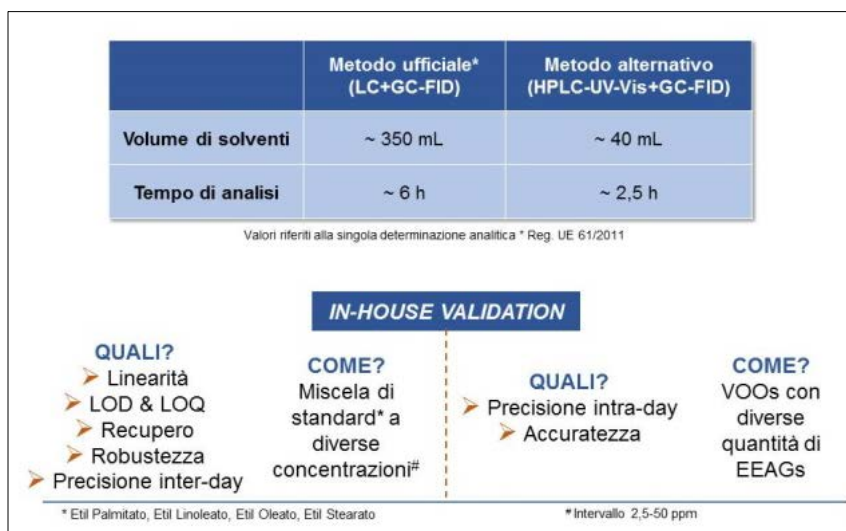
#### INTRODUZIONE

Come ben noto, il contenuto in etil esteri degli acidi grassi (EEAGs) è considerato un parametro diretto di qualità da applicarsi per definire l'appartenenza di oli vergini di oliva (VOOs) ad una specifica categoria (limite fissato a  $\leq 35$  mg/kg per la categoria extra vergine di oliva per la legislazione UE) ed è anche ritenuto un parametro indiretto utile per mettere in luce possibili miscele fraudolente tra un olio extra vergine di oliva ed un olio soft deodorato [1]. In questo lavoro è stato proposto un approccio analitico alternativo al metodo ufficiale con lo scopo di offrire una procedura non in linea HPLC-GC-FID migliorativa in termini di tempo di analisi, volume di solventi e livello di complessità. Più nello specifico, è stato impiegato l'HPLC per collezionare i EEAGs dagli oli vergini di oliva (VOOs) al posto della tradizionale cromatografia liquida su colonna. Inoltre, è stato testato anche un iniettore di vaporizzazione a temperatura programmata (PTV) come possibile alternativa a quello on-column poichè il PTV è considerato più versatile consentendo il controllo programmato e l'ottimizzazione della modalità di iniezione (split/splitless). Le prestazioni del metodo alternativo sono state valutate controllando i risultati ottenuti per differenti parametri che caratterizzano il protocollo di validazione interna [2]. A tale scopo, sono state analizzate tipologie specifiche di campioni quali olio di oliva raffinato aggiunto di cinque concentrazioni diverse di standard puri degli analiti di interesse e campioni reali VOOs caratterizzati da concentrazioni diverse di EEAGs (basso, medio ed alto contenuto di EEAGs) ed applicando in parallelo i due metodi (alternativo vs ufficiale) (vedere la Figura).

#### RISULTATI

I principali vantaggi di questo protocollo possono essere riassunti nei seguenti punti: i) significativa riduzione del tempo di analisi e della quantità di solventi necessari (decremento di più del 50% ed 80% per tempo e solventi, rispettivamente, per il metodo alternativo rispetto al metodo ufficiale); ii) semplificazione della fase di separazione della frazione di EEAGs che permette di evitare l'impaccamento ma-

nuale della colonna in vetro per la cromatografia liquida iii); soddisfacente prestazione per quanto concerne i parametri testati per la validazione interna: la linearità mostrava risposte lineari nell'intervallo di concentrazioni tra 2,5 e 50 mg/L; la precisione testata nello stesso giorno e tra giorni diversi evidenziava percentuali di variazione inferiore al 15%; i valori di LOD e LOQ erano più bassi di 1 e 1,5 mg/kg, rispettivamente; in caso di contenuto di EEAGs vicino al limite di legge, i recuperi dei singoli analiti risultavano più alti del 94% iv) l'applicazione del metodo alternativo non in linea HPLC-GC-FID con iniettore PTV ai campioni a basso, medio ed alto contenuto in EEAGs non ha evidenziato differenze significative degli analiti rispetto a quando analizzati con il metodo ufficiale.



**Figura** - Schema dei parametri controllati per la validazione in-house della procedura alternativa al metodo ufficiale e vantaggi in termini di tempo di analisi e volume di solventi richiesti.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] M.C.Pérez-Camino, A. Cert, A. Romero-Segura, R. Cert-Trujillo, W. Moreda. Alkyl esters of fatty acids a useful tool to detect soft deodorized olive oils. *J. Agric. Food Chem.* 56, 6740–6744 (2008).
- [2] F.T. Peters, O.H. Drummer, F. Mussho. Validation of new methods. *Forensic Sci. Int.* 165, 216-224 (2007).

*Questo abstract è basato sull'articolo pubblicato R. Palagano, E. Valli, M. Tura, C. Cevoli, M. Perez-Camino, W. Moreda, A. Bendini, T. Gallina Toschi. Fatty Acid Ethyl Esters in Virgin Olive Oils: In-House Validation of a Revised Method. Foods 9, 924 (2020).*



# OLIVE OIL MIXTURES. PART TWO: DETECTION OF SOFT DEODORIZED OIL IN EXTRA VIRGIN OLIVE OIL THROUGH DIACYLGLYCEROL DETERMINATION. RELATIONSHIP WITH FREE ACIDITY

Raquel B. GÓMEZ-COCA<sup>a,✉</sup>, María del Carmen PEREZ-CAMINO<sup>a</sup>, Alessandra BENDINI<sup>b</sup>, Tullia GALLINA TOSCHI<sup>b</sup>, Wenceslao MOREDA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Instituto de la Grasa (CSIC), Campus Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, Spain; <sup>b</sup>Department of Agricultural and Food Sciences, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Bologna, Italy

✉Corresponding Author: Sevilla, Spain. Phone: +34954611550, e-mail address: raquel.coca@ig.csic.es

## INTRODUCTION

Olive oil authentication is one of the most defiant analytical problems at present. Actually, the range of possible adulterants to be detected includes not only vegetable oils other than olive oil, but also defective olive oils. Furthermore, flawed oils themselves can be the target of a series of fraudulent practices (soft deodorization) whose general goal is to mask unpleasant flavors and make them suitable to be inadvertently mixed with high quality, extra virgin olive oil (EVOO).

Opposite to standard deodorization, which is carried out through pressurized steam-distillation at 180-250°C [1], soft deodorization, preceded or not by chemical neutralization, takes place at low temperature. Additions of soft deodorized olive oil to EVOO is challenging due to, firstly, the fact that the soft deodorization conditions are tailored in such a way that the typical refining markers, like stigmastadienes or conjugated polyunsaturated fatty acids, are not conclusively detected. Secondly, even if several analytical techniques have been developed ad hoc, there are a number of out-of-range results that do not always have a unique origin.

This work focuses specifically on the effectiveness of two factors obtained as a result of linking the DAG concentration and the free acidity value of the samples under suspicious, to detect the presence of soft deodorized olive oil in authentic EVOO. It can be postulated that, since there is a relationship between free acidity and DAG concentration that breaks once the oil has gone through a refining process, it will be possible to detect the presence of soft deodorized oil in EVOO by using a mathematical combination of both measurements.

## RESULTS

In order to confirm the absence of soft deodorized oils in EVOO is based two factors are proposed. For genuine EVOO those factors are: R1 ( $10 \times \text{free acidity}/\text{DAG}_{\text{exp}}$ ) which must be equal or higher than 0.23, and R2 ( $\text{DAG}_{\text{exp}} - \text{DAG}_{\text{theor}}$ ) that must be a negative value. In this work we demonstrate that such approach is useful to detect the presence of soft deodorized olive oil when this is at least at 30% in the blend (see Figure).

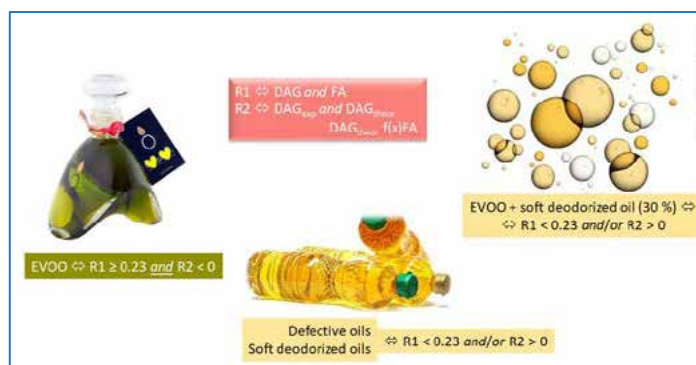


Figure - R1 and R2: two factors to confirm the absence/presence of soft deodorized oils in extra virgin olive oil (EVOO).

## BIBLIOGRAPHY

- [1] Pérez-Camino, M. C., Cert, A., Romero-Segura, A., Cert-Trujillo, R., & Moreda, W. Alkyl esters of fatty acids a useful tool to detect soft deodorized olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6740-6744 (2008).

*This abstract is based on the published article R.B. Gómez-Coca, M.C. Pérez-Camino, A. Bendini, T. Gallina Toschi, W. Moreda. Olive oil mixtures. Part two: detection of soft deodorized oil in extra virgin olive oil through diacylglycerol determination. Relationship with free acidity. Food Chemistry, 330 (2020).*

# MISCELE DI OLIO D'OLIVA. PARTE SECONDA: RILEVAMENTO DELL'OLIO DEODORATO IN CONDIZIONI BLANDE IN OLIO EXTRAVERGINE DI OLIVA MEDIANTE DETERMINAZIONI DEI DIACILGLICEROLI. RAPPORTO CON L'ACIDITÀ LIBERA

Raquel B. GÓMEZ-COCA<sup>a,✉</sup>, María del Carmen PEREZ-CAMINO<sup>a</sup>, Alessandra BENDINI<sup>b</sup>, Tullia GALLINA TOSCHI<sup>b</sup>, Wenceslao MOREDA<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Instituto de la Grasa (CSIC), Campus Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, Spain; <sup>b</sup>Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Bologna, Italy

✉Corresponding author. Sevilla, Spain. Phone: +34954611550, e-mail address: raquel.coca@ig.csic.es

## INTRODUZIONE

La verifica dell'autenticità dell'olio di oliva è uno dei temi più attuali ed urgenti. La varietà di adulteranti da considerare è ampia ed include, oltre agli oli vegetali di diversa origine botanica, anche oli di oliva con difetti sensoriali nel caso degli oli extra vergini di oliva. Inoltre, gli oli con difetti sensoriali possono essere oggetto di alcune pratiche fraudolente, come la deodorazione gentile, il cui obiettivo è di ridurre la presenza di tali aromi sgradevoli, rendendoli adatti ad una miscelazione non dichiarata con oli extra vergini di oliva (EVOO).

Diversamente dalla deodorazione convenzionale, che è attuata attraverso una distillazione in corrente di vapore a 180-250°C [1], la deodorazione gentile, preceduta o no da neutralizzazione chimica, avviene a bassa temperatura. L'aggiunta di olio deodorato gentile all'olio EVOO è di difficile individuazione per due motivi: i) le condizioni applicate per la deodorazione gentile, in particolare per quanto concerne la temperatura di trattamento, non portano a significativa formazione dei traccianti tipici della raffinazione, come gli stigmastadieni o gli acidi grassi polinsaturi con insaturazioni coniugate ii) anche se alcune tecniche analitiche sono state appositamente sviluppate, i risultati si sono rivelati a volte contraddittori.

Questo studio è stato focalizzato in modo specifico su due fattori matematici calcolati sulla base della relazione esistente tra la concentrazione di digliceridi (DAG) e dell'acidità libera nei campioni sospetti, per mettere in evidenza la presenza di deodorati gentili in oli EVOO autentici.

In virtù della relazione esistente fra l'acidità libera e la concentrazione di DAG, che viene meno quando l'olio è sottoposto ad un processo di raffinazione, è possibile ipotizzare la presenza di oli deodorati gentili applicando tali fattori matematici basati su questi due parametri analitici.

## RISULTATI

Per confermare l'assenza di olio deodorato gentile in olio EVOO sono stati proposti due fattori matematici che, per gli oli EVOO genuini devono essere: un valore uguale o maggiore di 0,23 per il fattore R1 ( $10 \times \text{acidità libera}/\text{DAG}_{\text{sperimentale}}$ ), un valore negativo per il fattore R2 ( $\text{DAG}_{\text{sperimentale}} - \text{DAG}_{\text{teorico}}$ ).

In questo studio si è dimostrato come tale approccio possa essere utile per svelare la miscelazione fraudolenta qualora l'olio deodorato gentile sia presente per almeno il 30% della miscela (vedere la relativa Figura).



**Figura** - R1 e R2: fattori utilizzati per confermare l'assenza o la presenza di oli deodorati gentili in oli extra vergini di oliva (EVOO).

#### BIBLIOGRAFIA

- [1] Pérez-Camino, M. C., Cert, A., Romero-Segura, A., Cert-Trujillo, R., & Moreda, W. Alkyl esters of fatty acids a useful tool to detect soft deodorized olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6740-6744 (2008).

Questo abstract è basato sull'articolo pubblicato R.B. Gómez-Coca, M.C. Pérez-Camino, A. Bendini, T. Gallina Toschi, W. Moreda. Olive oil mixtures. Part two: detection of soft deodorized oil in extra virgin olive oil through diacylglycerol determination. Relationship with free acidity. *Food Chemistry*, 330 (2020).

# COMPLIANCE WITH EU VS. EXTRA-EU LABELLED GEOGRAPHICAL PROVENANCE IN VIRGIN OLIVE OILS: A RAPID UNTARGETED CHROMATOGRAPHIC APPROACH BASED ON VOLATILE COMPOUNDS

Rosa PALAGANO, Enrico VALLI, Chiara CEVOLI, Alessandra BENDINI✉, Tullia GALLINA TOSCHI

Department of Agricultural and Food Sciences, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Bologna, Italy  
✉Corresponding Author: Piazza Gabriele Goidanich, 47521 Cesena (FC), Italy. Phone: +390547338121  
E-mail address: alessandra.bendini@unibo.it

## INTRODUCTION

For extra virgin (EVOOs) and virgin olive oils (VOOs) commercialized within the EU, it is mandatory to specify the geographical provenance of the product on the label [1]. However, it is not available an official analytical method to prove the conformity of the label-declared geographical origin [2]. Several analytical methods (e.g. traditional chromatographic techniques for the determination of triacylglycerol, sterols, and volatile compounds) and rapid and innovative instrumental approaches (e.g. optical and spectroscopic: NIR, MIR, RAMAN, NMR) have been investigated to find valuable tools for the purposes of authentication [3,4,5].

Among these, the application of flash gas chromatography (FGC) combined with multivariate data analysis was recently used to verify the compliance of the geographic origin declared in the label of VOOs reporting promising results ("100% Italian" vs "non-100% Italian").

Following these preliminary results, the aim of this work was to evaluate the potentiality of FGC combined with an untargeted multivariate data analysis for the rapid discrimination of 210 EVOOs and VOOs according to geographical provenance (EU member states vs extra-EU countries).

Two different classification techniques, one linear (Partial Least Square-Discriminant Analysis, PLS-DA) and one non-linear (Artificial Neural Network, ANN) were tested. To evaluate the classification ability, the data set was divided into training (55%), validation (20%), and external validation test (25%) sets.

## RESULTS

Satisfactory results (see table) were achieved for both statistical approaches: PLS-DA reported percentages of samples correctly classified of 89% and 81% for EU and extra-EU samples, respectively, while for ANN, the percentages were 92% and 88%, respectively. These results confirm the powerful of the FGC combined with multivariate untargeted data analysis to discriminate EVOOs and VOOs of different origin, leading to the possibility to verify compliance with the labelled geographical provenance (EU vs extra-EU).

**Table** - Results in terms of percentages in cross-validation and external validation obtained applying two different statistical techniques (PLS-DA and ANN) for confirming the geographical origin of samples.

Statistical technique	Category	Cross validation (%)	External validation (%)
PLS-DA	EU	91.2	88.5
	Extra-EU	91.1	80.8
ANN	EU	91.2	88.5
	Extra-EU	91.1	80.8

## BIBLIOGRAPHY

- [1] Commission implementing regulation (Eu) No 29/2012 of 13 January 2012 on marketing standards for olive oil and following amendments. Official Journal of European Journal, L 12, 14-21.

- [2] Conte, L., Bendini, A., Valli, E., Lucci, P., Moret, S., Maquet, A., et al. Olive oil quality and authenticity: A review of current EU legislation, standards, relevant methods of analyses, their drawbacks, and recommendations for the future. *Trends in Food Science & Technology*, 105, 483-493, (2019).
- [3] García-González, D. L., Luna, G., Morales, M. T., & Aparicio, R. Stepwise geographical traceability of virgin olive oils by chemical profiles using artificial neural network models. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111, 1003-1013 (2009).
- [4] Bajoub, A., Medina-Rodríguez, S., Hurtado-Fernández, E., Ajal, E. A., Ouazzani, N., Fernández-Gutiérrez, et al. A first approach towards the development of geographical origin tracing models for North Moroccan olive oils based on triacylglycerols profiles. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118, 1223-1235 (2016).
- [5] Valli, E., Bendini, A., Berardinelli, A., Ragni, L., Riccò, B., Grossi, M., et al. Rapid and innovative instrumental approaches for quality and authenticity of olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118, 1601-1619, (2016).

*This abstract is based on the published article R. Palagano, E. Valli, C. Cevoli, A. Bendini, T. Gallina Toschi. Compliance with EU vs. extra-EU labelled geographical provenance in virgin olive oils: A rapid untargeted chromatographic approach based on volatile compounds. LWT - Food Science and Technology 130, 109566 (2020).*

## **VERIFICA DELLA CONFORMITÀ DELL'INDICAZIONE DI ORIGINE EUROPEA ED EXTRA-EUROPEA NEGLI OLI VERGINI DI OLIVA: UN APPROCCIO RAPIDO CROMATOGRAFICO DI TIPO UNTARGETED BASATO SUI COMPOSTI VOLATILI**

**Rosa PALAGANO, Enrico VALLI, Chiara CEVOLI, Alessandra BENDINI✉, Tullia GALLINA TOSCHI**  
 Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Bologna, Italia  
 ✉Corresponding Author: Piazza Gabriele Goidanich, 47521 Cesena (FC), Italy. Phone: +390547338121  
 E-mail address: alessandra.bendini@unibo.it

### INTRODUZIONE

Per gli oli extra vergini (EVOO) e vergini di oliva (VOO) commercializzati all'interno dell'UE, è obbligatorio specificare in etichetta la provenienza geografica del prodotto [1]. Tuttavia, non esiste un metodo analitico ufficiale per dimostrare la conformità dell'origine geografica dichiarata in etichetta [2]. A tale scopo, sono stati studiati diversi approcci analitici (es. tecniche cromatografiche tradizionali per la determinazione di trigliceridi, steroli e composti volatili) e metodi strumentali rapidi e innovativi (ottici e spettroscopici: NIR, MIR, RAMAN, NMR) [3,4,5]. Tra questi, l'applicazione della flash gascromatografia (FGC) combinata con l'analisi multivariata dei dati è stata recentemente utilizzata per verificare la conformità dell'origine geografica dichiarata nell'etichetta di VOO, riportando risultati promettenti ("100% italiano" vs "non 100% italiano").

A seguito di questi risultati preliminari, lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare le potenzialità della tecnologia "untargeted" FGC combinata con analisi multivariata dei dati al fine di discriminare in maniera rapida 210 EVOO e VOO in base alla provenienza geografica (Stati membri dell'UE vs Paesi extra-UE).

Sono state testate due diverse tecniche di classificazione, una lineare (Partial Least Square-Discriminant Analysis, PLS-DA) ed una non lineare (Artificial Neural Network, ANN). Al fine di valutare la capacità di classificazione, il set di dati è stato suddiviso in uno di allenamento (55%, "training"), in uno di validazione (20%, "validation") ed infine in un terzo di convalida esterna (25%, "external validation").

### RISULTATI

Sono stati ottenuti risultati soddisfacenti (vedere tabella) per entrambi gli approcci statistici: la PLS-DA ha riportato percentuali di campioni correttamente classificati pari all'89% e 81%, rispettivamente, per i campioni UE ed extra-UE; per ANN, invece, le percentuali sono state più elevate, rispettivamente del 92% e 88% (test set). Tali risultati confermano le potenzialità dell'FGC combinata all'analisi multivariata

dei dati per discriminare EVOO e VOO di diversa origine, permettendo di verificare la conformità della provenienza geografica dichiarata in etichetta (UE vs extra-UE).

**Tabella** - Risultati in termini di percentuali in cross-validation ed in validazione esterna ottenuti applicando due differenti tecniche statistiche (PLS-DA e ANN) per confermare l'origine geografica dei campioni.

Tecnica statistica	Categoria	Validazione interna (%)	Validazione esterna (%)
PLS-DA	EU	91,2	88,5
	Extra-EU	91,1	80,8
ANN	EU	91,2	88,5
	Extra-EU	91,1	80,8

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Commission implementing regulation (Eu) No 29/2012 of 13 January 2012 on marketing standards for olive oil and following amendments. Official Journal of European Journal, L 12, 14-21
- [2] Conte, L., Bendini, A., Valli, E., Lucci, P., Moret, S., Maquet, A., et al. Olive oil quality and authenticity: A review of current EU legislation, standards, relevant methods of analyses, their drawbacks, and recommendations for the future. Trends in Food Science & Technology, 105, 483-493, (2019)
- [3] García-González, D. L., Luna, G., Morales, M.T., & Aparicio, R. Stepwise geographical traceability of virgin olive oils by chemical profiles using artificial neural network models. European Journal of Lipid Science and Technology, 111, 1003-1013 (2009).
- [4] Bajoub, A., Medina-Rodríguez, S., Hurtado-Fernández, E., Ajal, E. A., Ouazzani, N., Fernández-Gutiérrez, et al. A first approach towards the development of geographical origin tracing models for North Moroccan olive oils based on triacylglycerols profiles. European Journal of Lipid Science and Technology, 118, 1223-1235 (2016).
- [5] Valli, E., Bendini, A., Berardinelli, A., Ragni, L., Riccò, B., Grossi, M., et al. Rapid and innovative instrumental approaches for quality and authenticity of olive oils. European Journal of Lipid Science and Technology, 118, 1601-1619, (2016).

Questo abstract è basato sull'articolo pubblicato R. Palagano, E. Valli, C. Cevoli, A. Bendini, T. Gallina Toschi. Compliance with EU vs. extra-EU labelled geographical provenance in virgin olive oils: A rapid untargeted chromatographic approach based on volatile compounds. LWT - Food Science and Technology 130, 109566 (2020).

# PROFILING VERSUS FINGERPRINTING ANALYSIS OF SESQUITERPENE HYDROCARBONS FOR THE GEOGRAPHICAL AUTHENTICATION OF EXTRA VIRGIN OLIVE OILS

Beatriz QUINTANILLA-CASAS<sup>a,b</sup>, Sofia BERTIN<sup>a</sup>, Kerstin LEIK<sup>a</sup>, Julen BUSTAMANTE<sup>a,b</sup>, Francesc GUARDIOLA<sup>a,b</sup>, Enrico VALLI<sup>c</sup>, Alessandra BENDINI<sup>c</sup>, Tullia GALLINA TOSCHI<sup>c</sup>, Alba TRES<sup>a,b,✉</sup>, Stefania VICHI<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Departament de Nutrició, Ciències de l'Alimentació i Gastronomia, Campus de l'Alimentació de Torribera, Universitat de Barcelona (UB), Santa Coloma de Gramenet, Spain; <sup>b</sup>Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB), Universitat de Barcelona (UB), Santa Coloma de Gramenet, Spain; <sup>c</sup>Department of Agricultural and Food Sciences, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, Bologna, Italy

✉Corresponding Author: Phone: +34934020916, E-mail address: atres@ub.edu

## INTRODUCTION

EU Regulation No 29/2012 states as mandatory the country of origin in labeling extra virgin olive oil (EVOO) and virgin olive oil (VOO) to inform the consumer regarding their geographical origin. The verification of the geographical origin is then crucial to protect consumers from misleading information. Despite the large number of studies performed, specific markers are still not available.

Recent studies reveal that sesquiterpene hydrocarbons (SHs) might act as valid markers to address the genetic and geographical origin of EVOO and VOO [1]. These semi-volatile olive metabolites comprise a wide number of compounds that are highly dependent on the olive trees' cultivar and growing area, and scarcely influenced by other factors such as oil extraction conditions and storage. Additionally, the determination of such markers implies low cost, short times and automatable procedures. Concerning the analytical approach, the emerging strategy in food authentication consists in finding specific patterns in highly dimensional analytical data, known as fingerprints, which might be based directly in raw analytical signals such as a chromatogram [2].

When these distinctive patterns are specific to a given food category, such as a particular geographical origin, they can be used to verify its authenticity. Under the fingerprinting approach, peak identification and quantitation are not necessary and, since the full analytical data is used, more information is considered and misclassifications are revealed easier.

The present study aims to evaluate sesquiterpene hydrocarbons as markers of EVOO geographical origin and to compare the discrimination efficiency of targeted profiling and fingerprinting approaches.

## RESULTS

A prospective study focused on the suitability of SHs as EVOO geographical markers and the evaluation of the best approach for data processing, was carried out on 82 EVOOs from seven countries, analyzed by Headspace Solid Phase Microextraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry (HS-SPME-GC-MS). Classification models were developed by Partial Least Square-Discriminant Analysis (PLS-DA) and internally validated (leave 10%-out in cross-validation). The percentage of correct classification was higher for the fingerprinting (100%) than for the profiling approach (45.5-100%) (Table). Also, samples from the same olive cultivar coming from different countries were correctly classified according to the geographical origin. Moreover, as the SH fingerprint holds similar traits among samples from sub-regions within a country, it sets a promising scenario for downscaling the model to smaller regions of interest such as PDO or PGI oils. These results confirm the suitability of SHs as EVOO geographical markers and establish the fingerprinting as the most efficient approach for the treatment of SH analytical data with this purpose up to date.

Overall, we can conclude that the successfulness of the model is the result of a conjunction of factors: i) sesquiterpenes are suitable geographical markers, ii) the use of the sesquiterpene fingerprint permits to exploit all the information obtained during the analysis in contrast of the target approach, and iii) PLS-DA finds features in the sesquiterpene fingerprint that are common between samples from the same region even if they belong to different cultivars.

**Table** - Misclassification results of classification models (PLS-DA) developed with extra virgin olive oil sesquiterpene profile (34 variables; log10, mean centering and scaling to unit variance; 8 latent variables) and extra virgin olive oil sesquiterpene fingerprint (22,203 variables; 1st derivative, log10, mean centering and scaling to unit variance; 6 latent variables), cross-validated by leave 10%-out.

	Members	Correct classification	HRV	SVN	ESP	ITA	GRC	MAR	TUR	No class (YPred<0.5)	RMSEcv
Profiling <sup>a</sup>											
HRV	11	45.5%	5	0	0	0	0	0	0	6	0.28
SVN	8	100%	0	8	0	0	0	0	0	0	0.22
ESP	17	58.8%	0	0	10	0	0	0	0	7	0.38
ITA	15	53.3%	0	0	1	8	0	0	0	5	0.39
GRC	6	50%	0	0	0	0	3	0	0	3	0.25
MAR	15	93.3%	0	0	0	0	0	14	0	1	0.26
TUR	10	100%	0	0	0	0	0	0	10	0	0.17
Total	82	73.7%	5	8	11	8	3	14	10	22	
Fingerprinting <sup>b</sup>											
HRV	11	100%	11	0	0	0	0	0	0	0	0.25
SVN	8	100%	0	8	0	0	0	0	0	0	0.23
ESP	17	100%	0	0	17	0	0	0	0	0	0.32
ITA	15	100%	0	0	0	15	0	0	0	0	0.33
GRC	6	100%	0	0	0	0	6	0	0	0	0.23
MAR	15	100%	0	0	0	0	0	15	0	0	0.26
TUR	10	100%	0	0	0	0	0	0	10	0	0.19
Total	82	100%	11	8	17	15	6	15	10	0	

Abbreviations used: HRV: Croatia, SVN: Slovenia, ESP: Spain, ITA: Italy, GRC: Greece, MAR: Morocco; TUR: Turkey; RMSEcv: Root Mean Square Error of cross-validation.

<sup>a</sup> Profiling PLS-DA model: Q<sup>2</sup>: 0.351; ANOVA p-value: 0.013;

<sup>b</sup> Fingerprinting PLS-DA model Q<sup>2</sup>: 0.561; ANOVA p-value: 1.6<sup>e-18</sup>.

## BIBLIOGRAPHY

- [1] S. Vichi, A. Tres, B. Quintanilla-Casas, J. Bustamante, F. Guardiola, In: M. Kontominas (Ed.). Authentication and detection of adulteration of olive oil. New York, Nova Science Publishers, (2018).
- [2] L.A. Berrueta, R.M. Alonso-Salces, R.M. Heberger, Supervised pattern recognition in food analysis. Journal of Chromatography A, 1158, 196–214 (2007).

*This abstract is based on the published article B. Quintanilla-Casas, S. Bertin, K. Leik, J. Bustamante, F. Guardiola, E. Valli, A. Bendini, T. Gallina Toschi, A. Tres, S. Vichi, Profiling versus fingerprinting analysis of sesquiterpene hydrocarbons for the geographical authentication of extra virgin olive oils. Food Chemistry 307, 125556 (2020).*

# PROFILO ANALITICO ED E IMPRONTA DIGITALE DI IDROCARBURI SESQUITERPENICI PER L'AUTENTICAZIONE GEOGRAFICA DEGLI OLI EXTRA VERGINI DI OLIVA

Beatriz QUINTANILLA-CASAS<sup>a,b</sup>, Sofia BERTIN<sup>a</sup>, Kerstin LEIK<sup>a</sup>, Julen BUSTAMANTE<sup>a,b</sup>, Francesc GUARDIOLA<sup>a,b</sup>, Enrico VALLI<sup>c</sup>, Alessandra BENDINI<sup>c</sup>, Tullia GALLINA TOSCHI<sup>c</sup>, Alba TRES<sup>a,b,✉</sup>, Stefania VICHI<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Departament de Nutrició, Ciències de l'Alimentació i Gastronomia, Campus de l'Alimentació de Torribera, Universitat de Barcelona (UB), Santa Coloma de Gramenet, Spain; <sup>b</sup>Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA-UB), Universitat de Barcelona (UB), Santa Coloma de Gramenet, Spain; <sup>c</sup>Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Bologna, Italia

✉Corresponding Author: Phone: +34934020916, E-mail address: atres@ub.edu

## INTRODUZIONE

Per informare il consumatore in merito all'origine geografica dell'olio extra vergine di oliva (EVOO) e dell'olio vergine di oliva (VOO), il Regolamento UE n. 29/2012 stabilisce come obbligatoria la specifica



del paese di origine in etichetta. La verifica della provenienza geografica è fondamentale per tutelare i consumatori da informazioni fuorvianti. Nonostante il gran numero di studi effettuati, non sono ancora disponibili marcatori specifici. Studi recenti rivelano che gli idrocarburi sesquiterpenici (SH) potrebbero fungere da validi traccianti dell'origine genetica e geografica di EVOO e VOO [1]. Questi metaboliti semivolatili dell'oliva comprendono un ampio numero di composti che dipendono fortemente dalla cultivar e dall'area di coltivazione degli olivi, mentre sono poco influenzati da altri fattori come le condizioni di estrazione dell'olio ed il suo stoccaggio. Inoltre, la determinazione di tali marcatori implica costi contenuti, tempi brevi e procedure automatizzabili. Per quanto riguarda l'approccio analitico, la strategia emergente nell'autenticazione degli alimenti consiste nel trovare modelli specifici per dati presenti nelle cosiddette impronte digitali, basati direttamente su segnali analitici grezzi come quelli relativi ai cromatogrammi [2]. Quando questi modelli distintivi sono specifici di una determinata categoria di alimenti, come una particolare origine geografica, possono essere utilizzati per verificarne l'autenticità. In tale approccio "fingerprint", l'identificazione e la quantificazione dei picchi non sono necessarie e, poiché vengono utilizzati tutti i dati, vengono considerate più informazioni e di conseguenza le classificazioni errate vengono rivelate più facilmente. Il presente studio mira a valutare gli idrocarburi sesquiterpenici come traccianti dell'origine geografica e a confrontare l'efficienza di discriminazione degli approcci di profilazione e di *fingerprinting*.

**Tabella** - Risultati dei modelli di classificazione (PLS-DA) sviluppati sulla base del profilo sesquiterpenico di oli extra vergine di oliva (34 variabili; log10, centratura media e scala alla varianza unitaria; 8 variabili latenti) ed impronta sesquiterpenica dell'olio extra vergine di oliva (22.203 variabili; derivata 1°, log10, centratura media e ridimensionamento alla varianza unitaria; 6 variabili latenti), con tecnica cross-validated by leave 10%-out.

	Membr	Corretta classificazione	HRV	SVN	ESP	ITA	GRC	MAR	TUR	No classe (YPred < 0.5)	RMSEcv
Profilazione <sup>a</sup>											
HRV	11	45.5%	5	0	0	0	0	0	0	6	0.28
SVN	8	100%	0	8	0	0	0	0	0	0	0.22
ESP	17	58.8%	0	0	10	0	0	0	0	7	0.38
ITA	15	53.3%	0	0	1	8	0	0	0	5	0.39
GRC	6	50%	0	0	0	0	3	0	0	3	0.25
MAR	15	93.3%	0	0	0	0	0	14	0	1	0.26
TUR	10	100%	0	0	0	0	0	0	10	0	0.17
Total	82	73.7%	5	8	11	8	3	14	10	22	
Fingerprint <sup>b</sup>											
HRV	11	100%	11	0	0	0	0	0	0	0	0.25
SVN	8	100%	0	8	0	0	0	0	0	0	0.23
ESP	17	100%	0	0	17	0	0	0	0	0	0.32
ITA	15	100%	0	0	0	15	0	0	0	0	0.33
GRC	6	100%	0	0	0	0	6	0	0	0	0.23
MAR	15	100%	0	0	0	0	0	15	0	0	0.26
TUR	10	100%	0	0	0	0	0	0	10	0	0.19
Totale	82	100%	11	8	17	15	6	15	10	0	

Abbreviazioni utilizzate: HRV: Croazia, SVN: Slovenia, ESP: Spagna, ITA: Italia, GRC: Grecia, MAR: Marocco; TUR: Turchia; RMSEcv: Root Mean Square Error della cross-validation.

<sup>a</sup> Modello PLS-DA per profilatura: Q<sup>2</sup>: 0,351; ANOVA p-value: 0,013;

<sup>b</sup> Modello PLS-DA per fingerprint: Q<sup>2</sup>: 0,561; ANOVA p-value: 1,6<sup>e-18</sup>.

## RISULTATI

Questo studio è stato condotto su 82 EVOO provenienti da sette paesi, analizzandone lo spazio di testa mediante micro-estrazione in fase solida accoppiata a gascromatografia-spettrometria di massa (HS-SPME-GC-MS). I modelli di classificazione, convalidati internamente (mediante la tecnica "leave 10%-out in cross-validation"), sono stati sviluppati mediante l'analisi discriminante dei minimi quadrati parziali (PLS-DA). La percentuale di classificazione corretta è risultata più alta per l'approccio fingerprint (100%) rispetto a quello di profilazione (45,5-100%) (Tabella). Inoltre, campioni della stessa cultivar di

olive provenienti da paesi diversi sono stati correttamente classificati in base alla provenienza geografica. Poiché l'impronta digitale basata sui SH contiene tratti simili tra campioni provenienti da sotto-regioni all'interno di una stessa nazione, si reputa tale approccio promettente anche per dimensionare il modello a regioni di interesse più limitate, come ad esempio nel caso di oli DOP o IGP. Questi risultati confermano l'idoneità degli SH come marcatori geografici per EVOO ed evidenziano come l'approccio fingerprint appaia particolarmente efficiente. Nel complesso, si può ritenere come il successo del modello sia il risultato di una combinazione di fattori: i) i sesquiterpeni sono traccianti geografici idonei, ii) l'uso dell'impronta digitale dei sesquiterpeni consente di sfruttare tutte le informazioni ottenute durante l'analisi al contrario dell'approccio di profilazione convenzionale iii) attraverso la PLS-DA è possibile evidenziare caratteristiche nell'impronta sesquiterpenica che sono comuni tra campioni della stessa regione anche se prodotti da cultivar diverse.

#### BIBLIOGRAFIA

- [1] S. Vichi, A. Tres, B. Quintanilla-Casas, J. Bustamante, F. Guardiola, In: M. Kontominas (Ed.). Authentication and detection of adulteration of olive oil. New York, Nova Science Publishers, (2018).
- [2] L.A. Berrueta, R.M. Alonso-Salces, R.M. Heberger, Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 1158, 196-214 (2007).

*Questo abstract è basato sull'articolo pubblicato B. Quintanilla-Casas, S. Bertin, K. Leik, J. Bustamante, F. Guardiola, E. Valli, A. Bendini, T. Gallina Toschi, A. Tres, S. Vichi, Profiling versus fingerprinting analysis of sesquiterpene hydrocarbons for the geographical authentication of extra virgin olive oils. Food Chemistry 307, 125556 (2020).*