

***Analytical solutions addressing olive oil
quality issues***

***Soluzioni analitiche indirizzate alla possibile
risoluzione di problemi di qualità***

ASSESSMENT OF VIRGIN OLIVE OIL STABILITY DURING STORAGE BY ¹H-NMR FINGERPRINTING AND CHEMOMETRICS

Rosa María ALONSO-SALCES^{a,b,✉}, Blanca GALLO^c, Aimaré Ayelén POLIERO^b, Gabriela Elena VIACAVA^{a,b}, Diego Luis GARCÍA-GONZÁLEZ^d, Tullia GALLINA TOSCHI^e, Maurizio SERVILI^f, Luis Ángel BERRUETA^c

^aConsejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina; ^bUniversidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP), Argentina; ^cUniversidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Spain; ^dInstituto de la Grasa (CSIC), Spain; ^eDepartment of Agricultural and Food Sciences, Alma Mater Studiorum – Università di Bologna, Bologna, Italy; ^fUniversity of Perugia (UNIPG), Italy. ✉Corresponding Author: Email: rosamaria.alonsosalces@gmail.com

INTRODUCTION

The quality of virgin olive oil (VOO) is related to its oxidative stability, storage, and sensory and nutritional properties. VOO oxidation leads to the formation of off-flavour substances, degradation of its bio-active antioxidants and accumulation of degradation compounds, causing the loss of its sensory and health-promoting qualities, its commercial value and consumer acceptance [1]. VOO resistance to oxidation depends on its chemical composition and its exposure to pro-oxidant factors such as oxygen, light and temperature. VOO stability during storage was studied by an untargeted metabolomics approach based on ¹H-NMR fingerprinting and pattern recognition simulating normal shelf life conditions throughout its commercialization.

RESULTS

A representative set of VOOs covering the full range of possible chemical compositions were exposed to light (500 lux for 12h/day) at 25°C for 12 months or stored in the dark at 25°C, 30°C and 35°C for 24 months. Multivariate data analysis of the ¹H-NMR spectra of the oil samples provided classification models to evaluate VOO freshness (Table I) and to verify the light exposure of the VOO during storage (Table II), as well as regression models to determine VOO storage time (Table III) and tentatively the best before date of a fresh VOO (Table IV).

Table I - PLS-DA models to discriminate between olive oils according to their freshness.¹

PLS-DA model	Data	PLS-comp	Boundary	Class ²	Class code	n	p	%R	%P-CV	%P-EV
K ₂₇₀	All	4	0.6663	non-fresh	0	137	0.22	82	80	
				fresh	1	483	0.78	81	80	100
Total phenol	All	4	0.5261	non-fresh	0	226	0.36	89	85	
				fresh	1	394	0.64	85	82	89
(E,E)-2,4-decadienal	All	5	0.6248	non-fresh	0	175	0.28	90	84	
				fresh	1	445	0.72	83	82	100
K ₂₇₀	Light	5	0.5186	non-fresh	0	104	0.40	96	91	
				fresh	1	156	0.60	90	87	100
Total phenol	Light	4	0.5205	non-fresh	0	103	0.40	87	83	
				fresh	1	157	0.60	88	84	94
(E)-2-decenal	Light	3	0.5720	non-fresh	0	119	0.46	89	85	
				fresh	1	141	0.54	84	84	100
K ₂₇₀	Dark	3	0.6205	non-fresh	0	91	0.24	90	86	
				fresh	1	289	0.76	88	84	100
Total phenol	Dark	2	0.5993	non-fresh	0	126	0.33	89	85	
				fresh	1	254	0.67	83	81	78
(E,E)-2,4-decadienal	Dark	5	0.5718	non-fresh	0	126	0.33	94	86	
				fresh	1	254	0.67	91	89	100

¹Abbreviations: n, number of samples; PLS-comp, number of PLS components selected; p, prior probability; %R, % of recognition ability; %P-CV, % of prediction ability in 3-fold crossvalidation; %P-EV, % of prediction ability in the external validation.

²Freshness criteria: K₂₇₀<0.220 in fresh VOO stored in the light or K₂₇₀<0.190 in fresh VOO in the dark; total phenol content >250 mg/kg in fresh VOO; (E)-2-decenal content <410 µg/kg in fresh VOO (rancid defect threshold); (E,E)-2,4-decadienal content <354 µg/kg in fresh VOO (rancid defect threshold).

Table II - PLS-DA models to discriminate between olive oils according to their exposure to light or dark conditions.¹

PLS-DA model	Data	PLS-comp	Boundary	Class	Class code	n	p	%R	%P
Exposure	All	3	0.5106	dark	0	360	0.58	92	91
				light	1	260	0.42	95	94

¹Abbreviations: n, number of samples; PLS-comp, number of PLS components selected; p, prior probability; %R, % of recognition ability; %P, % of prediction ability; 3-fold crossvalidation.

Table III - PLS-R models to determine the storage time of a VOO kept at 25°C in the light or at different temperatures (25°C, 30°C and 35°C) in the dark.¹

PLS-R model ²	Data ³	n	PLS-comp	R-cal	R-val	RMSEP	Mean of Y _{ref} -Y _{pred}	Confidence interval (95%)
NMR buckets (X) vs time (Y)	Light (0-12 months)	257	6	0.966	0.953	1.1	0.895	0.084
NMR buckets (X) vs time (Y)	Dark, 25°C (0-24 months)	260	5	0.946	0.926	2.8	2.27	0.21
NMR buckets (X) vs time (Y)	Dark, 30°C (0-24 months)	80	4	0.941	0.886	3.8	3.03	0.52
NMR buckets (X) vs time (Y)	Dark, 35°C (0-24 months)	80	5	0.958	0.925	3.1	2.61	0.39

¹Abbreviations: n, number of samples; PLS-comp, number of PLS components; R-cal, correlation coefficient in calibration; R-val, correlation coefficient in validation; RMSEP, root mean square error in the prediction; 3-fold crossvalidation.

²X matrix = normalized intensities of the NRM buckets; Y matrix = storage time (month).

³Samples used to build the model.

Table IV - PLS-R models to determine the best before date of a VOO stored in the light at 25°C.¹

PLS-R model ²	Data ³	n	PLS-comp	R-cal	R-val	RMSEP	Mean of Y _{actual} -Y _{pred}	Confidence interval (95%)
NMR buckets (X) vs time (Y)	Light (time 0)	22	2	0.933	0.841	0.71	0.59	0.18

¹Abbreviations: n, number of samples used to build the model; PLS-comp, number of PLS components; R-cal, correlation coefficient in calibration; R-val, correlation coefficient in validation; RMSEP, root mean square error in the prediction; leave-one-out crossvalidation.

²X matrix = normalized intensities of the NRM buckets; Y matrix = time (month) exceeding the threshold value of K₂₇₀.

³Samples used to build the model.

These predictive models disclosed the chemical compounds responsible for the compositional changes in VOO due to hydrolytic and oxidative degradation taking place during its shelf life. The appearance of ¹H signals of hydroperoxides (primary oxidation products) and the decrease of those signals present in fresh VOO due to phenolic compounds, fatty acids, squalene and native (*E*)-2-hexenal revealed its oxidative degradation. The emergence of low intensity ¹H signals of saturated aldehydes meant that the secondary oxidation process has started at a low rate and yield. The decrease of the ¹H signals of triacylglycerides and *sn*-1,2-diacylglycerides, and the increase of *sn*-1,3-diacylglycerides indicated that hydrolytic degradation and diacylglyceride isomerisation was occurring. However, none of the signals present in the ¹H-NMR spectrum of VOOs at time zero disappeared during VOO storage over one year in the light and two years in the dark. On the one hand, these results corroborated the high oxidative stability of VOO at moderate temperatures, even exposed to light, and dismiss any significant changes which could render its consumption hazardous. On the other hand, this study confirmed that light and increasing temperature enhance VOO degradation during its shelf life. Hence, the use of packaging that protects VOO from light (e.g. dark glass bottles), minimal headspace and the control of temperature during transport, distribution and storage of VOO are highly recommended to guarantee VOO quality from production to consumption.

BIBLIOGRAPHY

- [1] S. Esposto, A. Taticchi, S. Urbani, R. Selvaggini, G. Veneziani, I. Di Maio, B. Sordini, M. Servili, Effect of light exposure on the quality of extra virgin olive oils according to their chemical composition. *Food Chemistry* 229, 726-733 (2017).

This abstract is based on the published article R.M. Alonso-Salces, B. Gallo, M.I. Collado, A. Sasía-Arriba, G.E. Viacava, D.L. García-González, T. Gallina Toschi, M. Servili, L.A. Berrueta, ¹H-NMR fingerprinting and supervised pattern recognition to evaluate the stability of virgin olive oil during storage. Food Control 123, 107831 (2021).

VALUTAZIONE DELLA STABILITÀ DELL'OLIO D'OLIVA VERGINE IN CONSERVAZIONE MEDIANTE PROFILO ¹H-NMR E CHEMIOMETRIA

Rosa María ALONSO-SALCES^{a,b,✉}, Blanca GALLO^c, Aimaré Ayelén POLIERO^b, Gabriela Elena VIACAVA^{a,b}, Diego Luis GARCÍA-GONZÁLEZ^d, Tullia GALLINA TOSCHI^e, Maurizio SERVILI^f, Luis Ángel BERRUETA^c

^aConsejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina; ^bUniversidad Nacional de Mar del Plata (UNMdP), Argentina; ^cUniversidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Spain; ^dInstituto de la Grasa (CSIC), Spain; ^eDipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Alma Mater Studiorum – Università di Bologna, Bologna, Italia; ^fUniversity of Perugia (UNIPG), Italy.

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

INTRODUZIONE

La qualità dell'olio vergine di oliva (VOO) è correlata alle sue proprietà sensoriali e nutrizionali, alla stabilità ossidativa e alla sua conservazione. L'ossidazione del VOO porta alla formazione di sostanze sgradevoli, alla degradazione dei suoi antiossidanti bioattivi e all'accumulo di composti di degradazione, causando la perdita delle sue qualità sensoriali e salutari, del suo valore economico e dell'accettazione da parte dei consumatori [1]. La resistenza del VOO all'ossidazione dipende dalla sua composizione chimica e dalla sua esposizione a fattori pro-ossidanti come ossigeno, luce e temperatura. La stabilità del VOO durante la conservazione è stata studiata mediante un approccio metabolomico non mirato basato sull'impronta digitale ¹H-NMR e sul riconoscimento del modello che simula le normali condizioni di conservazione durante la sua commercializzazione.

RISULTATI

Un set rappresentativo di VOO che copra l'intera gamma di possibili composizioni chimiche è stato esposto alla luce (500 lux per 12 ore/giorno) a 25°C per 12 mesi o conservato al buio a 25°C, 30°C e 35°C per 24 mesi. L'analisi multivariata dei dati ottenuti dagli spettri ¹H-NMR dei campioni di VOO ha fornito modelli di classificazione utili per valutare la freschezza di VOO (Tabella I), per verificarne l'esposizione alla luce durante la conservazione (Tabella II), nonché modelli di regressione per determinare il tempo di conservazione (Tabella III) e provvisoriamente la data di scadenza (Tabella IV).

Tabella I - Modelli PLS-DA per discriminare gli oli di oliva in base alla loro freschezza.¹

Modello PLS-DA	Dati	PLS-comp	Boundary	Class ²	Codice classe	n	p	%R	%P-CV	%P-EV
K ₂₇₀	Tutti	4	0.6663	non-fresco	0	137	0.22	82	80	
				fresco	1	483	0.78	81	80	100
Fenoli totali	Tutti	4	0.5261	non-fresco	0	226	0.36	89	85	
				fresco	1	394	0.64	85	82	89
(E,E)-2,4-decadienale	Tutti	5	0.6248	non-fresco	0	175	0.28	90	84	
				fresco	1	445	0.72	83	82	100
K ₂₇₀	Luce	5	0.5186	non-fresco	0	104	0.40	96	91	
				fresco	1	156	0.60	90	87	100
Fenoli totali	Luce	4	0.5205	non-fresco	0	103	0.40	87	83	
				fresco	1	157	0.60	88	84	94
(E)-2-decenale	Luce	3	0.5720	non-fresco	0	119	0.46	89	85	
				fresco	1	141	0.54	84	84	100
K ₂₇₀	Buio	3	0.6205	non-fresco	0	91	0.24	90	86	
				fresco	1	289	0.76	88	84	100
Fenoli totali	Buio	2	0.5993	non-fresco	0	126	0.33	89	85	
				fresco	1	254	0.67	83	81	78
(E,E)-2,4-decadienale	Buio	5	0.5718	non-fresco	0	126	0.33	94	86	
				fresco	1	254	0.67	91	89	100

¹Abbreviazioni: n, numero di campioni; PLS-comp, numero di componenti PLS selezionati; p, probabilità a priori; %R, % di capacità di riconoscimento; %P-CV, % di capacità di previsione nella validazione incrociata (effettuata 3 volte); %P-EV, % di capacità di previsione nella validazione esterna.

²Criteri di freschezza: K₂₇₀<0,220 in VOO fresco conservato alla luce o K₂₇₀<0,190 in VOO fresco al buio; contenuto totale di fenoli >250 mg/kg in VOO fresco; Contenuto di (E)-2-decenale <410 µg/kg in VOO fresco (soglia del difetto di rancido); contenuto di (E,E)-2,4-decadienale <354 µg/kg in VOO fresco (soglia del difetto di rancido).

Tabella II - Modelli PLS-DA per discriminare gli oli di oliva in base alla loro esposizione a condizioni di luce o buio¹

Modello PLS-DA	Dati	PLS-comp	Boundary	Classe	Codice classe	n	p	%R	%P
Esposizione	Tutti	3	0.5106	buio	0	360	0.58	92	91
				luce	1	260	0.42	95	94

¹Abbreviazioni: n, numero di campioni; PLS-comp, numero di componenti PLS selezionati; p, probabilità a priori; %R, % di capacità di riconoscimento; %P, % di capacità di previsione in validazione incrociata (effettuata 3 volte).

Tabella III - Modelli PLS-R per determinare il tempo di conservazione di un VOO tenuto a 25°C alla luce o a diverse temperature (25°C, 30°C e 35°C) al buio¹

Modello PLS-R ²	Dati ³	n	PLS-comp	R-cal	R-val	RMSEP	Media di Yref-Ypred	Intervallo di confidenza (95%)
NMR buckets (X) vs time (Y)	Luce (0-12 mesi)	257	6	0.966	0.953	1.1	0.895	0.084
NMR buckets (X) vs time (Y)	Buio, 25°C (0-24 mesi)	260	5	0.946	0.926	2.8	2.27	0.21
NMR buckets (X) vs time (Y)	Buio, 30°C (0-24 mesi)	80	4	0.941	0.886	3.8	3.03	0.52
NMR buckets (X) vs time (Y)	Buio, 35°C (0-24 mesi)	80	5	0.958	0.925	3.1	2.61	0.39

¹Abbreviazioni: n, numero di campioni; PLS-comp, numero di componenti PLS; R-cal, coefficiente di correlazione in calibrazione; R-val, coefficiente di correlazione in validazione; RMSEP, errore quadratico medio nella previsione; 3 volte la convalida incrociata.

²Matrice X = intensità normalizzate dei bucket NRM; Matrice Y = tempo di conservazione (mese).

³Campioni utilizzati per costruire il modello.

Tabella IV - Modelli PLS-R per determinare la data di scadenza di un VOO conservato alla luce a 25°C¹

Modello PLS-R ²	Dati ³	n	PLS-comp	R-cal	R-val	RMSEP	Media di Yactual-Ypred	Intervallo di confidenza (95%)
NMR buckets (X) vs time (Y)	Luce (tempo 0)	22	2	0.933	0.841	0.71	0.59	0.18

¹Abbreviazioni: n, numero di campioni utilizzati per costruire il modello; PLS-comp, numero di componenti PLS; R-cal, coefficiente di correlazione in calibrazione; R-val, coefficiente di correlazione in validazione; RMSEP, errore quadratico medio nella previsione; validazione incrociata leave-one-out.

²Matrice X = intensità normalizzate dei bucket NRM; Matrice Y = tempo (mese) superamento del valore di soglia di K₂₇₀.

³Campioni utilizzati per costruire il modello.

Questi modelli predittivi hanno evidenziato i composti responsabili dei cambiamenti nella composizione di VOO dovuti alla degradazione idrolitica e ossidativa che ha luogo durante la sua conservazione. La comparsa di segnali ¹H di idroperossidi (prodotti di ossidazione primari) e la diminuzione di quei segnali presenti nel VOO fresco a causa di composti fenolici, acidi grassi, squalene e (*E*)-2-esenale nativo hanno rivelato la sua degradazione ossidativa. L'emergere di segnali ¹H a bassa intensità di aldeidi saturi ha messo in luce come il processo di ossidazione secondaria iniziasse a bassa velocità e resa. La diminuzione dei segnali ¹H di trigliceridi e *sn*-1,2-digliceridi e l'aumento di *sn*-1,3-digliceridi indicava la degradazione idrolitica e l'isomerizzazione dei diacilgliceroli. Tuttavia, nessuno dei segnali presenti nello spettro ¹H-NMR dei VOO al tempo zero risultava scomparso durante la conservazione per oltre un anno alla luce e due anni al buio. Questi risultati, da un lato, avvalorano l'elevata stabilità ossidativa del VOO a temperature moderate e alla luce, e smentiscono eventuali alterazioni significative che potrebbero rendere pericoloso il suo consumo. D'altra parte, questo studio ha confermato come la luce e l'aumento della temperatura incrementino la degradazione del VOO durante la sua conservazione. Pertanto, l'uso di imballaggi che proteggano i VOO dalla luce (ad es. bottiglie di vetro scuro), lo spazio di testa minimo e il controllo della temperatura durante il trasporto, la distribuzione e lo stoccaggio, sono altamente raccomandati per garantire la qualità dalla produzione al consumo.

BIBLIOGRAFIA

- [1] S. Esposto, A. Taticchi, S. Urbani, R. Selvaggini, G. Veneziani, I. Di Maio, B. Sordini, M. Servili, Effect of light exposure on the quality of extra virgin olive oils according to their chemical composition. *Food Chemistry* 229, 726-733 (2017).

Questo abstract è basato sull'articolo pubblicato R.M. Alonso-Salces, B. Gallo, M.I. Collado, A. Sasía-Arriba, G.E. Viacava, D.L. García-González, T. Gallina Toschi, M. Servili, L.A. Berrueta, ¹H-NMR fingerprinting and supervised pattern recognition to evaluate the stability of virgin olive oil during storage. *Food Control* 123, 107831 (2021).