Progetto sottomisura 16.2
PSR 2014-2020 della Regione Toscana

Titolo progetto PIF di riferimento	**Mangiare Corto per Guardare Lontano**
Titolo e acronimo progetto sottomisura 16.2	**BASIQ** La Bottega Alimentare della Sostenibilità - Identità - Qualità

Filiera/Settore di riferimento prevalente: Filiera corta/multifiliera
Priorità e Focus area prevalente: **Priorità 3**. Promuovere l'organizzazione della filiera agroalimentare […]; **Focus area 3a**. Migliore integrazione dei produttori primari nella filiera agroalimentare attraverso i **regimi di qualità**, la promozione dei prodotti nei mercati locali, le **filiere corte** […];
Forma di aggregazione del partenariato: ATS
Denominazione del soggetto responsabile del progetto di cooperazione: **Cuoco a domicilio & Co. Snc**

RELAZIONE SCIENTIFICA PATNER ATTUATOTORE A9

Breve presentazione del/i soggetto/i scientifico/i partecipante/i

. Informazioni generali del soggetto responsabile del partenariato del progetto relativo alla sottomisura 16.2

Denominazione dell'impresa responsabile del progetto	Università di Siena - DSV, Gruppo di ricerca di tracciabilità e caratterizzazione della filiera agroalimentare.
Persona fisica referente del progetto	Giampiero Cai
Via e numero	Via Mattioli 4
Città - Provincia	Siena
C.A.P.	53100
Telefono	+39 0577 232895
Fax	+39 0577 232860
Indirizzo E-mail	giampiero.cai@unisi.it
Indirizzo PEC	amministrazionedsv@pec.it

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SIENA – Le attività previste nell'ambito del progetto BASIQ prevedono la cooperazione di gruppi di ricercatori dei Dipartimenti di Scienze della Vita (DSV) e Scienze Fisiche, della Terra e dell'Ambiente (DSFTA) con differenti specializzazioni:

***- DSV, Gruppo di ricerca di tracciabilità e caratterizzazione della filiera agroalimentare*.**

Il DSV si pone come obiettivo l'avanzamento delle conoscenze dei meccanismi fondamentali dell'evoluzione biologica e della biodiversità, dei processi vitali a livello organismico, cellulare e molecolare e dei meccanismi fisiopatologici, con ricadute applicative per la gestione, fruizione e conservazione della biodiversità, la salvaguardia e la caratterizzazione della diversità delle risorse agroalimentari. La linea di ricerca sull'agroalimentare consta di diversi filoni così suddivisi:

1) sviluppo di metodi molecolari di controllo ed autenticità dei prodotti alimentari sia freschi che processati mediante caratterizzazione attraverso l'utilizzo di marcatori specifici;

2) caratterizzazione genetica e sviluppo di database molecolari di specie arboree da frutto (castagno, olivo, melo, pero, albicocco, mandorlo, pesco) per la tutela del germoplasma autoctono;

3) caratterizzazione delle proprietà nutraceutiche dei frutti autoctoni;

Il **Prof. Giampiero Cai** è Professore Associato e docente di "Botanica" e "Biotecnologie vegetali" per il corso di laurea in Biotecnologie e di "Interazioni tra cellule vegetali e ambiente" per la laurea specialistica in Ecologia e Sostenibilità Ambientale.

Di seguito un elenco dei progetti finanziati negli ultimi 5 anni:

▪ Progetto "Toscolata" finanziato con bando regionale PRAF 2012-2015 MISURA 1.2. e) avviso pubblico per progetti di ricerca nel settore agroalimentare.

▪ Progetto "Tosco Magnatum Trace" finanziato con bando regionale PRAF 2012-2015 MISURA 1.2. e avviso pubblico per progetti di ricerca nel settore agroalimentare.

▪ Progetto "Nutri-Camp" finanziato dall'Amministrazione Provinciale di Siena per effettuare una indagine dei componenti nutraceutici presenti all'interno delle varietà autoctone di piante da frutto della provincia di Siena.

▪ Progetto Integrato di Filiera "Modolivi". Gestione razionale delle risorse umane e naturali in moderne tipologie di oliveti e dei sottoprodotti della lavorazione delle olive. Finanziato nell'ambito della Misura 124 PSR 2007-2013.

- *DSFTA - Gruppo di Ecodinamica* (www.unisi.ecodynamics.it)

Specializzato in a) modellistica ambientale (approccio scienze sistemiche) per la formalizzazione di criteri generali e standard operativi per la definizione di soluzioni innovative di sviluppo sostenibile; b) monitoraggio e valutazione ambientale per il calcolo di indicatori di sostenibilità con applicazioni concrete a processi e sistemi fisici reali. Metodologie - come la LCA Life Cycle Assessment, Ecological Footprint, eMergy Evaluation, Ecosystem Services Evaluation – sono state utilizzate in numerosi casi applicativi che includono filiere agroalimentari e zootecniche, sia di tipo industriale convenzionale, sia tradizionali biologiche, biodinamiche o naturali, in alcuni casi localizzate nel territorio di pertinenza del PIF proposto (e.g. Cinta Senese, Razza Maremmana, Pecorino di Pienza, Olio EVO IGP biologico, Chianti Colli Senesi, Nobile di Montepulciano, Vernaccia di San Gimignano).

Il **Prof. Simone Bastianoni** è Professore Ordinario di Scienze Chimiche Ambientali. Docente di "Analisi del Ciclo di Vita e Certificazione Ambientale" e "Sostenibilità" per il corso di laurea specialistica in "Ecotossicologia e Sostenibilità Ambientale".

Principali azioni di UNISI nel progetto BASIQ:

Fase 3 - Valorizzazione di prodotto: #SOSTENIBILITÀ

Questa fase prevede l'elaborazione di una procedura di Life Cycle Assessment di prodotti selezionati estesa ai vari operatori delle relative filiere ortofrutticole e zootecniche. In particolare saranno esaminate le produzioni primarie e le attività di trasformazione e confezionamento. Dalla LCA sarà dedotto il valore di Carbon Footprint dei prodotti e individuazione azioni di mitigazione degli impatti che includono modifiche al comportamento e investimenti mirati.

Fase 4 - Valorizzazione di prodotto: #IDENTITÀ

Questa fase prevede l'elaborazione di una procedura di tracciabilità di alimenti selezionati dalle principali filiere di produzione. In particolare saranno utilizzati metodi di fingerprinting genetico già messi a punto in precedenti lavori che, attraverso diverse classi di marcatori molecolari, offrono la possibilità di verificare l'autenticità del prodotto in termini di genotipi utilizzati non solo sulle materie prime, ma anche su prodotti alimentari finiti.

Fase 5 - Valorizzazione di prodotto: #QUALITÀ

Questa fase prevede l'elaborazione di una procedura di caratterizzazione nutraceutica degli alimenti selezionati dalle filiere ortofrutticole. In particolare saranno individuati principali parametri nutraceutici per determinare la capacità antiossidante degli alimenti e indagato il livello di sicurezza.

Fase 6 – Attività di comunicazione-condivisione-promozione-disseminazione

Questa azione ha tre finalità: a) Comunicazione interna: attuare il trasferimento di conoscenza e innovazione da ricercatori e tecnici verso gli operatori della filiera allo scopo di attuare l'innovazione di processo-organizzazione; b) Comunicazione all'esterno: esporre i risultati delle elaborazioni in forma semplice e chiara allo scopo di orientare le decisioni del consumatore e fare della sostenibilità-tracciabilità-qualità dei prodotti un valore aggiunto anche in una prospettiva di mercato; c) Disseminazione dei risultati del progetto e dell'innovazione di processo-organizzazione con l'obiettivo di promuovere la replicabilità dell'esperienza in nuove realtà della Toscana.

[Fase 3] ***#sostenibilità***: consiste nella definizione di azioni per realizzare prodotti a basso impatto ambientale (e.g. low carbon o carbon neutral). Sulla base della metodologia LCA, saranno stimati i potenziali impatti di tutti i processi della filiera, dalla produzione delle materie prime alla trasformazione, fino alla commercializzazione del prodotto finito e confezionato. Gli impatti monitorati saranno principalmente riferiti alla categoria Carbon Footprint (ISO 14067), ovvero l'insieme delle emissioni di gas serra in atmosfera generate direttamente e indirettamente dai processi di filiera (unità: kg CO_2eq per unità di prodotto). L'elaborazione di analisi LCA, in collaborazione con tutti i soggetti che aderiscono alla filiera, sarà un'occasione di crescita e acquisizione di competenze per le aziende e garantirà la coerenza delle azioni di mitigazione-compensazione degli impatti e la concreta quantificazione degli obiettivi di riduzione di tali impatti.

Le azioni previste nella fase 3 del progetto BASIQ hanno come obiettivo quello di valutare la sostenibilità delle filiere produttive al fine di valorizzare i prodotti/processi individuati attraverso la metodologia Life Cycle Assessment (LCA).
Secondo il piano di lavoro redatto, questa fase è composta da:
- Definizione filiere
- LCI – Life Cycle Inventory
- LCI – Life Cycle Assessement.

OBIETTIVO: REALIZZAZIONE DI N.18 DIAGRAMMI DI FLUSSO RELATIVI AL CICLO DI VITA DEI PRODOTTI SELEZIONATI (12 DI FILIERA CORTA E 6 DI SPECIE AUTOCTONE).

RISULTATI OTTENUTI:

In accordo con il capofila sono stati individuati i 18 prodotti di cui valutare, attraverso l'Analisi del Ciclo di Vita, la *Carbon Footprint*. Questi 18 prodotti agroalimentari trasformati sono realizzati a partire da prodotti agricoli e carni di filiera corta e/ autoctoni. I prodotti di filiera corta e autoctoni sono poi trasformati da Cuoco a Domicilio presso il laboratorio a Monteroni d'Arbia e venduti presso la Bottega di Stigliano.
I 18 prodotti analizzati sono stati:

1. Confettura extra di verdacchie;
2. Pici con grano varietà Senator Cappelli;
3. Cantucci;
4. Pomarola (con pomodori da varietà autoctone);
5. Confettura extra di cipolle rosse;
6. Confettura extra di mele cotogne;
7. Ragù di Chianina;
8. Ragù di Suino - razza Cinta Senese;
9. Tonno di suino - razza Cinta Senese;
10. Confettura extra di Corbezzoli;
11. Confettura extra di pomodori verdi;
12. Passata di pomodoro varietà Fragola;
13. Estratto di melograna;
14. Confettura extra di zucca gialla e vaniglia;
15. Fagioli lessi;
16. Passata di pomodoro varietà Quarantino;
17. Amatriciana;
18. Sugo all'Aglione.

Per la modellizzazione della filiera produttiva sono state effettuate una serie di visite/incontri presso l'azienda trasformatrice (Cuoco a Domicilio):

- confettura extra di verdacchie c/o Cuoco a Domicilio (trasformazione) – 21/11/2016
- tonno di suino di razza Cinta Senese c/o Cuoco a Domicilio (trasformazione) – 15/03/2017
- ragù di Chianina c/o Cuoco a Domicilio (trasformazione) – 15/03/2017
- ragù di suino di razza Cinta senese c/o Cuoco a Domicilio (trasformazione) – 15/03/2017
- pici c/o Cuoco a Domicilio (trasformazione) – 01/06/2017
- pomarola c/o Cuoco a Domicilio (trasformazione) – 15/09/2017
- confettura extra di cipolle c/o Cuoco a Domicilio (trasformazione) – 15/09/2017
- cantucci c/o Cuoco a Domicilio (trasformazione) – 28/08/2017
- confettura extra di mele cotogne c/o Cuoco a Domicilio (trasformazione) - 14/12/2017
- confettura extra di cipolle rosse c/o Cuoco a Domicilio (trasformazione) - 14/12/2017
- confettura extra di corbezzoli c/o Cuoco a Domicilio (trasformazione) - 17/05/2018
- confettura extra di pomodori verdi, c/o cuoco a domicilio (trasformazione) - 17/05/2018
- confettura extra di zucca gialla e vaniglia extra c/o cuoco a domicilio (trasformazione) - 17/05/2018
- confettura extra di pomodori verdi c/o cuoco a domicilio (trasformazione) - 17/05/2018
- passata di pomodoro varietà fragola c/o cuoco a domicilio (trasformazione) - 17/05/2018
- estratto di Melagrana c/o Cuoco a Domicilio (trasformazione) - 17/05/2018
- fagioli c/o Cuoco a Domicilio (trasformazione) - 21/05/2018
- sugo all'amatriciana c/o Cuoco a Domicilio (trasformazione) - 20/07/2018
- sugo all'aglione c/o Cuoco a Domicilio (trasformazione) - 20/07/2018
- passata di pomodoro varietà quarantino c/o Cuoco a Domicilio (trasformazione) - 20/07/2018

L'output di questi workshop è rappresentato dalla realizzazione del diagramma di flusso generico per i prodotti riportato in Figura 1.

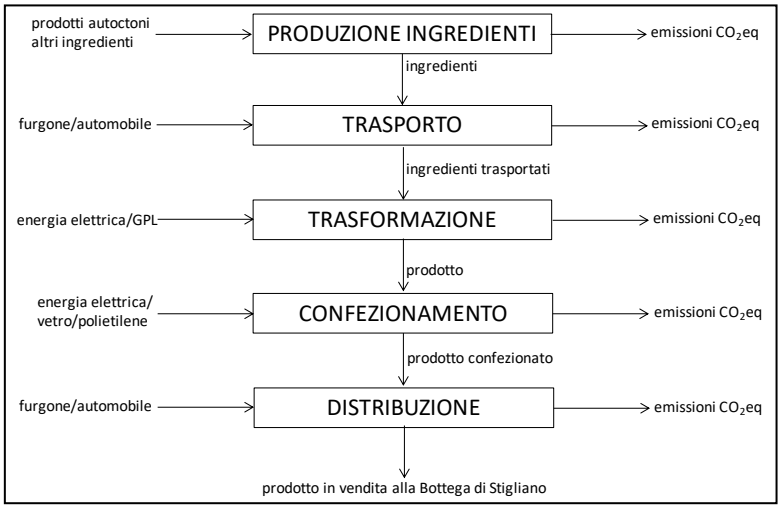


Figura 1 - Diagramma di flusso dei 18 prodotti agroalimentari

Mentre per la modellizzazione dei prodotti necessari alla produzione dei trasformati agroalimentari, ovvero prodotti autoctoni e/o di filiera corta, sono stati realizzati diagrammi di flusso specifici al fine di agevolare la modellizzazione del loro ciclo di vita e individuare così tutti gli input di materia ed energia coinvolti. I prodotti autoctoni e/o di filiera corta rappresentano l'ingrediente principale dei prodotti agroalimentari finali di cui è stata valutata la sostenibilità attraverso l'LCA sono stati divisi in due macro-categorie: prodotti agricoli (e.g. verdacchie, pomodori, grano duro varietà senator Cappelli, cipolle ecc) e prodotti di allevamento (e.g. carne bovina di Razza Chianina, carne suina di Razza Cinta Senese). In Figura 2 è riportato il diagramma di flusso per i prodotti agricoli mentre in Figura 3 per gli ingredienti di origine animale.

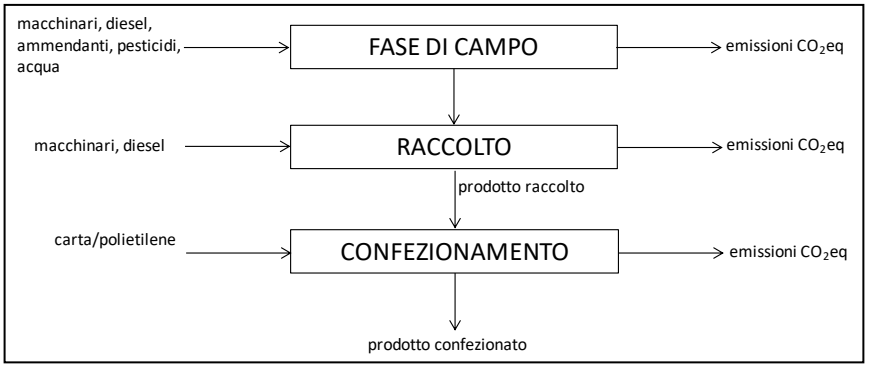


Figura 2 - Diagramma di flusso della produzione dei prodotti autoctoni agricoli

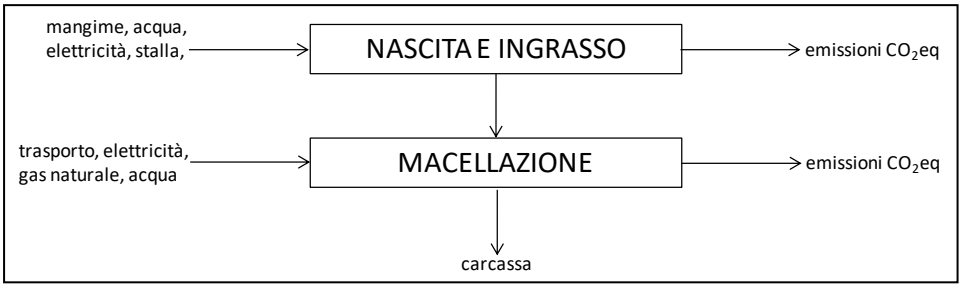


Figura 3 - Diagramma di flusso della produzione dei prodotti a filiera corta di origine animale

OBIETTIVO: REALIZZAZIONE DI N.18 INVENTARI DEI PRODOTTI SELEZIONATI (12 DI FILIERA CORTA E 6 DI SPECIE AUTOCTONE).

RISULTATI OTTENUTI:

A partire dai modelli realizzati nell'azione 3.1 sono stati effettuati una serie di incontri/visite presso i produttori primari al fine di raccogliere i dati necessari ad implementare l'LCI:

- verdacchie c/o Podere San Giusto (coltivazione varietà autoctone) – 21/11/2016
- suino razza Cinta Senese c/o azienda agricola Fierli (produzione mangimi, allevamento e macellazione) – 10/05/2017
- Chianina c/o azienda agricola Fierli (produzione mangimi, allevamento e macellazione) – 10/05/2017
- pomodori c/o Podere San Giusto (coltivazione varietà autoctone) – 15/09/2017
- pomodori c/o Podere San Giusto (coltivazione varietà autoctone) – 15/09/2017
- cipolle rosse c/o 4Stagioni (produzione) - 14/12/2017
- mele cotogne c/o Podere San Giusto (coltivazione varietà autoctone) 14/12/2017
- melagrana c/o Podere San Giusto (coltivazione) - 22/05/2018
- pomodori verdi c/o Podere San Giusto (coltivazione) - 22/05/2018
- zucca gialla c/o Podere San Giusto (coltivazione) - 22/05/2018
- fagioli c/o Azienda agricola Fierli (coltivazione) - 30/05/2018

Gli output di questa azione sono rappresentati dalla redazione dell'inventario di tutti e 18 i prodotti. In Tabella 1 è riportato l'inventario dei dati raccolti presso Cuoco a Domicilio relativo alla produzione di un barattolo da 180 g di confettura extra di verdacchie.

Tabella 1 - Inventario dei flussi di energia e materia coinvolti nella produzione di 1 barattolo da 180 g di confettura extra di verdacchie

INPUT/FASE		
INGREDIENTI		
verdacchie	211	g
acqua	95	g
polpa	154	g
zucchero	69	g
trasporto zucchero	103	km
limone	8	ml
trasporto limone	3	km
TRASFORMAZIONE/COTTURA		
GPL fornello	11	g
GPL forno	11	g
CONFEZIONAMENTO		
barattoli in vetro	158	g
tappo	9	g
etichetta	1	g

Mentre in Tabella 2 è riportato l'inventario relativo alla fase di raccolta delle verdacchie redatto presso l'Azienda Agricola San Giusto. In questo particolare caso non è presente l'inventario della fase di coltivazione in quanto le susine verdacchie sono spontanee e non necessitano di una particolare gestione (e.g. utilizzo di ammendanti e prodotti chimici).

Tabella 2 - Inventario dei flussi di energia e materia coinvolti nella produzione e raccolta di verdacchie

INPUT/FASE		
RACCOLTA (cassette di plastica)	3	g
TRASPORTO	30	km

Per i prodotti di allevamento (e.g. Chianina e suino di razza Cinta Senese) gli inventari sono più complessi in quanto è stato incluso il dettaglio della razione giornaliera necessario al calcolo delle emissioni dovute alle fermentazioni enteriche e alla gestione delle deiezioni. In Tabella 3 è riportato l'inventario dell'allevamento di un capo di Chianina includendo gli input necessari anche per la gestione della stalla e considerando anche il mattatoio.

Tabella 3 - Inventario dei flussi di energia e materia coinvolti nelle fasi di allevamento di un capo di Chianina

NASCITA E INGRASSO - CIBO		
allattamento - FATTRICE (fino 5°mese)	30	kg/capo
fieno	4410	kg
cereali	5040	kg
orzo	*1260*	*kg*
favino	*630*	*kg*
mais	*3150*	*kg*
nucleo	3150	kg
orzo	*945*	*kg*
favino	*220.5*	*kg*
mais	*1071*	*kg*
paglia	*472.5*	*kg*
soia	*441*	*kg*
DIESEL PER UNIFEED	32.76	kg
trasporto nucleo	31500	kgkm
acqua fattrice	8400	L
svezzamento (5° e 6°mese)		
fieno	600	kg
mais	15	kg
nucleo	15	kg
orzo	*4.5*	*kg*
favino	*1.05*	*kg*
mais	*5.1*	*kg*
paglia	*2.25*	*kg*
soia	*2.1*	*kg*
trasporto nucleo	5925	kgkm
acqua vitello	600	L
ingrasso (6°mese fino a macellazione 21°mese)	30	kg/capo
fieno	4725	kg
cereali	5400	kg
orzo	*1350*	*kg*
favino	*675*	*kg*
mais	*3375*	*kg*
nucleo	3375	kg
orzo	*1012.5*	*kg*
favino	*236.25*	*kg*
mais	*1147.5*	*kg*
paglia	*506.25*	*kg*
soia	*472.5*	*kg*
trasporto nucleo	33750	kgkm
DIESEL PER UNIFEED	35.10	L
acqua	12600	L
STALLA		
elettricità stalla	20.41	kWh
MATTATOIO		
trasporto	2923	kgkm
acqua	1925.6	L
elettricità	192.6	kWh

La stessa tipologia di Tabelle/Inventario è stata redatta per ciascuno dei prodotti analizzati.

OBIETTIVO: REALIZZAZIONE DI N.18 LCA RELATIVE AI PRODOTTI SELEZIONATI.

RISULTATI OTTENUTI:

I dati raccolti durante la Fase 3.2 del progetto sono stati implementati nel software SimaPro 8.0 al fine di stimare gli impatti generati dai prodotti alimentari selezionati. In particolare è stato stimato il quantitativo di emissioni di gas serra in atmosfera complessiva per ogni prodotto (*Carbon Footprint*).

Per ciascuno dei 18 prodotti analizzati è stata effettuata un'analisi comparativa rispetto ai corrispondenti prodotti ottenuti o da lavorazioni industriali o con materie prime provenienti da agricoltura convenzionale. In questo modo è stato possibile evidenziare i benefici, in termini di ridotto impatto ambientale, della lavorazione artigianale rispetto a quella industriale.

In principali risultati delle valutazioni hanno dimostrato:

1. i prodotti realizzati con la lavorazione artigianale hanno sempre impatti inferiori (da -90% dei fagioli a -16% del sugo all'amatriciana) rispetto alla lavorazione industriale;
2. i prodotti che derivano dalla trasformazione di prodotti di allevamento (e.g. ragù di Chianina o tonno di suino dirazza Cinta Senese) hanno impatti superiori a quelli che derivano da orto-frutta (e.g. pomodoro o melagrana);
3. per i prodotti di derivazione orto-frutta confezionati la fase che genera i maggiori impatti è sempre la fase di confezionamento.

In dettaglio i principali risultati dei prodotti analizzati:

1. **CONFETTURA EXTRA DI VERDACCHIE** l'analisi ha evidenziato che le emissioni di CO_2eq sono inferiori del 63% rispetto ad una marmellata industriale grazie all'uso di piante spontanee che non richiedono pratiche agricole intensive e il risparmio di energia grazie alla produzione artigianale. L'analisi ha altresì evidenziato come sia a tutti gli effetti il contenitore in vetro di confettura extra di verdacchie il principale responsabile delle emissioni di gas climalteranti del prodotto.
2. **PICI** è emerso che questa tipologia di pasta ha emissioni inferiori del 56% rispetto alla pasta prodotta in maniera industriale. In questo caso di studio l'LCA ha evidenziato che l'utilizzo di varietà di grano autoctone permette di risparmiare il 50% delle emissioni di gas serra rispetto alla coltivazione di grano comune. Dall'altro canto l'analisi ha individuato nell'utilizzo di elettricità per i macchinari il principale responsabile delle emissioni di gas climalteranti.
3. **CANTUCCI** l'utilizzo di materie prime di origine biologica certificata permette di risparmiare il 25% delle emissioni di CO_2eq rispetto all'utilizzo di ingredienti da agricoltura convenzionale. In questa valutazione è emerso che la fase che genera i maggiori impatti è la produzione degli ingredienti.
4. **POMAROLA** è stato verificato che l'utilizzo di varietà autoctone e la distribuzione a filiera corta permette di evitare il 78% di emissioni rispetto all'utilizzo di varietà commerciali. L'analisi ha evidenziato come il maggior responsabile di tutte le emissioni sia il contenitore in vetro utilizzato per la commercializzazione della pomarola.
5. **CONFETTURA EXTRA DI CIPOLLE** la lavorazione artigianale permette risparmio di emissioni del 33% rispetto ad una lavorazione industriale. La coltivazione delle cipolle secondo il disciplinare biologico fa sì che questa fase abbia degli impatti quasi trascurabili rispetto a tutto il ciclo di

produzione del vasetto (6%). La voce più impattante di tutto il ciclo produttivo risulta essere il vasetto in vetro in cui è commercializzata la confettura extra (52%).

6. **CONFETTURA DI MELE COTOGNE** la produzione di confettura in maniera artigianale fa sì che le emissioni generate in tutto il ciclo produttivo siano il 56% inferiori rispetto ad una confettura industriale. Le piante non subiscono alcun trattamento e i frutti vengono raccolti a mano. Le uniche emissioni sono dovute al trasporto delle cotogne dall'azienda produttrice allo stabilimento di trasformazione. Il 75% di tutte le emissioni sono dovute al vasetto in vetro in cui è confezionata la confettura extra.
7. **RAGÙ DI CHIANINA** l'analisi ha evidenziato che l'impatto maggiore è attribuibile all'allevamento (93% dell'impatto di tutto il baratto di ragù). Infatti l'impatto della carne è sempre estremamente rilevante. La carne bovina in particolare è l'alimento con il più alto impatto ambientale. Questo si deve alle emissioni biogeniche degli animali e alla produzione dei mangimi.
8. **RAGÙ DI SUINO DI RAZZA CINTA SENESE** l'allevamento brado di questa particolare razza di suino permette di evitare il 33% di emissioni rispetto all'utilizzo di carne di suino da allevamento intensivo. L'analisi ha evidenziato inoltre che il 75% delle emissioni sono dovute all'allevamento e in particolare alle fermentazioni enteriche la gestione delle deiezioni degli animali.
9. **TONNO DI SUINO DI RAZZA CINTA SENESE** l'allevamento brado di questa particolare razza di suino permette di evitare il 40% di emissioni rispetto all'utilizzo di carne di suino da allevamento intensivo. L'analisi ha evidenziato inoltre che il 45% delle emissioni sono dovute all'allevamento e in particolare alle fermentazioni enteriche la gestione delle deiezioni degli animali. Il 17% delle emissioni derivate dalla produzione di un vasetto è attribuibile al vetro.
10. **CONFETTURA EXTRA DI CORBEZZOLI** la realizzazione di questa confettura con tecnica artigianale permette di risparmiare il 47% rispetto ad una confettura industriale. La voce più impattante di tutto il ciclo produttivo è il vetro del vasetto (66%). I corbezzoli essendo spontanei non hanno impatti le uniche emissioni relative alla fase di produzione degli ingredienti sono ascrivibili ai trasporti degli ingredienti dal luogo di raccolta al laboratorio di trasformazione.
11. **CONFETTURA EXTRA DI POMODORI VERDI** l'utilizzo di pomodori da agricoltura biologica e filiera corta permette di evitare il 56% delle emissioni rispetto all'utilizzo di pomodori da agricoltura convenzionale. La produzione di pomodori è responsabile del 14% di tutte le emissioni generate nel ciclo produttivo di un vasetto di confettura extra di pomodori verdi mentre il vetro del barattolo del 67%.
12. **PASSATA DI POMODORO – VARIETÀ FRAGOLA** le emissioni evitate grazie all'utilizzo di pomodori varietà fragola rispetto all'utilizzo di pomodori commerciali permette di evitare il 52% delle emissioni per la produzione di un vasetto di passata di pomodoro. Il 60% delle emissioni di tutto il ciclo produttivo sono ascrivibili al vasetto in vetro utilizzato per il confezionamento della passata.
13. **ESTRATTO DI MELAGRANA** l'utilizzo di melagrane da agricoltura biologica consente di evitare il 16% di emissioni rispetto all'utilizzo del corrispettivo prodotto da agricoltura intensiva. Il 58% delle emissioni è dovuta al vasetto in vetro utilizzato per la commercializzazione

dell'estratto di melagrana mentre il 25% all'utilizzo di elettricità per la passatrice e la sterilizzazione dei barattoli.

14. **CONFETTURA EXTRA DI ZUCCA GIALLA E VANIGLIA** la lavorazione artigianale consente di evitare il 51% delle emissioni rispetto ad una confettura industriale. La coltivazione secondo il disciplinare biologico fasi che le emissioni dovute alla fase di coltivazione delle zucche sia responsabile del 13% di tutte le emissioni. Il vetro del vasetto è la voce più impattante di tutto il ciclo produttivo della confettura (70%).
15. **FAGIOLI LESSI** l'utilizzo di fagioli da agricoltura biologica fa sì che le emissioni dovute alla produzione di un vasetto siano il 90% inferiori rispetto allo stesso barattolo prodotto con fagioli da agricoltura convenzionale. Il vetro del vasetto è la voce più impattante di tutto il ciclo produttivo dei fagioli lessi (82%).
16. **PASSATA DI POMODORO – VARIETÀ QUARANTINO** le emissioni evitate grazie all'utilizzo di pomodori varietà quarantino rispetto all'utilizzo di pomodori commerciali permette di evitare il 57% delle emissioni per la produzione di un vasetto di passata di pomodoro. Il 68% delle emissioni di tutto il ciclo produttivo sono dovute al vasetto in vetro utilizzato per il confezionamento della passata.
17. **SUGO ALL'AMATRICIANA (CON RIGATINO DI SUINO RAZZA CINTA SENESE)** l'utilizzo di rigatino di suino di razza di cinta Senese fa sì che le emissioni siano il 16% inferiori rispetto allo stesso sugo preparato con rigatino di suino da allevamento intensivo. Le emissioni dovute alla produzione di un barattolo di sugo all'amatriciana con rigatino di suino di razza Cinta Senese sono dovute per il 41% alla produzione degli ingredienti (rigatino 27% - pomodori 6% - olio 8%) e per il 59% alla trasformazione e confezionamento. Il 47% di tutte le emissioni sono dovute al vetro del barattolo utilizzato per il confezionamento.
18. **SUGO ALL'AGLIONE DELLAVALDICHIANA** l'utilizzo di ingredienti da agricoltura biologica permette di evitare il 53% delle emissioni rispetto all'utilizzo di prodotti da agricoltura convenzionale. Il 78% di tutte le emissioni dovute alla produzione di un vasetto di sugo all'aglione della Valdichiana sono dovute alla fase di trasformazione e confezionamento di cui il 63% è ascrivibile al vasetto in vetro utilizzato per il confezionamento.

[Fase 4] ***#identità***: consiste nell'assicurare un controllo certo sull'originalità del prodotto e offrire una garanzia di autenticità come valore aggiunto per produttori e consumatori. Attraverso l'adozione di procedure di tracciabilità e caratterizzazione di un alimento, è possibile collegare inequivocabilmente prodotti finiti e materie prime utilizzate nei processi di trasformazione e individuare un riferimento territoriale certo. In questo modo è possibile evidenziare l'identità territoriale del prodotto, ovvero la sua tipicità, un autentico valore aggiunto sia per gli operatori della filiera, sia per il territorio d'origine, dove fattori storici, sociali ed economici hanno contribuito a creare un elemento di differenziazione, una unicità non riproducibile altrove.

Le azioni previste nella fase 4 del progetto BASIQ hanno come obiettivo quello elaborare una procedura di tracciabilità di alimenti selezionati dalle principali filiere di produzione. In particolare saranno utilizzati metodi di fingerprinting genetico già messi a punto in precedenti lavori che, attraverso diverse classi di marcatori molecolari, offrono la possibilità di verificare l'autenticità del prodotto in termini di genotipi utilizzati non solo sulle materie prime, ma anche su prodotti alimentari finiti.

IDENTITA' GENETICA PER LE VARIETA' ISCRITTE A REPERTORIO DI POMODORO AUTOCTONO TOSCANO

Uno dei metodi molecolari più largamente utilizzati per il riconoscimento varietale sono i marcatori SSR (Simple Sequence Repeat). Gli SSR, più semplicemente chiamati microsatelliti, sono unità ripetute n volte che presentano un elevato grado di polimorfismo. Al singolo locus SSR, il numero di unità ripetute (dinucleotidiche, trinucleotidiche, ecc.) è molto variabile tra individui della stessa specie, generando un alto numero di alleli per marcatori. Tali alleli si diversificano per la lunghezza dei frammenti. La tecnica utilizzata per la loro rilevazione è la PCR (Reazione a Catena della Polimerasi). I prodotti della PCR, ottenuti utilizzando sonde opportunatamente disegnate sulla sequenza target, vengono corsi su gel di poliacrilammide, mediante sequenziatore automatico ad elettroforesi capillare; viene così ottenuto un elettroferogramma con le dimensioni del frammento amplificato. Da ciascuna amplificazione si ottengono dei valori corrispondenti alla dimensione del DNA per quella regione, ogni accessione produce così una stringa numerica che la caratterizza, eventuali omologie ed identità genetiche con le altre accessioni possono essere così verificate.

Allo stato attuale la tecnica degli SSR si è dimostrata in grado di fornire marcatori molto affidabili per la risoluzione del problema dell'identificazione varietale e della tipizzazione genetica.

Nel presente lavoro è stato utilizzato un set di SSR per discriminare varietà di pomodoro (*Solanum lycopersicum* L.) autoctono toscano.

Ricerca bibliografica e selezione degli SSR

Nella prima parte del lavoro è stata effettuata una lunga ed accurata ricerca bibliografica al fine di identificare un set di marcatori altamente polimorfici. In particolare è stato usato il sito dell'NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) nella sezione PubMed, database di lavori scientifici, per reperire informazioni bibliografiche utili. I criteri generali utilizzati per la scelta dei marcatori sono stati quelli di scegliere marcatori con un elevato PIC (contenuto informativo di polimorfismi: misura il grado di informatività di un polimorfismo per la mappatura genetica) e H (grado di eterozigosità; misura la variabilità INTRA-popolazione). Si allegano i marcatori scelti per le analisi molecolari.

Oligo Name	Sequenza (5'-3')	Referenza
LEat016 FW	[6FAM]CCCAAATGCTATGCAATACA	M.J.M. Smulders et al., 1997; Sardaro et al. 2012)
LEat016 RV	AGTTCAGGATTGGTTTAAGGG	
LEcag003 FW	[HEX]CCGCCTCTTTCACTTGAAC	
LEcag003 RV	CCAGCGATACGATTAGATACC	
LEaat007 RV	[6FAM]CAACAGCATAGTGGAGGAGG	
LEaat007 FW	TACATTTCTCTCTCTCCCATGAG	
LEac001 FW	[HEX]TGCCTTCCATCTAACCAATC	
LEac001 RV	CTGTGGCAAATATGTCCCTAAG	
LEatt001 FW	[6FAM]CCATTGTTCCATGCAGAAG	
LEatt001 RV	CCAATGCTGATTTAATGCG	
LEcag001 FW	[HEX]ATGGTTCTTCATCAACAGCAG	
LEcag001 RV	AGAAGTATTGAGCCAAGTCGG	
LEat002 FW	[6FAM]ACTGCATTTCAGGTACATACTCTC	
LEat002 RV	ATAAACTCGTAGACCATACCCTC	
LEaat002 FW	[HEX]GCGAAGAAGATGAGTCTACAGCATAG	
LEaat002 RV	CTCTCTCCCATGAGTTCTCCTCTTC	
LEga003 Fw	[6FAM]TTCGGTTTATTCTGCCAACC	
LEga003 Rv	GCCTGTAGGATTTTCGCCTA	
LEtat002 Fw	HEX]ACGCTTGGCTGCCTCGGA	
LEtat002 Rv	AACTTTATTATTGCCACGTAGTCATGA	
SSR248 Fw	[6FAM]GCATTCGCTGTAGCTCGTTT	
SSR248 Rv	GGGAGCTTCATCATAGTAACG	
SSR47 Fw	[HEX]TCCTCAAGAAATGAAGCTCTGA	

SSR47 Rv	CCTTGGAGATAACAACCACAA
SSR603 Fw	[6FAM]GAAGGGACAATTCACAGAGTTTG
SSR603 Rv	CCTTCAACTTCACCACCACC
SSR70 Fw	[HEX]TTTAGGGTGTCTGTGGGTCC
SSR70 Rv	GGAGTGCGCAGAGGATAGAG
TOM236 Fw	[6FAM]GTTTTTTCAACATCAAAGAGCT
TOM236 Rv	GGATAGGTTTCGTTAGTGAACT
TOM210 Fw	[HEX]CGTTGGATTACTGAGAGGTTTA
TOM210 Rv	ACAAAAATTCACCCACATCG

Reperimento del materiale vegetale

Per ogni genotipo in esame (Canestrino di Lucca, Rosso di Pitigliano, Fragola, Pisanello, Quarantino, Costoluto Fiorentino) sono stati seminati 10 semi provenienti dalla banca regionale del germoplasma. In aggiunta alle varietà autoctone è stato inserito nelle analisi anche il genotipo Supersteak F1, una varietà commerciale. Le piantine sono state coltivate presso l'azienda San Paolina del CNR-IVALSA (partner del progetto). Dopo il prelievo i frutti di tutte le accessioni sono state immediatamente conservate in frigo a -80° per evitare l'innesco dei processi ossidativi che provocano la degradazione del DNA prima di procedere al suo isolamento e purificazione. In aggiunta al tessuto vegetativo per la successiva estrazione del DNA sono state utilizzate passate di pomodoro ottenute.

Estrazione del DNA

Per tutte le piante prese in esame, è stato estratto e purificato il DNA genomico a partire da 100 mg di materiale di partenza secondo il protocollo indicato nel Kit GenElute Plant Genomic DNA Miniprep della ditta Sigma-Aldrich, dopo aver effettuato l'omogenizzazione del materiale con Tissue Lyser (Qiagen). Ad estrazione conclusa, la quantità e la concentrazione del DNA estratto sono stati calcolati mediante misurazione biofotometrica (BioPhotomer 6131 Eppendorf) nell'assorbanza a 260 nm (concentrazione degli acidi nucleici) e dei rapporti A260/280 (purezza degli acidi nucleici dalle proteine) e A260/230 (purezza degli acidi nucleici da sostanze fenoliche e altri contaminanti). La qualità del DNA estratto è stata verificata con gel d'agarosio (1.2 %).

Amplificazione delle regioni SSR

Il DNA genomico, isolato e purificato è stato amplificato tramite l'utilizzo delle coppie di primer, marcate all'estremità 5' con FAM (6-carboxyfluorescein) e HEX, scelte in letteratura nei lavori di M.J.M. Smulders et al., (1997) e Sardaro et al. (2012)

SSR pomodoro

La determinazione della taglia allelica è stata effettuata tramite il sequenziatore automatico MegaBace 500 Amersham Pharmacia a 48 capillari, che possiede un detector a fluorescenza per i primer marcati. Le dimensioni dei frammenti amplificati sono stati determinati mediante il software MegaBACE Fragment Profiler 1.2 (Amersham Biosciences). Ogni accessione quindi ha così prodotto una stringa numerica che la caratterizza. Per ogni accessione tale stringa permetterà di verificare le eventuali omologie ed identità genetiche con altre accessioni permettendo di effettuare il riconoscimento della varietà.

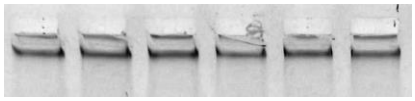
Analisi statistica dei dati

I dati ottenuti sono stati confrontati tra loro attraverso il programma NTSYS.pc 2.1 Exeter software (Rohlf, 1998) così è stato possibile calcolare una matrice di similarità delle accessioni. I coefficienti di similarità sono poi stati analizzati nel loro complesso andando a formare dei raggruppamenti (cluster) dove le varietà vengono messe vicine e lontane tra loro in funzione del livello di similarità o dissimilarità, questo raggruppamento è stato poi esposto graficamente formando un dendrogramma.

RISULTATI

Isolamento e purificazione del DNA

Il DNA di tutti i campioni è stato estratto secondo le indicazioni riportate nel kit GenElute Plant Genomic DNA Miniprep della ditta Sigma-Aldrich e analizzato mediante misurazione biofotometrica, per verificarne quantità e qualità. Per i valori di assorbanza A 260/280 tutti vicini a 1,8 indicando la purezza del campione di DNA. In figura è possibile visualizzare il DNA estratto dopo corsa elettroforetica: la banda intensa e netta indica una buona qualità del DNA.



Messa a punto del primer

I fattori che possono influenzare una reazione PCR sono molti tra i quali le concentrazioni dei primer, dei nucleotidi, di Mg, il tipo di polimerasi usata, il numero di cicli di amplificazione, il profilo termico ed il tipo di termociclatore usato. Tutti questi fattori possono influire sulla intensità delle bande e quindi sulla interpretazione del profilo di amplificazione. Il fattore che indubbiamente influisce di più sulla reazione è la temperatura di appaiamento dei primer, pochi gradi di variazione possono portare ad un abbassamento della resa, nel caso la temperatura sia superiore, o a cicli aspecifici, nel caso la stessa sia inferiore. Questo può comportare una difficile interpretazione dove non è facile distinguere le varie bande o una perdita di dati.

Scelta della temperatura di annealing

Per ogni primer è stata selezionata la temperatura ottimale servendosi di un gradiente di temperature di appaiamento, ottenuto con un termociclatore strumento che è in grado di effettuare, nella stessa reazione, cicli con diverse temperature. Visualizzando il gel di agarosio le temperature migliori vengono segnalate da una maggiore nitidezza delle bande e così selezionate. Lo stesso procedimento è utilizzato per tutte le coppie di primer in modo da individuare le migliori condizioni di PCR per ognuna.

Determinazione della taglia allelica

I campioni vengono amplificati in triplo su ogni locus microsatellite per confermare la ripetitibilità del dato e con la presenza di un campione negativo costituito da acqua sterile per verificare la presenza di contaminanti. I campioni vengono successivamente visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio come singola o doppia banda, a cui a volte si associano bande di minore intensità che vengono interpretate come artefatti dovuti probabilmente ad eventi di scivolamento dalla DNA polimerasi durante la PCR. Questa analisi non permette di determinare la dimensione esatta del frammento ma serve a valutare se la reazione di amplificazione è avvenuta. Considerando una regione microsatellite come un singolo locus, le diverse forme alleliche saranno rappresentate dal diverso numero di ripetizioni delle unità base e quindi dalla diversa lunghezza del frammento amplificato. Maggiori sono le forme alleliche per locus e maggiore sarà il polimorfismo. Spesso può succedere che un polimorfismo possa essere determinato da piccole differenze di una base ripetuta o deleta, per evidenziare anche queste piccole differenze, viene effettuata un analisi su gel di poliacrilammide mediante un sequenziatore automatico ad elettroforesi capillare (MegaBace 500 Amersham Biosciences). I dati sono presentati sotto forma di elettroferogramma dove: in ascissa troviamo le dimensioni del frammento in paia di basi (bp), in ordinata il valore di densità del picco (Figura).

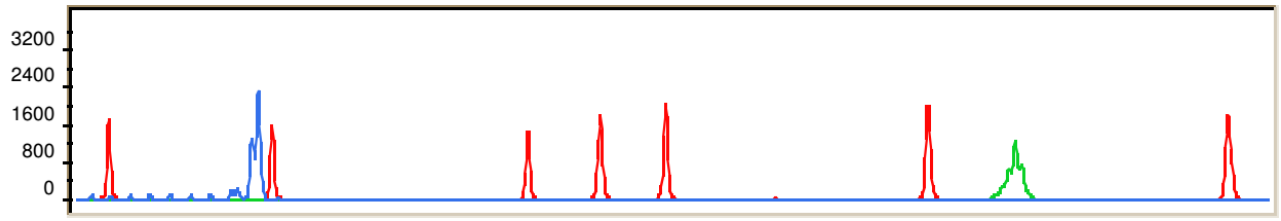
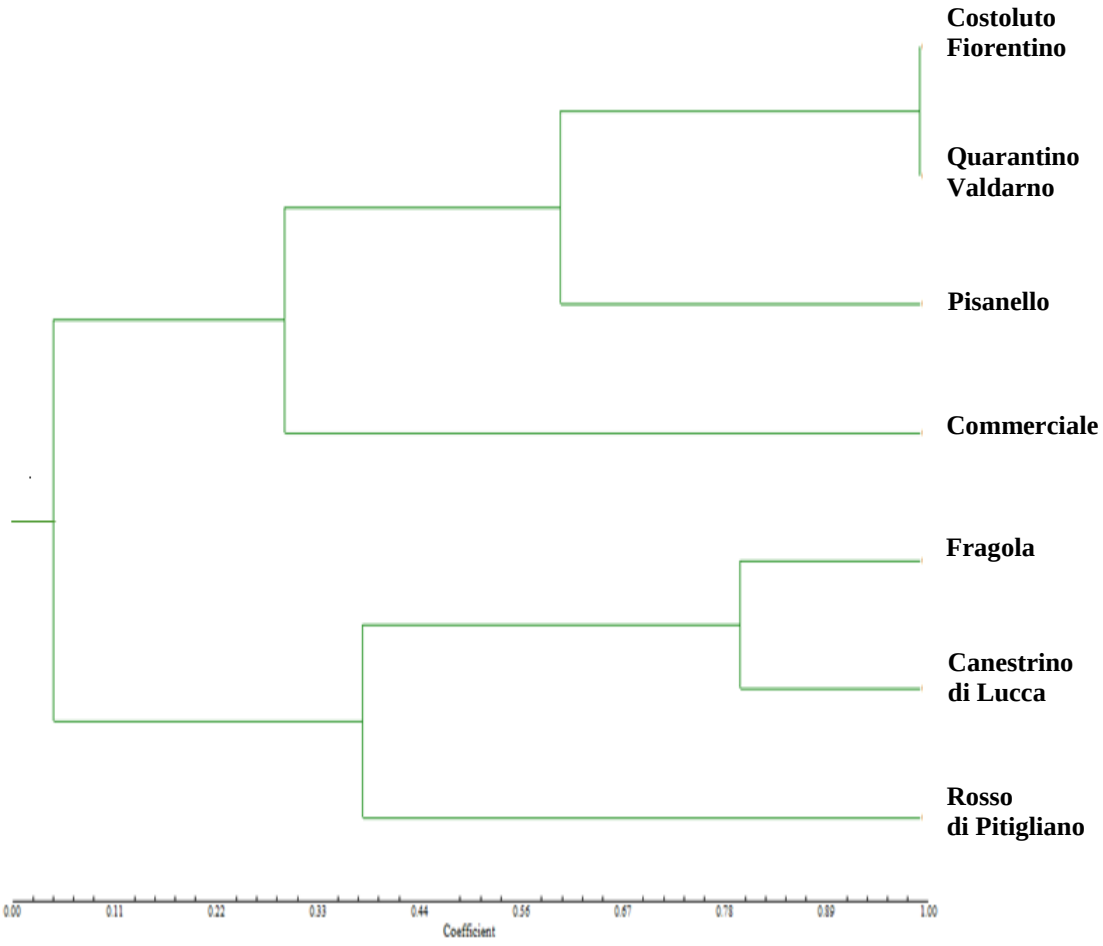


Fig. X: esempio di elettoferogramma.

I picchi si presentano con colorazioni di colori diverse a seconda della marcatura fluorometrica del primer. Non sempre però l' amplificazione di una regione sono semplici da interpretare a causa di artefatti e aspecifici, dovuti al disegno del primer che non può sempre essere ottimale e al motivo della regione microsatellite , sulla quale l'enzima Taq produce un effetto slippage, per il quale tende a slittare sulla sequenza ripetuta amplificando picchi sottostanti. Al fine di valutare la ripetibilità e quindi validare i risultati, le analisi sono state fatte da tre amplificazioni per ogni locus microsatellite. Da ciascuna amplificazione sono stati ottenuti dei valori che corrispondevano alla dimensione del DNA amplificato per quella regione. Ogni varietà ha prodotto una stringa numerica.

4.5 Analisi statistica dei dati

Le coppie di primer utilizzate per questo lavoro sono state testate sui genotipi rivelando un buon livello di polimorfismo. I dati ottenuti sono stati poi confrontati tra loro attraverso un programma statistico mediante il quale è stato possibile calcolare una matrice di similarità delle accessioni. I coefficienti di similarità sono poi stati analizzati nel loro complesso andando a formare dei raggruppamenti (cluster) dove le varietà vengono messe vicine e lontane tra loro in funzione del livello di similarità o dissimilarità. Questa operazione di raggruppamento è stata poi esposta graficamente formando un dendrogramma o albero. Di seguito è riportato il dendrogramma ottenuto dall'elaborazione dei dati delle piante afferenti ad ogni singola specie.



Come si può vedere il lavoro ha permesso di identificare con certezza i vari raggruppamenti di pomodori con profilo genetico differente. Lo stesso risultato è stato ottenuto indagando i trasformati di pomodoro monovarietali prodotti dal capofila del progetto.

ANALISI MOLECOLARI DI 6 VARIETÀ DI CILIEGIA AUTOCTONE

Ricerca bibliografica e selezione degli SSR per la ciliegia

Primer name	Fluo	Sequence
UDP96003_F	FAM	TTGCTCAAAAGTGTCGTTGC
UDP96003_R		ACACGTAGTGCAACACTGGC
AMPA114_F	FAM	TGGCATTGACTGGACAGACTAC
AMPA114_R		TGTAAAAGTTGAAACAGGCTTCC
UDAp420_F	HEX	TTCCTTGCTTCCCTTCATTG
UDAp420_R		CCCAGAACTTGATTCTGACC
BPPCT039_F	Dragonfly Orange	ATTACGTACCCTAAAGCTTCTGC
BPPCT039_R		GATGTCATGAAGATTGGAGAGG
UDP98406_F	FAM	TCGGAAACTGGTAGTATGAACAGA
UDP98406_R		ATGGGTCGTATGCACAGTCA
AMPA101_F	FAM	CAGTTTGATTTGTGTGCCTCTC
AMPA101_R		GATCCACCCTTTGCATAAAATC
UDP98409_F	HEX	GCTGATGGGTTTTATGGTTTTC
UDP98409_R		CGGACTCTTATCCTCTATCAACA
UDP98411_F	Dragonfly Orange	AAGCCATCCACTCAGCACTC
UDP98411_R		CCAAAAACCAAAACCAAAGG
UDP98412_F	FAM	AGGGAAAGTTTCTGCTGCAC
UDP98412_R		GCTGAAGACGACGATGATGA
Pchgms2_F	HEX	GTCAATGAGTTCAGTGTCTACACTC
Pchgms2_R		AATCATAACATCATTCAGCCACTGC
Pchgms4_F	Dragonfly Orange	ATCTTCACAACCCTAATGTC
Pchgms4_R		GTTGAGGCAAAAGACTTCAAT
pchgms3_F	FAM	ACGGTATGTCCGTACACTCTCCATG
pchgms3_R		CAACCTGTGATTGCTCCTATTAAAC
UDAp-414_F	HEX	CAAGCACAAGCGAACAAAAT
UDAp-414_R		GGTGGTTTCTTATCCGATG
UDAp-415_F	Dragonfly Orange	AACTGATGAGAAGGGGCTTG
UDAp-415_R		ACTCCCGACATTTGTGCTTC

Reperimento del materiale vegetale

Per ogni genotipo in esame (Morellona, Crognola, Benedetta, Carlotta, Maggiola, Moscatella) sono stati recuperati dal campo sperimentale situato al CNR di Follonica, sezione della banca regionale del germoplasma. In aggiunta alle varietà autoctone è stato inserito nelle analisi anche il genotipo commerciale rappresentato dalla varietà Durone. Dopo il prelievo le giovani foglie o germogli di tutte le accessioni sono state immediatamente conservate in frigo a -80° per evitare l'innesco dei processi ossidativi che provocano la degradazione del DNA prima di procedere al suo isolamento e purificazione.

Estrazione del DNA

Per tutte le piante prese in esame, è stato estratto e purificato il DNA genomico a partire da 100 mg di materiale di partenza secondo il protocollo indicato nel Kit GenElute Plant Genomic DNA Miniprep della ditta Sigma-Aldrich, dopo aver effettuato l'omogenizzazione del materiale con Tissue Lyser (Qiagen). Ad estrazione conclusa, la quantità e la concentrazione del DNA estratto sono stati calcolati mediante misurazione biofotometrica (BioPhotomer 6131 Eppendorf) nell'assorbanza a 260 nm (concentrazione degli acidi nucleici) e dei rapporti A260/280 (purezza degli acidi nucleici dalle proteine) e A260/230 (purezza degli acidi nucleici da sostanze fenoliche e altri contaminanti). La qualità del DNA estratto è stata verificata con gel d'agarosio (1.2 %).

Amplificazione delle regioni SSR

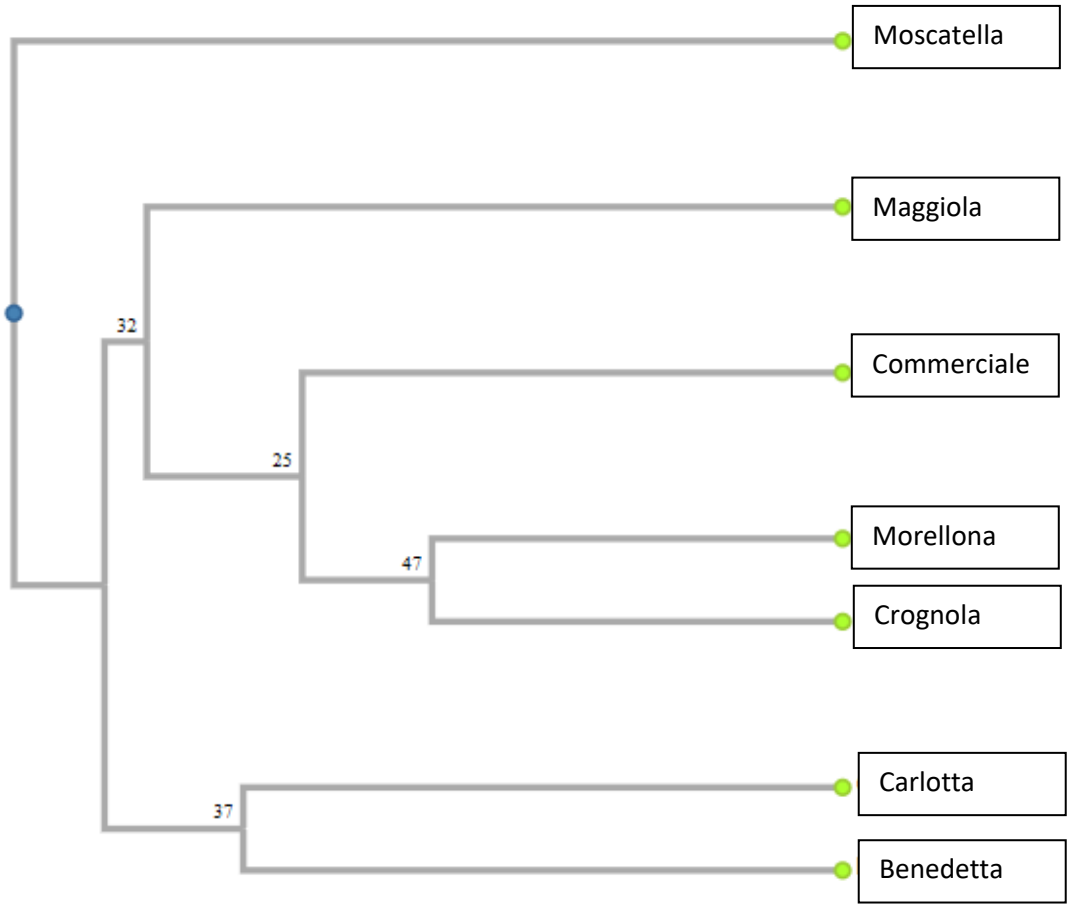
Il DNA genomico, isolato e purificato è stato amplificato tramite l'utilizzo delle coppie di primer, marcate all'estremità 5' con FAM (6-carboxyfluorescein), HEX e Dragonfly orange scelte consultando la letteratura.

Determinazione della taglia allelica

I campioni vengono amplificati in triplo su ogni locus microsatellite per confermare la ripetibilità del dato e con la presenza di un campione negativo costituito da acqua sterile per verificare la presenza di contaminanti. Il DNA amplificato viene analizzato poi attraverso una reazione di sequenziamento tramite lo strumento Sequenziatore capillare che presenta i dati sotto forma di elettroferogramma dove: in ascissa troviamo le dimensioni del frammento in paia di basi (bp), in ordinata il valore di densità del picco. I picchi si presentano con colorazioni di colori diverse a seconda della marcatura fluorometrica del primer. Al fine di valutare la ripetibilità e quindi validare i risultati, le analisi sono state fatte da tre amplificazioni per ogni locus microsatellite. Da ciascuna amplificazione sono stati ottenuti dei valori che corrispondevano alla dimensione del DNA amplificato per quella regione. Ogni varietà ha prodotto una stringa numerica.

Analisi statistica dei dati

I dati ottenuti sono stati confrontati attraverso un programma statistico mediante il quale è stato possibile calcolare una matrice di similarità delle accessioni. I coefficienti di similarità sono poi stati analizzati nel loro complesso andando a formare dei raggruppamenti (cluster) dove le varietà vengono messe vicine e lontane tra loro in funzione del livello di similarità o dissimilarità. Questa operazione di raggruppamento è stata poi esposta graficamente formando un dendrogramma o albero riportato di seguito. Come si può vedere dal dendrogramma sottostante il primer hanno permesso di identificare le diverse varietà all'interno della specie *Prunus Avium* e di attribuire ad ogni accessione un determinato profilo genetico che la contraddistingue dalle altre.



[Fase 5] ***#qualità***: consiste nel verificare e valorizzare le qualità nutrizionali dei prodotti della filiera. Con riferimento alle filiere zootecnica e ortofrutticola (quest'ultima dedicata a prodotti autoctoni con un nuovo impianto nell'ambito del progetto pilota), le analisi nutrizionali saranno finalizzate alla realizzazione di prodotti trasformati ad alto valore nutraceutico. In particolare, il percorso di valorizzazione delle risorse genetiche autoctone permetterà di evidenziarne le caratteristiche nutrizionali e salutistiche rispetto ad altre produzioni convenzionali industriali. Consiste inoltre nell'assicurare l'elevata sicurezza del prodotto finito, a questo scopo sarà applicata una procedura integrata per verificare e confermare l'assenza di alcuni dei principali pesticidi chimici o altri contaminanti ambientali e micotossine. Il rilevamento di tali parametri andrà a costituire un valore aggiunto ai prodotti in oggetto.

Le azioni previste nella fase 5 del progetto BASIQ hanno come obiettivo quello di valutare la qualità delle filiere produttive al fine di caratterizzare e valorizzare al meglio i prodotti freschi e trasformati. Tale obiettivo si svolge attraverso l'individuazione dei principali parametri nutraceutici come antiossidanti totali e polifenoli e di parametri di salubrità come la ricerca di specifiche molecole provenienti da sostanze contaminanti o da prodotti chimici utilizzati per trattamenti in agricoltura.

Secondo il piano di lavoro redatto, questa fase è composta da:
- Azioni 5.1, 5.2 e 5.3 che indagano le caratteristiche nutraceutiche su prodotti freschi e trasformati
- Azioni 5.4 e 5.5 che indagano le principali caratteristiche di salubrità su prodotti trasformati

- Azioni 5.1, 5.2 e 5.3 che indagano le caratteristiche nutraceutiche su prodotti freschi e trasformati

Per una migliore interpretazione dei risultati i report della fase di caratterizzazione nutraceutica verranno suddivisi per specie vegetale o prodotto trasformato analizzato.

Antiche varietà di pomodoro; binomio tra filiera corta e aspetti salutistici

Con lo scopo di salvaguardare il patrimonio genetico autoctono da qualsiasi forma di contaminazione e distruzione, è stata fondata la Banca Regionale Toscana del Germoplasma *(http://www.regione.toscana.it)*, che si suddivide in 5 settori, di cui fanno parte le risorse genetiche autoctone animali, le specie legnose da frutto, le specie ornamentali e da frutto, le specie erbacee e le specie di interesse forestale. La banca agisce su due livelli di conservazione: locale con un sistema di conservazione in situ affidato a coltivatori "custodi", che hanno il compito di mantenere e moltiplicare le varietà locali da loro detenute, ed un sistema ex situ intrapreso da enti locali come la Banca Regionale del Germoplasma stessa. Ad oggi vi sono conservati circa 452 campioni di diverse varietà di semi ecotipi, specie cerealicole autoctone, foraggere e da orto, tradizionalmente coltivate dagli agricoltori toscani. Il Repertorio regionale è fondamentale per censire le varietà presenti nel territorio dopo un percorso di identificazione e caratterizzazione e per dare loro una precisa e inconfutabile identità. Dalle azioni svolte negli anni si evince che il nostro territorio dispone di una vasta quantità

di specie erbacee ad uso orticolo, tra le quali il pomodoro. Attualmente nella Banca regionale sono custodite 8 varietà di pomodoro provenienti da diverse zone della Toscana, riportate in seguito, che sono state oggetto del seguente lavoro:

- Liscio da serbo
- Rosso pitigliano
- Quarantino valdarno
- Fragola
- Canestrino lucca
- Costoluto fiorentino
- Giallo pitigliano
- Pisanello

In sinergia con il progetto di conservazione del germoplasma autoctono, la regione Toscana, insieme alla provincia di Siena, hanno avviato azioni atte a valorizzare la produzione di prodotti alimentari locali e a renderli disponibili nell'alimentazione quotidiana attraverso il potenziamento della produzione di frutti stagionali e di qualità. Questo è stato possibile anche grazie ad un modello di distribuzione più semplice dei prodotti locali, tramite la cosiddetta filiera corta, la quale contribuisce a rispettare l'ambiente, a valorizzare il lavoro dei produttori locali, a stabilire un contatto diretto tra produttore e consumatore; tutto questo aumenta la fiducia dei consumatori e soprattutto permette loro di riscoprire l'alimentazione stagionale e del territorio. Le aziende agricole, gestite dai produttori locali, sono generalmente di dimensioni ridotte ed inoltre gli agricoltori coltivano seguendo i ritmi della natura. Proprio la riscoperta della periodicità dei prodotti ortofrutticoli sta alla base del successo di questo modello di distribuzione, in netta contrapposizione con la grande distribuzione. La provenienza locale dei prodotti garantisce la freschezza e la qualità degli stessi, a differenza di quanto avviene nella grande distribuzione per la quale si rendono necessarie metodologie di conservazione, tramite l'utilizzo di pesticidi e di inquinanti, che vanno ad influenzare negativamente le qualità organolettiche degli alimenti stessi *(Nasreddine et al., 2002)*. I prodotti autoctoni possono risultare, invece, più ricchi di proprietà nutraceutiche e quindi sono da considerarsi validi mezzi per il mantenimento della salute psico-fisica del consumatore, caratteristica basilare degli alimenti tipici della dieta mediterranea." *La Dieta Mediterranea è molto più che un semplice alimento. Essa promuove l'interazione sociale, poiché il pasto in comune è alla base dei costumi sociali e delle festività condivise da una data comunità, e ha dato luogo a un notevole corpus di conoscenze, canzoni, massime, racconti e leggende. La Dieta si fonda nel rispetto per il territorio e la biodiversità, e garantisce la conservazione e lo sviluppo delle attività tradizionali e dei mestieri collegati alla*

pesca e all'agricoltura nelle comunità del Mediterraneo". È con queste motivazioni che, nel novembre 2010, la Dieta Mediterranea è stata riconosciuta dall'UNESCO Patrimonio Culturale Immateriale dell'Umanità. Un patrimonio che riunisce le abitudini alimentari dei popoli del bacino del Mar Mediterraneo (Italia, Spagna, Grecia, Marocco, Portogallo, Croazia e Cipro), consolidate nel corso dei secoli e rimaste pressoché immutate fino agli anni Cinquanta, che va ben oltre una semplice lista di alimenti ma riguarda la cultura di vita, le pratiche sociali, tradizionali e agricole. Da anni è noto che una corretta alimentazione riduce il rischio di incidenza di malattie cronico-degenerative, grazie a particolari molecole, che hanno proprietà benefiche per il nostro organismo. Queste molecole si ritrovano principalmente in alimenti di origine vegetale, componenti fondamentali della dieta mediterranea, come il pomodoro. Queste caratteristiche fanno sì che il pomodoro possa essere considerato un alimento dalle spiccate capacità nutraceutiche.

Definire gli alimenti funzionali attraverso le indagini nutraceutiche

Il termine nutraceutica fu coniato per la prima volta nel 1989 dal dottor Stephen De Felice, Presidente della Foundation for Innovation in Medicine (Cranford, NJ, USA), che associò i termini "nutrizione" e "farmaceutico", andando così a definire un prodotto a confine tra alimento e farmaco. Questa scienza della nutrizione studia gli alimenti e ne indaga tutti i componenti o i principi attivi, permettendo così lo sviluppo di nuovi prodotti alimentari capaci di migliorare lo stato psico-fisico e, attraverso il trattamento e la prevenzione, di ridurre il rischio di contrarre determinate malattie. Gli "alimenti funzionali" sono alimenti d'uso comune, arricchiti con componenti naturali, generalmente assenti o presenti in basse concentrazioni in altri cibi, che hanno un effetto positivo su particolari funzioni nell'organismo. Il termine alimento funzionale (*functional food*) è nato in Giappone negli anni '80 e comprende tutti gli alimenti specificamente sviluppati per favorire la salute o ridurre il rischio di malattie. Un alimento può essere considerato 'funzionale' se è sufficientemente dimostrata la sua influenza benefica su una o più funzioni del corpo, oltre ad effetti nutrizionali adeguati, tanto da risultare rilevante per uno stato di benessere e di salute o per la riduzione del rischio di malattia. Gli effetti benefici potrebbero consistere sia nel mantenere che nel promuovere uno stato di benessere o salute e/o una riduzione del rischio di un processo patologico o di una malattia *(Shahidi et al., 2004)*. Il pomodoro è considerato un vero e proprio alimento funzionale, grazie alla sua capacità di fornire un notevole apporto di sostanze antiossidanti alla dieta.

Gli antiossidanti

Il pomodoro è ricco di antiossidanti, cioè sostanze in grado di neutralizzare i radicali liberi e proteggere l'organismo dalla loro azione negativa (*Devasagayam et al., 2004)*. I radicali liberi sono

molecole estremamente reattive e instabili, ad attività ossidante, prodotte nel corso di reazioni chimiche (*Riley et al., 1994)*. Contengono uno o più elettroni spaiati nell'orbitale esterno e tendono quindi a legarsi ad altri radicali o sottrarre un elettrone ad un'altra molecola (*Forrester et al., 1968)*. La loro condizione di reattività e instabilità può dare origine a reazioni radicaliche a catena e quindi ad una condizione di stress ossidativo (*Machlin et al., 1987).* La produzione di radicali liberi è un evento fisiologico che si verifica nelle reazioni di ossido-riduzione dell'organismo, sia nei processi di produzione di energia che in quelli infettivi e infiammatori e nel metabolismo dei leucociti polimorfonucleati (*Beneš et al., 1999)*. Talvolta la produzione di radicali liberi dipende da fattori esterni, quali alcool, fumo attivo o passivo, farmaci ed inquinamento. (*Wu et al., 2003)*. Ad elevate concentrazioni, i radicali liberi possono severamente danneggiare componenti cellulari ed alterare il DNA. Le sostanze antiossidanti cedono elettroni dalla loro struttura chimica, per ridurre e neutralizzare i radicali liberi, responsabili dello stress ossidativo (*Hervert-Hernández et al., 2010).*

Polifenoli e carotenoidi

Le caratteristiche antiossidanti del frutto del pomodoro sono legate alla presenza di pigmenti carotenoidi e di molecole fenoliche tra cui anche flavonoidi. Questi composti hanno una struttura molecolare provvista di anelli aromatici e numerosi gruppi idrossilici legati a questi ultimi. In particolare queste molecole hanno la capacità di inattivare le specie ossidanti, tramite il meccanismo di trasferimento di atomi idrogeno *(Fig: 2)*. Essenzialmente i polifenoli ed i carotenoidi sono in grado di cedere un elettrone, neutralizzando il fattore ossidante e rimanendo allo stesso tempo stabili nella loro struttura chimica *(Prior et al., 2005)*. Grazie a queste particolari capacità, queste molecole sono considerate antiossidanti naturali e sono studiate in campo medico in quanto dimostrano di avere azioni positive nella prevenzione di malattie cronico degenerative (*Willcox et al., 2004)*. Studi scientifici attribuiscono agli antiossidanti attività antiinfiammatorie, anticancerogeniche, antibatteriche, antivirali e di azione preventiva nelle malattie cardiovascolari.

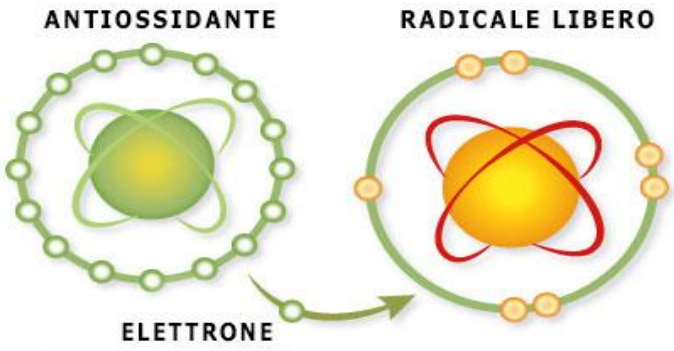


Figura 2: *HAT (Hydrogen Atom Transfer) meccanismo d'azione dei composti antiossidanti (immagine dal web).*

Licopene

La particolarità del pomodoro è legata alla presenza di un carotenoide, contenuto principalmente nella buccia e nella parte più esterna della polpa, il licopene, che si sviluppa in fase di maturazione e conferisce al pomodoro il suo tipico colore rosso *(Fig: 3)*. L'evoluzione del contenuto di licopene nel frutto durante la sua maturazione è strettamente collegata all'andamento termico; infatti temperature molto elevate (superiori a 30 °C) inibiscono la sintesi del licopene, mentre quelle eccessivamente basse ostacolano sia la maturazione del pomodoro sia la sintesi del licopene (*Mayeaux et al., 2006*). Questo importante idrocarburo è un potente antiossidante che contrasta l'azione dei radicali liberi e lo stress ossidativo, condizioni che aprono la porta alle malattie cronico degenerative, come ad esempio Alzheimer, Parkinson e ictus, ma anche malattie tumorali (neoplasie alla prostata, allo stomaco, ai polmoni e al pancreas) (*Agarwal et al., 2000*). Il licopene è in grado di contrastare l'incidenza di malattie cardiovascolari grazie alla sua capacità di ridurre i livelli di colesterolo LDL (*Blum et al., 2005)*. Svolge anche un'azione antinfiammatoria e protegge gli occhi dalla degenerazione dovuta all'età. Le molecole bersaglio su cui agisce sono acidi nucleici, proteine e membrane biologiche (*Rao et al., 2007*). Non può essere sintetizzato direttamente dall'uomo, quindi è fondamentale assumerlo con la dieta. La sua biodisponibilità per l'uomo è fortemente influenzata dalla concomitante presenza di lipidi nella dieta, in quanto questi ultimi svolgono un ruolo fondamentale di estrazione dei carotenoidi dalla fase acquosa con formazione di micelle attraverso le quali questi ultimi, vengono assorbiti dagli enterociti e trasferiti poi ai tessuti (*Faulks et al.,2005*). Dalle varie indagini epidemiologiche effettuate anche dal Fondo Mondiale per la Ricerca sul Cancro *(WCRF)* risulta che nei paesi grandi consumatori di pomodori, come Italia, Spagna e Messico, si registra un tasso di cancro alla prostata molto più basso che altrove *(Etminan et al., 2004)*. Per questo motivo è stata avanzata l'ipotesi che la somministrazione giornaliera potrebbe ridurne il rischio.

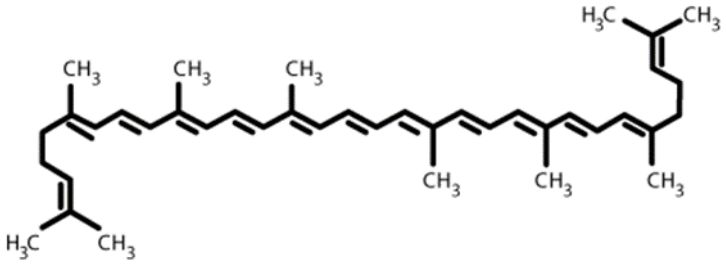


Figura 3: *Struttura chimica del licopene.*

SCOPO DEL LAVORO

La regione Toscana custodisce un vasto patrimonio varietale composto da specie ortofrutticole e proprio in questo ambito è stata la prima regione ad emanare la legge LR 64/04, con la quale si pone l'obiettivo di recuperare risorse varietali ed animali autoctone a rischio di estinzione, contribuendo al mantenimento della biodiversità delle specie locali. Questo lavoro ha lo scopo di valorizzare le proprietà nutrizionali di 8 varietà autoctone di pomodoro recuperate nel tempo secondo quanto è previsto dalla legge e così custodite e classificate nella Banca Regionale Toscana del Germoplasma favorendo, in questo modo, la salvaguardia di antiche varietà di pomodoro locale. Il progetto di caratterizzazione dei profili nutraceutici di questi frutti ha previsto una serie di indagini analitiche tra cui la determinazione del potere antiossidante, il contenuto di polifenoli, flavonoidi e di licopene, composto carotenoide più rappresentativo del pomodoro e dalle spiccate capacità antiossidanti. Negli ultimi anni, infatti, è cresciuto l'interesse verso specie da frutta con marcata attività antiossidante e cioè in grado di contrastare l'azione dei radicali liberi, molecole estremamente reattive e instabili, prodotte nel corso di reazioni chimiche e capaci di innescare meccanismi che portano all'insorgenza di patologie come Alzheimer, Parkinson e ictus, ma anche malattie tumorali e cardiovascolari. La capacità antiossidante della pianta è data dalla presenza di diversi tipi di molecole, che svolgono la loro azione nei diversi distretti cellulari, andando a neutralizzare i radicali liberi e proteggendo così l'organismo. La nostra indagine è volta ad incrementare i dati presenti in letteratura riguardo alle capacità benefiche di questo frutto, concentrandoci sulle 8, già citate, varietà di pomodoro toscano. L'attenzione del nostro studio ha riguardato anche il contenuto di polifenoli e flavonoidi e il licopene, un carotenoide presente nella buccia e nella polpa di pomodoro, che altri autori riportano fondamentale nella prevenzione di malattie legate alla presenza di radicali liberi *(Rao et al., 2002)*. Essendo una molecola non sintetizzabile autonomamente dall'uomo, è ritenuta, a maggior ragione, di fondamentale importanza la sua assunzione tramite l'alimentazione. La buccia e la parte più esterna della polpa del pomodoro ne sono ricchi e, a questo proposito, il nostro studio vuole dimostrare la sua presenza nei frutti autoctoni analizzati, così da favorire la promozione e la valorizzazione degli stessi, contribuendo allo sviluppo di prodotti territoriali da offrire al consumatore. Il controllo dei valori rilevati dalle varietà autoctone analizzate è stato effettuato confrontando questi parametri con dati rilevati dall'indagine su pomodori commerciali.

MATERIALI E METODI

Reperimento del materiale vegetale

I frutti sono stati raccolti durante l'annata 2016 al loro massimo stadio di maturazione, direttamente dalla pianta presente nel campo sperimentale della sede CNR Ivalsa di Follonica, riconosciuto come sezione della Banca Regionale del Germoplasma *(Fig: 4 e 5)*. Una volta raggiunto il giusto grado di maturazione, i frutti raccolti sono stati posti in cella frigorifera a -80° C in modo da arrestare i normali processi interni. Per poter ottenere un concreto raffronto del dato, in questa fase è stata reperita anche una varietà di pomodoro commerciale, così da ottenere in totale 9 campioni di frutti da indagare. L'inserimento del controllo commerciale serve per avere un'idea della quantità delle molecole in analisi presenti nei prodotti della grande distribuzione. Il pomodoro, reperito dalla grande distribuzione, è stato analizzato come confronto di analisi, rappresentando il termine di paragone. Tuttavia non è possibile considerarlo come dato assoluto, poiché non rappresenta un dato statisticamente significativo e di dubbia varietà di appartenenza.

Figure 4 e 5 : *sede CNR Ivalsa di Follonica.*

Ricerca e metodi di analisi

La ricerca dei metodi per la determinazione del potere antiossidante, del contenuto di polifenoli e di flavonoidi è stata effettuata tramite consultazione bibliografica di lavori precedenti. Le tecniche più utilizzate sono rappresentate dai saggi colorimetrici, perché garantiscono affidabilità e riproducibilità del dato in tempi brevi di sperimentazione. Tra questi la scelta è ricaduta sul metodo FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*) per la misurazione del potere antiossidante, sul metodo Folin-Ciocalteau per la misura dei composti fenolici totali e sul metodo dei Sali di alluminio per la determinazione dei flavonoidi.

Preparazione del campione

L'estrazione delle molecole da analizzare viene fatta direttamente da frutto scongelato. Prelevata la quantità di 3 grammi di campione, questo viene sminuzzato finemente e vi vengono aggiunti 9 mL di acetone al 70%. La soluzione viene ulteriormente frammentata tramite omogenizzazione (Miccra rt) per circa un minuto e quindi inserita in un sonicatore per venti minuti, così da garantire la completa rottura dei componenti cellulari. I composti fenolici, che sono ora in sospensione, vengono separati dal particolato attraverso un passaggio in centrifuga a 4.000 r.c.f per cinque minuti. L'ultima fase del processo prevede il filtraggio della soluzione così da avere la certezza che venga eliminato tutto il materiale non oggetto di analisi; viene utilizzata una siringa da 5 ml e un filtro Sartorious da 0,45 µm. Successivamente il campione viene raccolto ed è pronto per le analisi. Nelle manipolazioni di un alimento, la temperatura è uno dei fattori principalmente presenti ed è responsabile della maggior parte delle modificazioni delle sostanze fitochimiche. Il congelamento a -80 °C, non apporta modifiche o degradazione dei fitocomponenti di nostro interesse (*Carratu et al., 2005).*

Metodo FRAP

Il saggio FRAP, acronimo di "Ferric Ion Reducing Antioxidant Power", fu messo a punto da Benzie e Strain, al fine di valutare a livello clinico la capacità antiossidante del plasma sanguigno; tale metodo è stato in seguito adattato ad analisi di campioni alimentari e botanici ed è oggi molto utilizzato a scopi scientifici *(Benzie et al., 1996)*. Il principio si basa sulla capacità dei vari antiossidanti di ridurre il complesso di Fe(III) 2,4,6-tripiridil-s-triazina a Fe(II), ad un pH di 3.6. Il complesso ridotto assume una colorazione tendente al blu *(Fig: 6)*, grazie alla quale può essere misurato spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di massimo assorbimento di 593 nm. Una unità FRAP è arbitrariamente definita come il numero di moli di Fe(III) ridotte a Fe(II) da una mole di antiossidante testato.

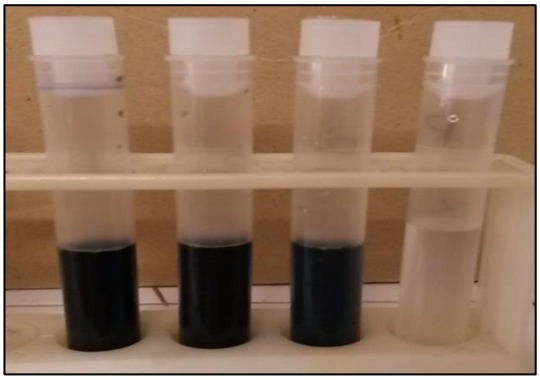


Figura 6: *Analisi colorimetrica con metodica FRAP.*

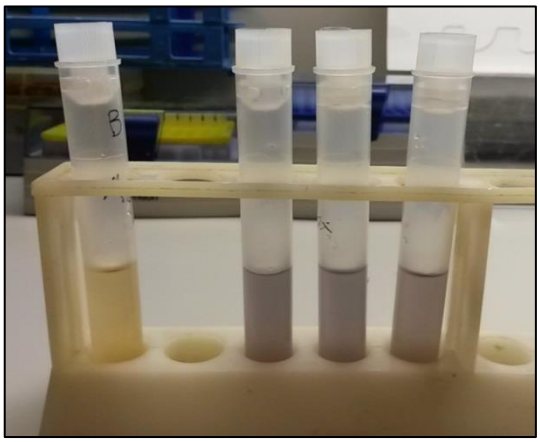
Descrizione della procedura sperimentale

Vengono preparate quattro provette, una che conterrà il controllo negativo costituito da acqua e tre il campione estratto. In ogni provetta vengono inseriti in successione 2040 µl di tampone acetato, 200 µl di TPTZ, 200 µl di cloruro ferrico ed in fine 20 µl di campione, tenendo conto di preparare i reagenti freschi prima dell'analisi. L'elaborazione dei dati ottenuti è possibile tramite confronto con una retta di calibrazione, realizzata precedentemente utilizzando soluzioni a titolo noto di solfato ferroso.

Metodo Folin-Ciocalteau

Il metodo viene inizialmente proposto da Folin e Denis nel 1912 e successivamente modificato da Folin e Ciocalteu nel 1927 (*Ainsworth et al., 2007*) per la determinazione della tirosina. Il metodo si basa sull'aggiunta di un particolare reattivo ossidante, detto reattivo di Folin-Ciocalteu (FC), in grado di assumere una colorazione blu, la cui intensità risulta essere linearmente proporzionale al numero di residui fenolici presenti sulla molecola di antiossidante. Per tale ragione il reattivo FC viene impiegato per la determinazione del contenuto totale dei polifenoli. Il reattivo di Folin e Ciocalteu è costituito da una miscela di color giallo, a base di acido fosfotungstico $H_3PW_{12}O_{40}$ e fosfomolibdico $H_3PMo_{12}O_{40}$, in grado di ossidare substrati polifenolici e altre molecole antiossidanti, conferendo alla soluzione una intensa colorazione blu *(Fig: 7)*. La reazione di ossidazione del substrato fenolico deve essere condotta a pH alcalini intorno a 10 (soluzione di Na_2CO_3), per accelerare la cinetica della reazione stessa. La miscela degli ossidi di W_8O_{23} e Mo_8O_{23} presenta il suo picco massimo di assorbimento a 765 nm, lunghezza d'onda alla quale vengono lette le reazioni *(Ainsworth et al., 2007)*.

Figura 7: *Analisi colorimetrica con metodica Folin-Ciocalteau.*



Descrizione della procedura sperimentale

L'esperimento prevede la preparazione di quattro provette, una che conterrà il bianco e tre per il campione. La preparazione del campione viene ripetuta tre volte per avere una maggiore significatività del dato finale. Ogni provetta contiene 500 µl di estratto, 3000 µl di acqua distillata, 250 µl di reattivo di Folin, 750 µl di Sodio carbonato e 950 µl di acqua distillata. La soluzione viene inserita in un incubatore a 37°C per 30 minuti. Trascorso il tempo di incubazione *(Fig: 8)* la soluzione viene letta allo spettrofotometro *(Fig: 9)* ad una lunghezza d'onda di 765 nm. La misura ottenuta dallo strumento viene inserita in una retta di calibrazione precedentemente preparata con soluzioni standard di acido gallico.

Figura 8: *Immagine raffigurante l'incubatore G-Therm 075.* ***Figura 9:*** *spettrofotometro Shimadzu UV-160 con doppio fascio di lettura.*

Metodo dell'alluminio cloruro

Il metodo dell'alluminio cloruro *(Abozed et al., 2014)* permette di determinare il contenuto di flavonoidi totali, separando il loro contributo da quello dei polifenoli. Il principio di base si fonda sul fatto che l'alluminio cloruro è in grado di formare complessi con i gruppi chimici dei flavonoidi. La formazione dei complessi è accompagnata da uno spostamento della banda di assorbimento nello spettro UV; visivamente nella soluzione assisteremo ad un viraggio di colore verso il giallo. Il metodo consente di stabilire il contenuto di flavonoidi grazie ad una lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 415 nm.

Descrizione della procedura sperimentale

L'esperimento prevede la preparazione di quattro provette, una che conterrà il bianco e tre per il campione. La preparazione del campione viene ripetuta tre volte per avere una maggiore significatività del dato finale. Ogni provetta contiene 500 µl di campione, 1,5 ml di etanolo al 95%, 100 µl di cloruro di alluminio, 100 µl di acetato di potassio, 2,8 ml di acqua distillata. La soluzione viene lasciata a temperatura ambiente per 30 minuti *(Fig: 10)*. Trascorso il tempo di incubazione la

soluzione viene letta allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 415 nm.

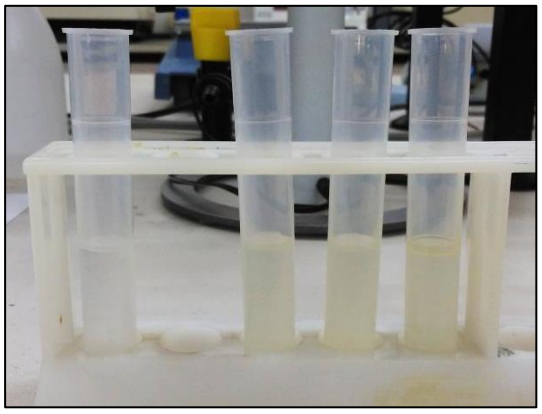


Figura 10: *Analisi tramite metodo dell'alluminio cloruro.*

Analisi statistica

L'elaborazione dei dati ottenuti da queste analisi sono stati possibili per confronto con le rispettive rette di calibrazione. Le rette vengono realizzate precedentemente tramite soluzioni a titolo noto di solfato ferroso per gli antiossidanti, acido gallico per i polifenoli e quercetina per i flavonoidi, standard molto spesso usati in questo tipo di analisi come valore di riferimento in equivalenti. I valori ottenuti vengono relazionati all'assorbanza ed inseriti nel programma di Microsoft Excel che costruisce una retta di calibrazione secondo il metodo dei minimi quadrati *(Fig: 11 ,12 e 13).*

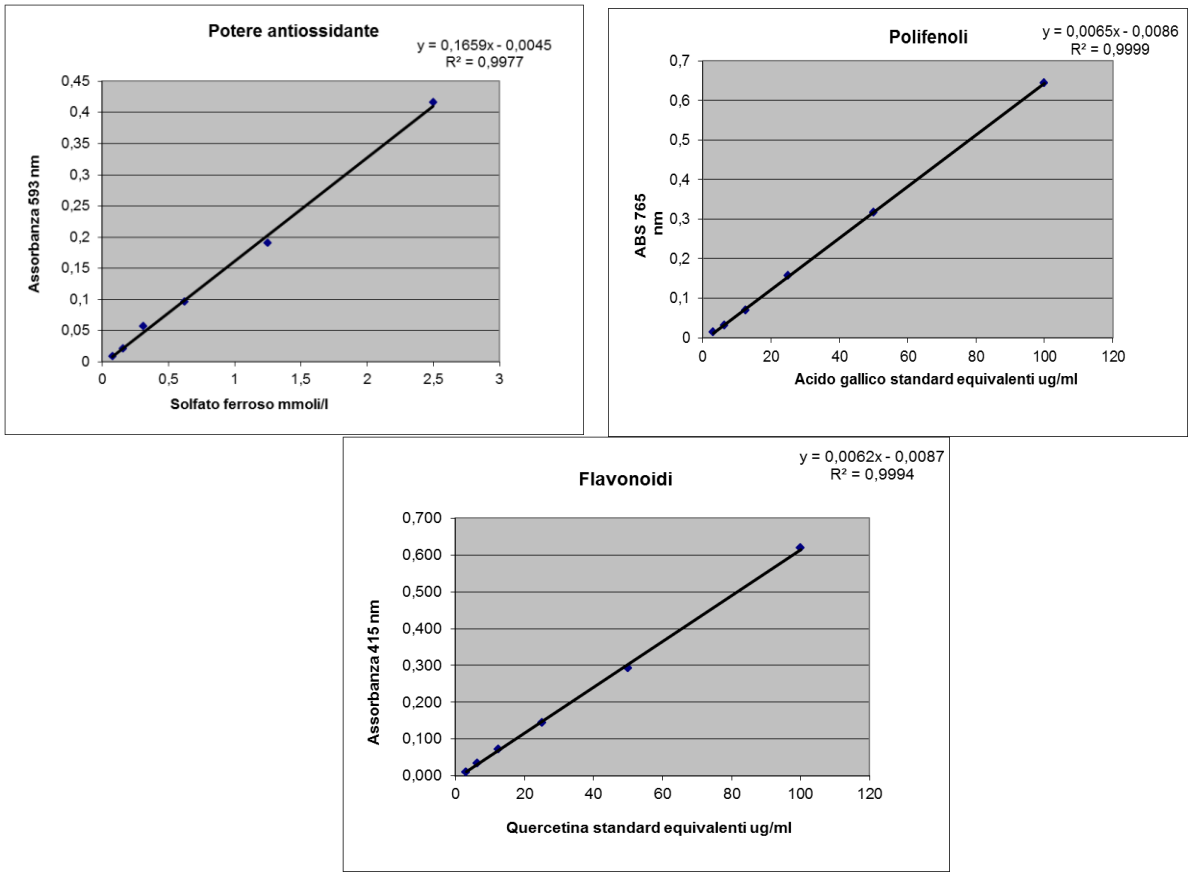


Figure 11, 12 e 13: *Rette di calibrazione per valutare il contenuto di antiossidanti, polifenoli e flavonoidi totali.*

Analisi cromatografica mediante HPLC

La tecnica cromatografica permette di effettuare un'analisi sia qualitativa che quantitativa, separando i singoli componenti di una miscela complessa. La separazione avviene per affinità e si basa sulla ripartizione del campione tra la fase mobile e la fase stazionaria presente nella colonna cromatografica. La diversa struttura chimica delle molecole fa si che queste abbiano più o meno affinità con la componente stazionaria dentro la colonna; di conseguenza queste impiegano un diverso tempo per percorrerla, chiamato tempo di ritenzione. Maggiore è l'affinità per la fase stazionaria, maggiore sarà il tempo che la molecola impiegherà per uscire dalla colonna e viceversa. Lo strumento è dotato di una pompa che mantiene i livelli di pressione alti così da garantire le alte prestazioni dello strumento ed un rilevatore UV che identifica le molecole a fine corsa. Nel nostro caso è stato utilizzato un Perkin Elmer Nelson 3200 Series con campionatore automatico e colonna C18 *(Fig: 14)* specifica per la separazione dei componenti fenolici.

Figura 14: *strumento Perkin Elmer Nelson 3200 Series con campionatore automatico e colonna c18.*

Preparazione del campione

4 grammi di campione sono stati sminuzzati e diluiti in una soluzione di 100 ml composta da esano, acetone, etanolo (50:25:25). La soluzione viene posta in agitazione con una ancoretta magnetica per 30 minuti al buio per evitare l'ossidazione delle molecole di licopene. Vengono poi aggiunti 15 ml di acqua distillata, così si formeranno due fasi ben visibili *(Fig: 15)*, dove nella superiore si troveranno i componenti di interesse. 4 ml della fase superiore vengono prelevati e raccolti in due provette; queste dovranno subire un processo di evaporazione tramite lo strumento Evaporateur centrifuge *(Fig: 16)*. L'essiccato viene infine risospeso con una miscela di THF+ACN+EtOH ed è pronto per le analisi in HPLC *(Barba et al., 2006).*

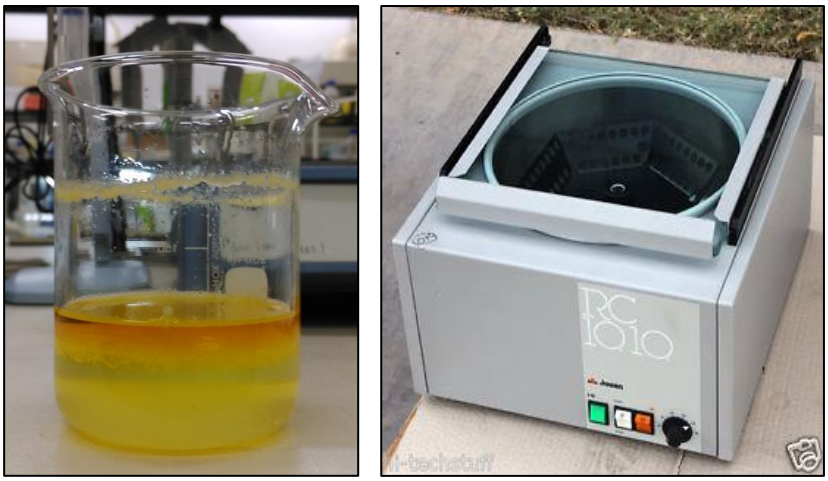


***Figura 15**: l'immagine raffigura il metodo di estrazione dei carotenoidi mettendo in evidenza le due fasi che si formano nel processo. Figura 16: strumento Evaporateur centrifuge modello RC1010 Jouan.*

Condizioni della corsa cromatografica

Il metodo utilizzato per l'analisi cromatografica è stato ottenuto dalla consultazione bibliografica e ottimizzato per le analisi svolte e viene impostato nel software Turbocrom dello strumento. Il flusso della fase mobile viene impostato ad un valore di 0,9 ml/min e la colonna mantenuta ad una temperatura di 30 °C per tutta la durata dell'analisi. La fase mobile è costituita da una soluzione composta da esano, etanolo ed acetone (50:25:25), l'eluizione è isocratica e viene mantenuta per un tempo di corsa di 10 min *(Fig: 17)*. La lunghezza d'onda del rilevatore è impostata a 475 nm, ottimale per la rilevazione del licopene e i carotenoidi in generale. La rilevazione e quantizzazione del licopene viene effettuata attraverso l'utilizzo del sopracitato metodo su standard della stessa molecola, acquistata dalla ditta Sigma Aldrich, a concentrazioni crescenti di: 5 µg/ml,10 µg/ml, 25 µg/ml e 50 µg/ml.

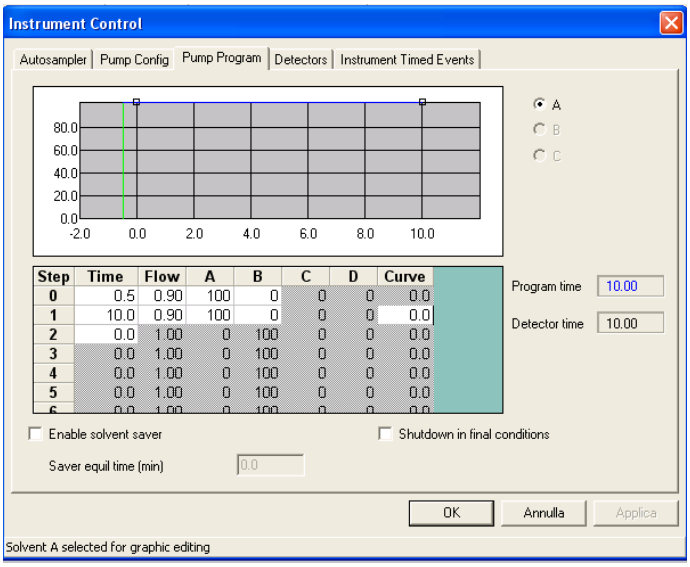


***Figura 17:** L'immagine mostra il software Turbocrom impostato per un tempo di corsa di 10 minuti.*

RISULTATI

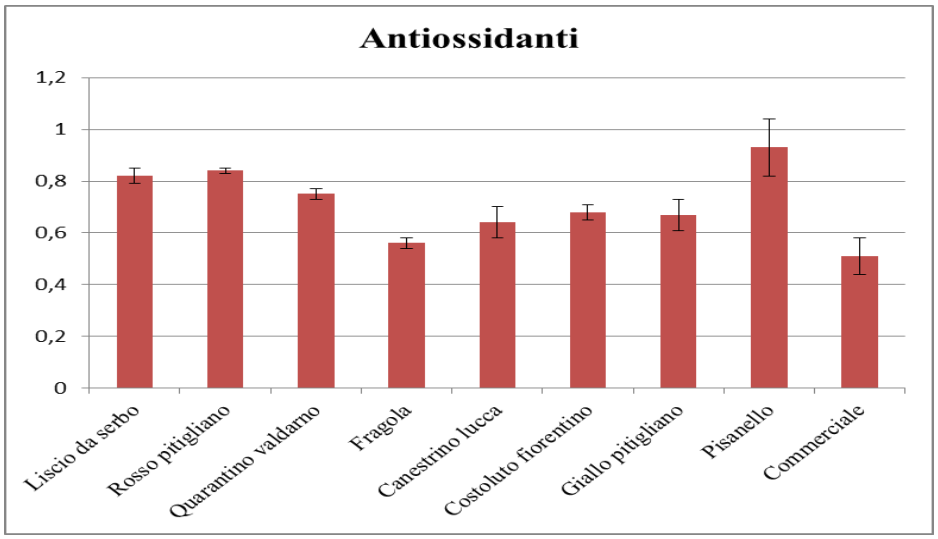
La regione Toscana vanta un ampio patrimonio di specie e varietà che arricchiscono il panorama vegetale in termini di biodiversità. Queste piante sono il risultato di anni di adattamento al territorio di origine ed esprimono caratteristiche sia fenotipiche che molecolari uniche. In particolare, queste piante hanno sviluppato sistemi che promuovono la formazione di fitocomponenti, che si accumulano nei vari distretti della pianta, tra cui anche i frutti. Queste molecole sono studiate in campo medico e farmaceutico per le loro azioni benefiche sulla salute umana (*Dillard et al., 2000*). Da questi studi emergono dati interessanti, che riportano una concentrazione molto elevata di composti benefici nei frutti delle diverse specie. Su questi dati si basta il presente lavoro che consiste nell'individuazione e nella quantizzazione di queste caratteristiche, presenti nelle varietà autoctone di pomodoro, confrontandole con varietà commerciali della grande distribuzione. Grazie ad adeguate strumentazioni di analisi, è stato possibile ottenere dati sul potere antiossidante, sul contenuto di polifenoli e su quello dei flavonoidi. Una delle fasi primarie dell'esperimento è stata quella di ricercare le varie modifiche che coinvolgono questi composti durante la preparazione del campione, per capire se le manipolazioni apportate dell'operatore potessero in qualche modo influenzare il contenuto delle molecole antiossidanti e quindi non fornire un valore reale. Il congelamento è un fattore quasi sempre presente nelle manipolazioni di un alimento. La temperatura è uno dei parametri più delicati; sembra infatti che alte temperature degradino le componenti fenoliche, mentre è dimostrato che il congelamento a -80°C, a cui sono sottoposti i pomodori nel nostro esperimento, non apporti modifiche o degradazione dei fitocomponenti di nostro interesse *(Carratu et al., 2005).* Anche il metodo di esecuzione dei vari test colorimetrici è stato accuratamente messo a punto perché possono insorgere problemi riguardanti la velocità di interazione con i componenti, con la conseguenza che alcuni composti possano reagire meno velocemente e dare un risultato errato. Questo problema viene risolto grazie all'incubazione a 37° C per un'ora o 30 min, in modo tale da permettere a tutti i fitocomponenti di reagire e fornire così dati precisi.

Capacità antiossidante

I cibi di origine vegetale contengono un gran numero di sostanze ad attività antiossidante marcata, come flavonoidi e acidi fenolici. Grazie al saggio colorimetrico FRAP, è stato possibile valutare la capacità antiossidante contenuta nel frutto di pomodoro e di conseguenza riscontrare il potenziale effetto protettivo di questo alimento e la sua azione contro i radicali liberi. Successivamente, i risultati di queste analisi sono stati riportati graficamente *(Fig: 18).* Dal diagramma emerge che la capacità antiossidante contenuta nel prodotto commerciale è 0,51 µmol/g, inferiore rispetto ai pomodori autoctoni analizzati per il nostro lavoro. Il contenuto di antiossidanti riscontrato nei frutti coltivati

localmente, invece, varia da un minimo di 0,56 µmol/g, contenuto nella varietà Fragola, ad un massimo di 0,93 µmol/g del pomodoro Pisanello. Risultano inoltre interessanti le varietà Rosso pitigliano e Liscio da serbo che presentano un contenuto di molecole antiossidanti pari a 0,84 µmol/g e 0,82 µmol/g.

Figura 18: *riportano i valori ottenuti dal saggio FRAP, grazie al quale viene evidenziato il potere antiossidante.*



Polifenoli totali

I polifenoli sono le molecole antiossidanti più rappresentate nel regno vegetale e vengono prodotti dal metabolismo secondario delle piante. È noto che questi antiossidanti naturali, assunti con la dieta, hanno un'azione fondamentale nell'eliminazione dei radicali liberi, presenti nell'organismo umano e causa di invecchiamento cellulare e di crescita tumorale (*Pandey et al., 2009*). L'apporto di polifenoli nella dieta varia significativamente in relazione al tipo, alla qualità e alla quantità di vegetali consumati (*Scalbert et al., 2000)*. Le nostre analisi sono state effettuate confrontando i valori di polifenoli contenuti nel frutto fresco di pomodoro con quelli del prodotto commerciale e in seguito riportate nel grafico sottostante *(Figura 19)*. Come si può notare dal grafico, la cultivar commerciale presenta valori relativamente bassi rispetto ai prodotti locali, aggirandosi intorno ai 39,63 mg/g. Il range di valori riscontrati nei frutti delle varietà autoctone varia in generale da un valore minimo di 42,45 mg/g nel pomodoro Pisanello ad un valore di 57,60 mg/g nel Rosso pitigliano. Da questa analisi emerge che le varietà autoctone di pomodoro presentano, per la gran parte, valori di polifenoli totali superiori alla cultivar commerciale analizzata, giustificando così il loro apporto nella capacità antiossidante totale del frutto.

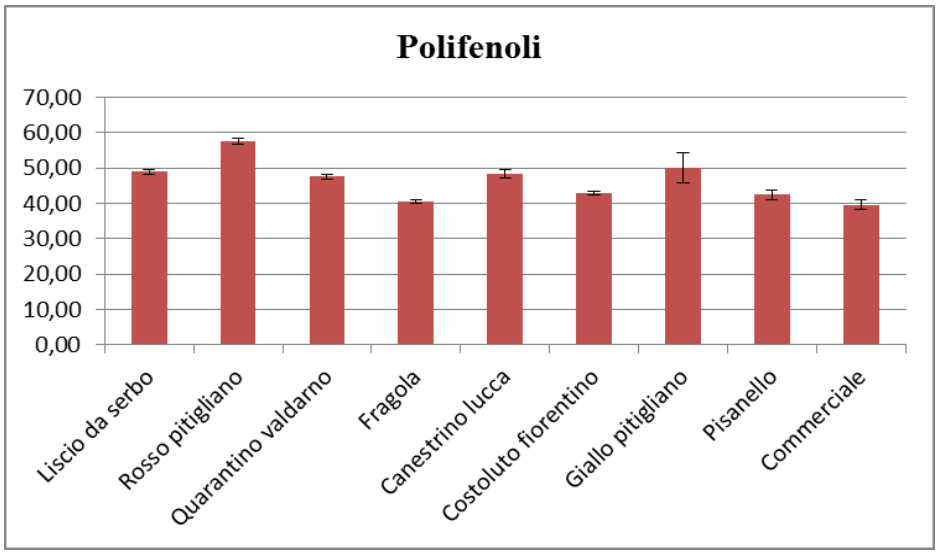


Figura 19: *riportano i valori emersi dal saggio Folin-Ciocalteau, grazie al quale viene evidenziata la concentrazione di polifenoli*.

Flavonoidi

I flavonoidi sono potenti antiossidanti largamente presenti in numerose varietà di frutti che, come già detto, contribuiscono alla prevenzione di patologie legate all'invecchiamento cellulare e persino alla prevenzione di alcune forme tumorali. Dai nostri studi è emerso il contenuto elevato di flavonoidi nel pomodoro autoctono, messo a confronto con un prodotto commerciale. I risultati, che sono riportati di seguito nel grafico *(Fig: 20)*, mostrano come i valori di flavonoidi contenuti nel pomodoro commerciale siano nettamente al di sotto dei valori dei pomodori toscani analizzati. La cultivar commerciale, infatti, riporta un valore di 3,03 mg/g, mentre i prodotti locali analizzati presentano variazioni da un minimo 4,44 mg/g del pomodoro Quarantino valdarno ad un massimo del Canestrino di lucca con 11,29 mg/g.

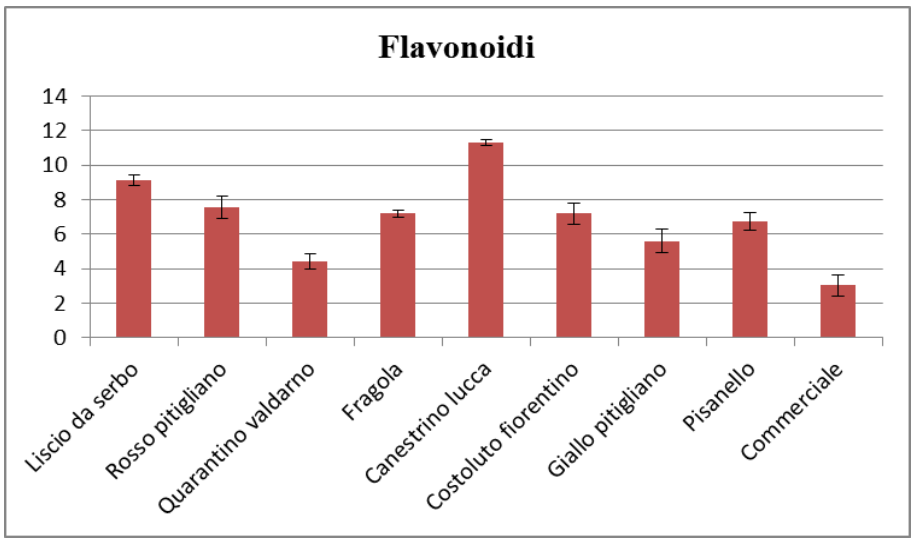


Figura 20: *riportano le concentrazioni di flavonoidi, espresse in mg/g, di tutte le varietà studiate*.

Licopene

Il licopene è un elemento di particolare importanza nel pomodoro, presenta, infatti, uno spiccato potere antiossidante, grazie al quale agisce contrastando l'azione dei radicali liberi e lo stress ossidativo, che aprono la porta a numerose malattie cronico-degenerative e tumorali (*Bhuvaneswari et al., 2005)*. Le nostre analisi sono state effettuate attraverso cromatografia ad alta prestazione, essenziale per una misurazione precisa dei contenuti di questa particolare molecola *(Fig: 21)*. La quantità di licopene contenuto nei frutti autoctoni e nel frutto commerciale sono riportate nel grafico sottostante *(Fig: 22)*. Dai risultati ottenuti, è possibile affermare che i parametri studiati differiscono a seconda della varietà, ma il dato importante è che tutti i frutti autoctoni presentano una concentrazione più elevata di questo composto. Nel prodotto commerciale, infatti, è stato riscontrato un contenuto di licopene pari a 2,82 mg/g, inferiore rispetto ai pomodori autoctoni analizzati per il nostro lavoro. I frutti coltivati localmente presentano valori che vanno da un minimo di 3,15 mg/g contenuto nella varietà Fragola e ad un massimo di 8,83 mg/g del pomodoro Canestrino di Lucca.

Figura 21: *cromatogramma di una analisi HPLC, riportante in picco che rappresenta la molecola del licopene.*

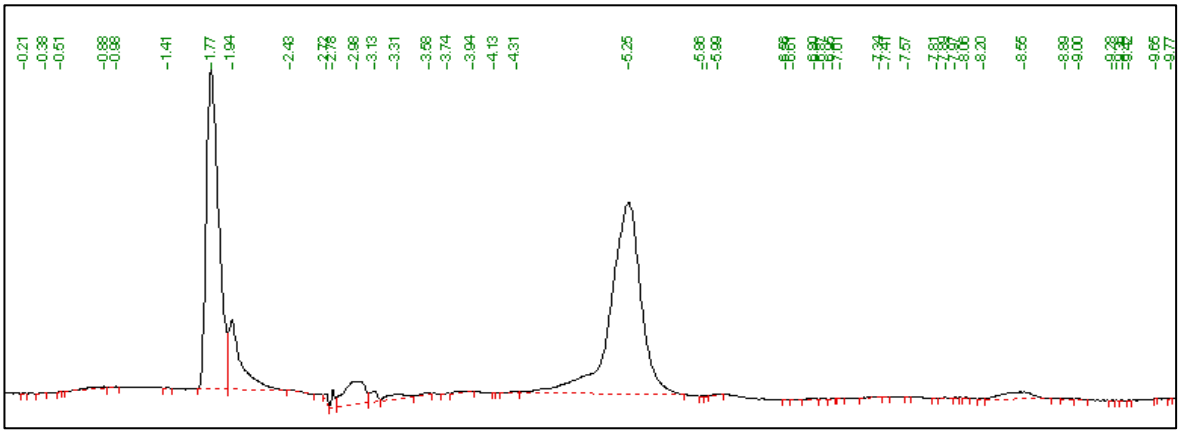
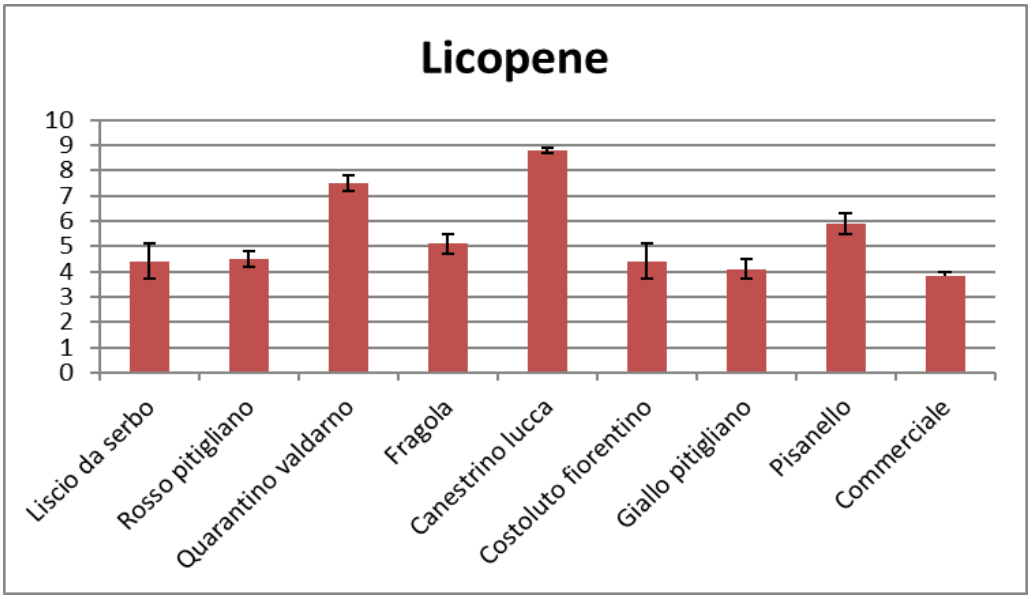


Figura 22*: riportano le concentrazioni di licopene, espresse in mg/g, delle varietà analizzate.*



Aspetti salutistici delle varietà di ciliegia repertoriate presso la Banca Regionale del Germoplasma

La Banca Regionale del Germoplasma della Toscana (Figura 2) ha come obiettivo la salvaguardia del patrimonio genetico autoctono e si suddivide in cinque settori di interesse di cui fanno parte le specie legnose da frutto, le specie ornamentali e da frutto, le risorse genetiche autoctone animali, le specie di interesse forestale e le specie erbacee (http://www.regione.toscana.it). La conservazione delle specie avviene sia a livello locale attraverso coltivatori "custodi" che hanno il compito di mantenere e riprodurre le varietà locali a loro affidate sia tramite un sistema ex situ intrapreso da enti locali tra cui la stessa Banca Regionale del Germoplasma. L'iscrizione delle risorse genetiche al repertorio regionale è effettuata in seguito ad un percorso di identificazione, caratterizzazione e di approvazione da parte della Giunta Regionale. Attualmente nella Banca Regionale è presente un'ampia varietà di ciliegie provenienti da diverse zone della Toscana tra cui quelle oggetto del presente studio ovvero Moscatella, Carlotta, Morellona, Crognola e Maggiola. La regione Toscana ha così avviato azioni atte a valorizzare la produzione di prodotti alimentari locali attraverso il potenziamento della produzione di frutti stagionali di qualità. I frutti risultano essere più facilmente reperibili grazie all'introduzione di un modello di distribuzione definito a filiera corta che, oltre a rispettare l'ambiente, permette la valorizzazione dei prodotti locali e il contatto diretto tra produttore e consumatore. Il successo di questo tipo di distribuzione sta nella riscoperta della periodicità dei prodotti ortofrutticoli garantendo al consumatore un prodotto fresco e di qualità contrariamente a quanto avviene nella grande distribuzione dove l'utilizzo di conservanti artificiali va ad influenzare negativamente le qualità organolettiche degli alimenti stessi. I prodotti locali possono risultare più ricchi di molecole a funzione nutraceutica, come gli antiossidanti, capaci di preservare la shelf-life degli alimenti, ritardando l'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi, ma anche di esplicare nell'organismo umano effetti benefici *(Shi et al., 2001)*. Da diversi anni è ormai noto che una alimentazione ricca di molecole antiossidanti può ridurre l'insorgenza di malattie cronico-degenerative (*Galasko et al., 2012*). Tali molecole sono presenti in grandi quantità in alimenti di origine vegetale, come le ciliegie il che le rende un alimento con spiccate capacità nutraceutiche.

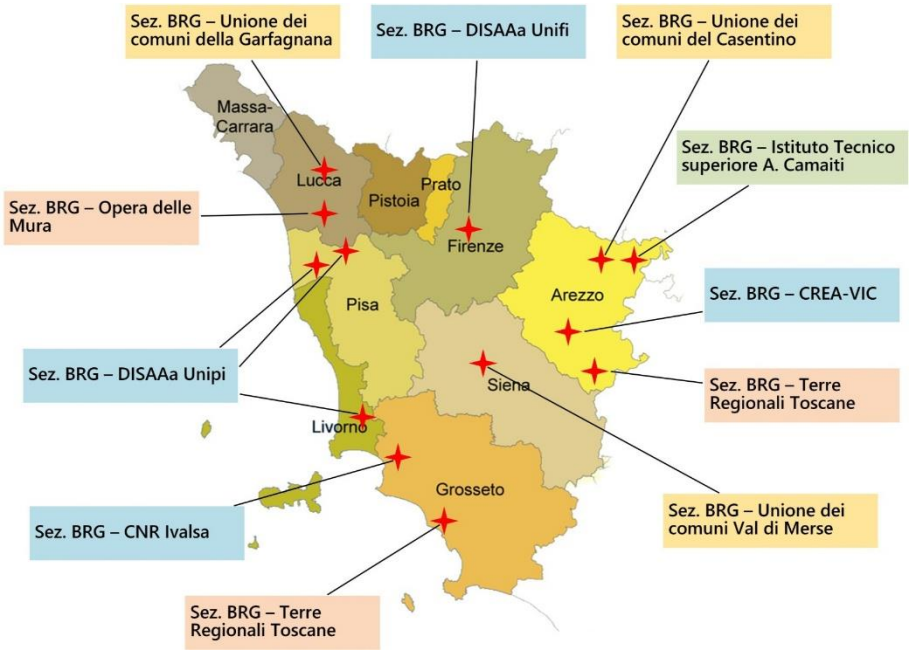


Figura 1 *Sezioni della Banca Regionale del Germoplasma*

Antiossidanti e stress ossidativo

Per antiossidante si intende una qualsiasi sostanza che, trovandosi in concentrazioni di gran lunga inferiori rispetto ad un dato substrato ossidabile, ritarda significativamente o previene l'ossidazione di quel substrato *(Antolovich et al., 2002)*. Le cellule di ogni organismo vivente mantengono, al loro interno, un ambiente redox stabile grazie alla presenza di enzimi che hanno la capacità di interferire con il ciclo ossidativo delle molecole (Figura 3). Questi enzimi possono agire in modo diretto, donando alle molecole elettroni e contemporaneamente stabilizzandole in forme non reattive, oppure in modo indiretto legando ioni metallici come rame o ferro *(Kaur et al., 2001)*.

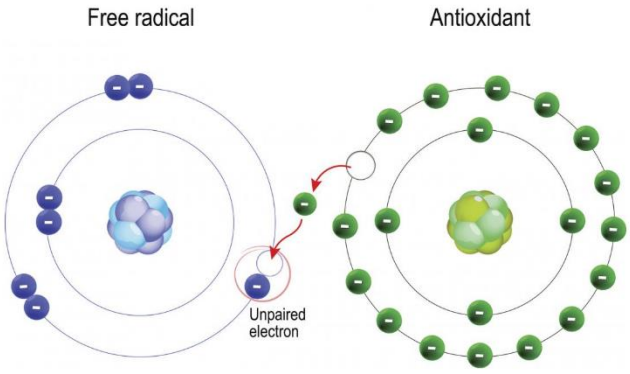


Figura 2 *Hydrogen Atom Transfer (HAT) meccanismo d'azione dei composti antiossidanti*

Nella respirazione aerobica mitocondriale, l'ossigeno molecolare O_2 viene utilizzato come carrier di elettroni. Come conseguenza delle reazioni redox che si generano in seguito al trasporto di elettroni, vi è la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) di cui le più comuni sono il radicale superossido (O_2^-), il perossido di idrogeno (H_2O_2), l'ossigeno singoletto (O_2) e il radicale ossidrile (·OH). La formazione di ROS è, ad ogni modo, un processo fisiologico normale: a basse concentrazioni, infatti, presentano funzioni protettive della cellula e di trasduzione del segnale. L'eccesso di ROS genera, invece, uno squilibrio delle condizioni redox che porta a stress ossidativo. L'aumento di ROS nella cellula può provocare danno alle biomolecole quali lipidi, proteine e DNA nonché alterare le funzioni delle membrane. Lo stress ossidativo e/o la mancata detossificazione delle ROS sembrano essere le principali cause di insorgenza di malattie quali diabete, malattie cardiovascolari, tumori, Alzheimer ed altre malattie neurodegenerative (*Seifried et al., 2007; Sharma et al., 2012)*. Nonostante il nostro organismo presenti sistemi enzimatici preposti all'inattivazione delle ROS (es. superossido dismutasi, catalasi) è necessario l'intervento di antiossidanti esogeni essendo lo stress ossidativo una condizione riscontrabile in ogni cellula. Lo studio condotto da *Ballistreri et al., (2013)* suggerisce che il potere antiossidante delle ciliegie è da attribuire alle diverse classi di polifenoli e agli acidi organici presenti nel frutto.

Polifenoli

L'interesse per polifenoli nasce negli ultimi anni in seguito alla scoperta delle loro proprietà antiossidanti particolarmente utili nella prevenzione di malattie cronico-degenerative. Dal punto di vista chimico, i polifenoli sono una classe di composti organici di origine vegetale costituiti da più anelli aromatici associati a diversi gruppi fenolici. Tali composti sono metaboliti secondari delle piante e presentano un ruolo fondamentale in una vasta gamma di funzioni negli organismi vegetali essendo responsabili della colorazione di fiori, frutti e semi; agiscono come molecole segnale nelle interazioni pianta-microrganismo; proteggono dalla luce ultravioletta; difendono la pianta da patogeni e predatori *(Petti et al., 2009)*. La sottoclasse più numerosa dei polifenoli è costituita dai flavonoidi la cui struttura base comprende un nucleo flavanico contenente 15 atomi di carbonio posti in 3 anelli (Figura 4) *(Majumder et al., 2017)*.

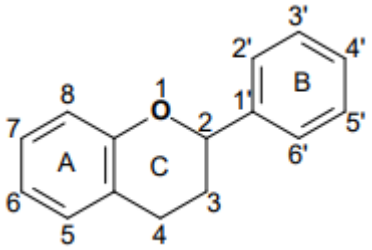


Figura 3 *Nucleo flavanico*

All'interno della famiglia dei flavonoidi troviamo le antocianine (Figura 5), molecole idrosolubili con colorazione che varia dal rosso al blu in base al pH della soluzione che le contiene. Dal punto di vista chimico, le antocianine sono costituite da un anello aromatico [A] legato ad un anello eterociclico [B] contente ossigeno che è a sua volta legato ad un terzo anello aromatico [C] tramite un legame carbonio-carbonio *(Castañeda-Ovando et al., 2009).*

.

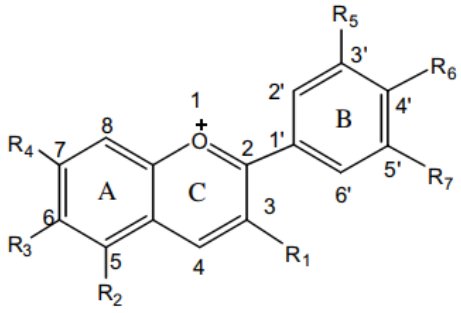


Figura 4 *Struttura generale delle antocianine*

La capacità antiossidante dei polifenoli dipende dal numero e dalla posizione dei gruppi ossidrilici legati all'anello aromatico ed in generale alla geometria della molecola il che permette loro di neutralizzare i radicali liberi e chelare i metalli *(Petti et al., 2009)*. Oltre all'azione antiossidante, i composti fenolici presentano altri effetti benefici come:

- Attività anticancerogena attraverso la modulazione dell'espressione del citocromo P450, famiglia di enzimi coinvolti nella detossificazione dell'organismo (*Pandey et al., 2009*)
- Proprietà antinfiammatoria grazie alla capacità dei polifenoli di inibire la produzione di citochinine lipopolisaccaridiche (*Martin et al., 2017)*
- Attività antibatterica nei confronti di batteri Gram negativi come la *Salmonella typhimurium (Boz et al., 2015)*
- Riduzione nell'insorgenza di malattie cardiovascolari tramite la riduzione delle pressioni sistolica, diastolica e arteriosa *(Wang et al., 2016)*

- Riduzione dell'insorgenza di malattie neurodegenerative come Parkinson e Alzheimer *(Ferrazzano et al., 2009)*

Acidi organici

Gli acidi organici sono molecole ampliamente diffuse nel regno vegetale. Essi sono presenti all'interno delle cellule sia in forma libera sia combinati a formare sali di potassio, sodio, calcio e magnesio. La frutta contiene grandi quantità di acido malico (Figura 6) e acido citrico (Figura 7) entrambi importanti per l'organismo umano. L'acido malico presenta, infatti, attività antiossidante mentre l'acido citrico, in quanto forte agente chelante, aumenta la solubilità dei nutrienti portando alla formazione di complessi organominerali (*Hyun et al., 2015; Abou Chehade et al., 2017*). Tali acidi sono, inoltre, coinvolti nel ciclo di Krebs, principale ciclo di produzione di energia mitocondriale. L'acido malico e l'acido citrico insieme agli zuccheri, sono le principali molecole capaci di stimolare l'organismo portando così ad un aumento della produzione di energia (*Girelli et al., 2016*).

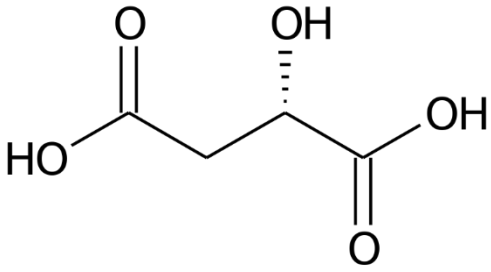


Figura 5 *Struttura chimica dell'acido malico*

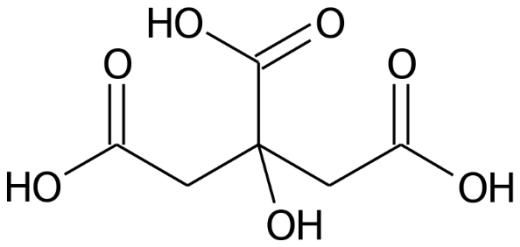


Figura 6 *Struttura chimica dell'acido citrico*

Zuccheri

Gli zuccheri, o glucidi, sono composti organici costituiti da atomi di carbonio, idrogeno ed ossigeno presenti in grande quantità in verdura e frutta come la ciliegia. Tra i carboidrati quelli più importanti sono glucosio, fruttosio (Figura 8), saccarosio e sorbitolo che, oltre a svolgere la normale funzione energetica, presentano altre proprietà benefiche per l'organismo. Il glucosio è importante per il mantenimento delle cellule neuronali e nella generazione di neurotrasmettitori con conseguente miglioramento della memoria e dei tempi di reazione *(Megenthaler et al., 2013; Giles et al., 2012)*; il fruttosio permette la regolazione degli ormoni legati all'appetito (*Lowette K., 2015*); il sorbitolo previene danni ai denti ed ha effetti positivi sul colon grazie alla produzione, tramite fermentazione, di acidi grassi a catena corta (*Islam et al., 2006*).

SCOPO DEL LAVORO

La legge regionale 64/04 della regione Toscana è stato il primo esempio concreto di normativa volta a ridurre la perdita di biodiversità locale attraverso il recupero, caratterizzazione e mantenimento di varietà vegetali e specie animali autoctone a rischio di estinzione. Il presente lavoro ha lo scopo di analizzare le proprietà nutrizionali di 5 varietà autoctone di ciliegia custodite e classificate nella Banca Regionale del Germoplasma. La caratterizzazione dei profili nutraceutici è stata effettuata attraverso tecniche analitiche tra cui la determinazione del potere antiossidante, il contenuto di polifenoli, flavonoidi nonché il contenuto di specifici polifenoli quali quercetina, cianidina, catechina ed acido cumarico che presentano capacità antiossidanti. Negli ultimi anni è cresciuto notevolmente l'interesse per i frutti con proprietà antiossidanti ovvero capaci di neutralizzare l'azione di radicali liberi, molecole altamente reattive ed instabili, che risultano coinvolti nell'insorgenza di malattie neuro-degenerative come l'Alzheimer e Parkinson ma anche di malattie tumorali e cardiovascolari. La capacità antiossidante della pianta è data dalla presenza di molecole antiossidanti che svolgono la loro azione nei diversi comparti cellulari proteggendo l'organismo dai radicali liberi. Sebbene in letteratura vi siano numerosi dati riguardanti l'attività antiossidante della specie oggetto di studio, la presente indagine è volta ad incrementare tali dati concentrandosi sulle 5 varietà autoctone della regione Toscana precedentemente citate. In questo studio è stato, inoltre, analizzato il contenuto di composti a funzione energetica quali acido malico, acido citrico ed alcuni zuccheri (glucosio, fruttosio, saccarosio e sorbitolo). Con questo studio si è voluto dimostrare l'elevato contenuto di composti antiossidanti nelle varietà autoctone in modo da favorirne la promozione e valorizzazione. Il controllo dei valori rilevati sulle varietà autoctone analizzate è stato effettuato confrontando gli stessi parametri con campioni di ciliegia proveniente dalla grande distribuzione.

MATERIALI E METODI

Reperimento del materiale vegetale

I campioni di ciliegia sono stati raccolti durante l'annata 2017 al loro ottimale grado di maturazione, dalle piante presenti nel campo sperimentale della sede CNR Ivalsa di Follonica, riconosciuto come sezione della Banca Regionale del Germoplasma. Una volta raccolti, i frutti sono stati posti in cella frigorifera a -80°C in modo da arrestare i normali processi interni. Per poter ottenere un concreto raffronto del dato, in questa fase è stata reperita anche una varietà di ciliegia durone recuperata dalla grande distribuzione, così da avere 6 campioni di frutti da analizzare. L'inserimento nello studio del controllo commerciale è utile per conoscere in linea generale la quantità di molecole in analisi presenti nei prodotti della grande distribuzione. Pertanto, la ciliegia durone è stata utilizzata come metro di

paragone nelle analisi. Non è possibile tuttavia considerarla come dato assoluto poiché non rappresenta un dato statisticamente significativo e la varietà di appartenenza è sconosciuta.

Ricerca e metodi di analisi

I metodi utilizzati per la determinazione del potere antiossidante, del contenuto dei polifenoli e di flavonoidi sono stati ricavati da consultazione bibliografica di precedenti lavori. Le tecniche più utilizzate in letteratura sono i saggi colorimetrici, grazie alla loro alta affidabilità dei risultati e ridotti tempi di riproducibilità sperimentale. Tra i diversi metodi esistenti si è scelto il metodo FRAP (Ferric Ion Reducing Antioxidant Power) per quanto riguarda la misurazione del potere antiossidante, il metodo Folin-Ciocalteau per la misura dei polifenoli totali e il metodo dei Sali di Alluminio per la determinazione dei flavonoidi.

Estrazione delle molecole a funzione nutraceutica

L'estrazione delle molecole da analizzare è stata effettuata da frutto congelato. I campioni sono stati sminuzzati e, successivamente, sono stati pesati 2 g di ciascuna ciliegia. A ciascun campione sono stati aggiunti 6 mL di acetone al 70% ($(CH_2)_3O$). La soluzione è stata successivamente agitata tramite vortex, frammentata attraverso omogeneizzatore Miccra rt per un minuto circa e posta nel sonicatore a bagno per 20 minuti per garantire la completa rottura delle componenti cellulari. Il campione è stato quindi nuovamente omogenizzato e posto in centrifuga per 5 minuti a 4000 r.c.f. allo scopo di separare i composti fenolici in sospensione dal particolato. Il surnatante ottenuto è stato filtrato con un filtro a cellulosa Sartorious da 0.45 μm per eliminare tutto il materiale non oggetto dell'analisi *(Abozed, et al., 2014)*.

Metodo FRAP per la determinazione degli antiossidanti

Il metodo colorimetrico FRAP (Ferric Ion Reducing Antioxidant Power) rappresenta una misura diretta del potere riducente totale di una soluzione. Il saggio fu messo a punto da *Benzie & Strain (1996)* al fine di determinare la capacità antiossidante del plasma e successivamente utilizzato per l'analisi di campioni alimentari e botanici. Tale saggio misura la capacità degli antiossidanti di ridurre il complesso Fe(III)- TPTZ (tripiridil-triazina) a Fe(II)-TPTZ ad un pH di 3.6 (Figura 9).

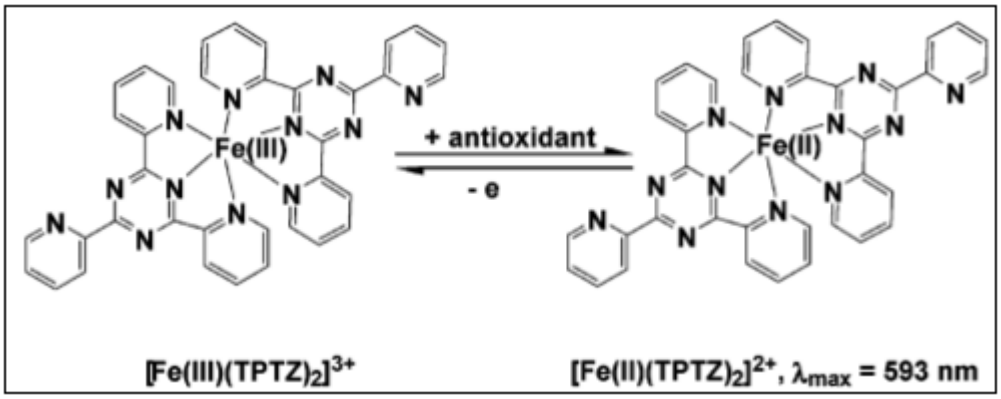


Figura 7 *Metodo FRAP*

Il composto ridotto assume colorazione tendente al blu in ambiente acido il che permette di determinare il potere riducente della soluzione tramite spettrofotometro ad un picco massimo di assorbanza di 593 nm. Il FRAP è un test volto a valutare il mantenimento dello stato redox delle cellule ed è quindi possibile definire, in modo arbitrario, l'unità FRAP come numero di moli di Fe(III) ridotte a Fe(II) da una mole di antiossidante testato.

Per la determinazione degli antiossidanti si sono preparate 4 provette, una per il controllo negativo costituito da acqua e 3 per il campione. L'esperimento è stato condotto in triplo per ogni campione per ottenere una maggiore significatività del dato finale. In ogni provetta sono stati inseriti: 2040 µL di tampone acetato ($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$), 200 µL di TPTZ (2,4,6-tripyridyl-*s*-triazine), 200 µL di cloruro ferrico ($FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$), 20 µL di campione. I campioni sono stati poi posti in stufa per 1 ora a 37°C (Figura 10).

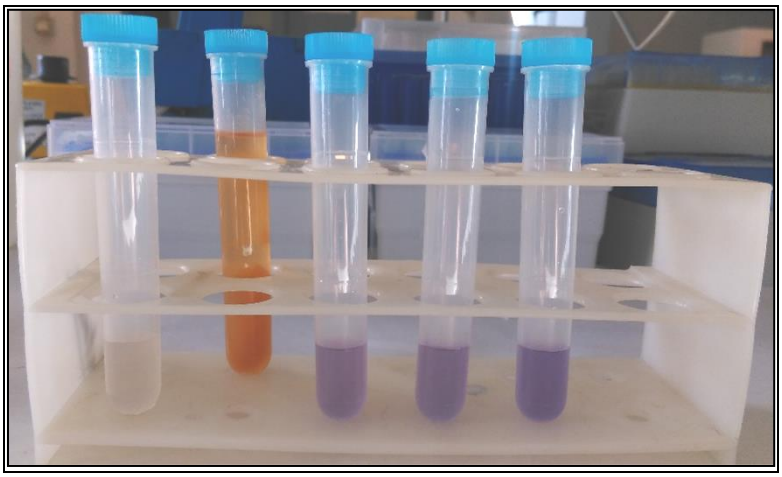


Figura 8 *Campioni del test FRAP*

I dati di assorbanza ottenuti, rapportati ad una retta di calibrazione precedentemente realizzata, hanno permesso di determinare i mg di flavonoidi totali in 100 g di campione. Dei tre valori ottenuti è stata calcolata media e deviazione standard espresse in mmol/g di campione.

Metodo Folin-Ciocalteau per la determinazione dei polifenoli

Il saggio colorimetrico per la determinazione dei polifenoli totali (TCP) è stato inizialmente proposto da Folin e Denis (1912) ed in seguito modificato da Folin e Ciocalteau nel 1927 *(Ainsworth et al., 2007)* per l'analisi del contenuto di tirosina. Tale metodo si basa sull'ossidazione chimica dei composti fenolici da parte di una miscela ossidante, chiamato reattivo di Folin-Ciocalteu (FC), costituita da acido fosfotungstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$). La soluzione ridotta è una miscela di ossidi di colore azzurro la cui intensità risulta essere linearmente proporzionale al numero di residui fenolici presenti sulla molecola antiossidante. Con questo saggio è quindi possibile determinare i residui fenolici tramite spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 765 nm.

Per la determinazione dei polifenoli è stato necessario diluire la soluzione originale dei campioni con acetone al 70% in rapporto 1:5 per i campioni delle varietà Moscatella e Carlotta e con rapporto 1:10 per i campioni delle varietà Crognola, Morellona e Maggiola. Successivamente sono preparate 4 provette, una per il controllo negativo costituito da acqua e 3 per il campione. L'esperimento viene ripetuto in triplicato per ogni campione così da ottenere una maggiore significatività del dato finale. In ogni provetta sono stati inseriti: 500 µL di campione, 3 mL di acqua milliQ, 250 µL del reattivo di Folin-Ciocalteu, 750 µL di soluzione contenente sodio carbonato ($NaCO_3$), 950 µL di acqua milliQ. I campioni sono stati posti 30 minuti in stufa a 37 gradi. È stato quindi letta l'assorbanza del campione a 765 nm tramite spettrofotometro (Figura 11).

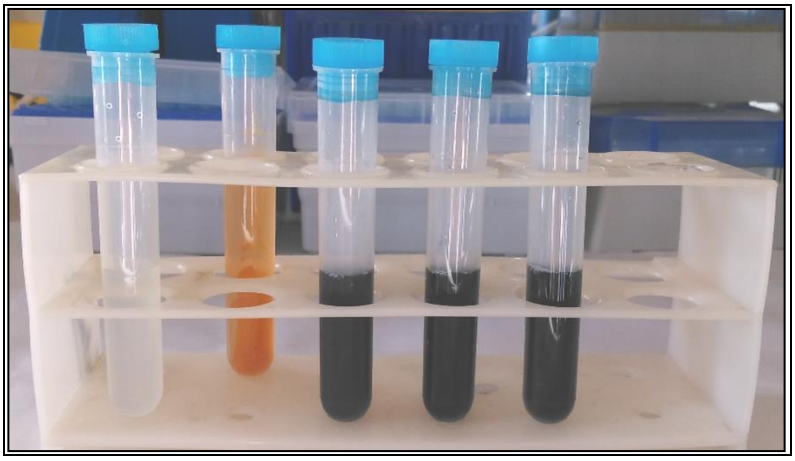


Figura 9 *Campioni del test Folin-Ciocalteau*

I dati di assorbanza ottenuti, rapportati ad una retta di calibratura precedentemente realizzata, hanno permesso di determinare i mg di polifenoli totali in 100 g di campione. Dei tre valori ottenuti è stata calcolata media e deviazione standard espresse in mg/100g.

Metodo dell'Alluminio Cloruro per la determinazione dei flavonoidi

Il metodo dell'alluminio cloruro *(Smirnova et al., 1998)* permette la determinazione dei soli flavonoidi dividendo il loro contributo da quello dei polifenoli totali. Il principio su cui si fonda tale test è la capacità del cloruro di alluminio di generare complessi con i gruppi chimici dei flavonoidi (Figura 12).

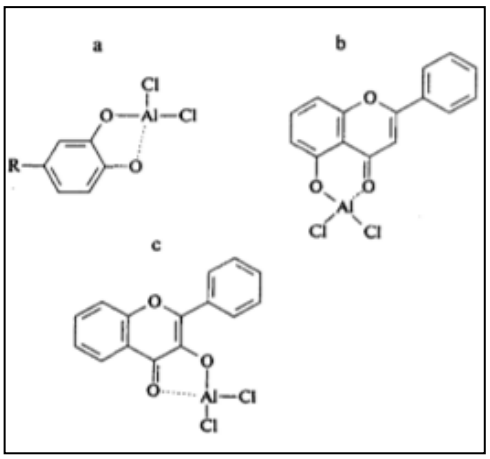


Figura 10 *Flavonoidi con cui il cloruro di alluminio può generare complessi*

La formazione di tali complessi in ambiente acido è accompagnata allo spostamento della banda di assorbimento nello spettro UV che si manifesta nel viraggio della soluzione verso il giallo. Il metodo permette la determinazione del contenuto dei flavonoidi tramite la lettura allo spettrofotometro a 415 nm.

Per la determinazione dei flavonoidi si utilizzano 4 provette, una per il controllo negativo costituito da acqua e 3 per il campione. L'esperimento è stato condotto in triplicato per ogni campione per ottenere una maggiore significatività del dato finale. Sono stati utilizzati 500 µL di campione a cui è stato aggiunto: 1.5 mL di etanolo 95%, 100 µL di soluzione dicloruro di alluminio ($AlCl_3$), 100 µL di soluzione di acetato di potassio (CH_3CO_2K) 1M, 2.8 mL di acqua milliQ. La soluzione ottenuta è stata lasciata 30 minuti a temperatura ambiente (Figura 13).

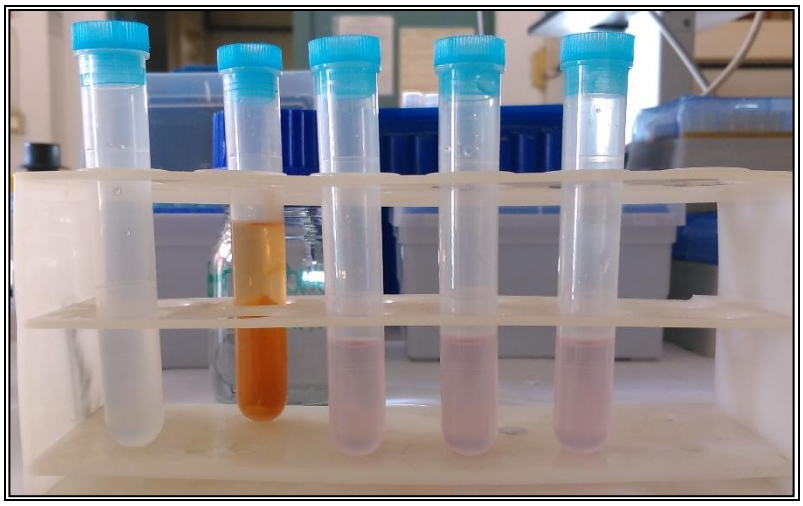


Figura 11 *Campioni del test dell'alluminio cloruro*

Trascorso il tempo di incubazione è stata letta l'assorbanza del campione a 415 nm tramite spettrofotometro. I dati di assorbanza ottenuti, rapportati ad una retta di calibratura precedentemente realizzata, hanno permesso di determinare i mg di flavonoidi totali in 100 g di campione. Dei tre valori ottenuti è stata calcolata media e deviazione standard ed espresse in mg/100g.

Estrazione delle antocianine

I campioni da analizzare sono stati sminuzzati e, successivamente, pesati 3 g per ciascuna varietà di ciliegia. A ciascun campione sono stati aggiunti 9 mL di una soluzione contenente etanolo e HCl 0,1 M. La soluzione è stata successivamente agitata tramite vortex, frammentata attraverso omogeneizzatore Miccra rt e posta nel sonicatore a bagno per 20 minuti per garantire la completa rottura delle componenti cellulari. Il campione è stato quindi nuovamente omogeneizzato e posto in centrifuga per 5 minuti a 4000 r.c.f. al fine di separare i composti fenolici in sospensione dal particolato. Il surnatante ottenuto è stato filtrato con filtro a cellulosa Sartorious da 0.45 micron per eliminare tutto il materiale non utile ai fini dell'analisi. Le estrazioni sono state fatte in triplicato per ogni campione (*Hosu et al., 2014*).

Metodo del pH differenziale per la determinazione delle antocianine

Il metodo del pH differenziale sfrutta la capacità delle antocianine di modificare reversibilmente la propria struttura in seguito ad una variazione del pH della soluzione. Una diversa struttura della molecola comporta una variazione dello spettro di assorbimento permettendo così la misurazione delle antocianine totali in modo rapido ed accurato anche in presenza di composti interferenti.

Per la determinazione delle antocianine sono stati posti in due provette 3 mL di estratto per ciascun campione (Figura 14). A ogni provetta sono stati aggiunti 5 ml di due differenti tamponi: potassio

cloruro 0.025 M a pH=1 e sodio acetato 0.4 M a pH=4.5 entrambi corretti con acido cloridrico. Dopo 30 minuti di incubazione a temperatura ambiente, le soluzioni ottenute sono state lette allo spettrofotometro con le lunghezze d'onda di 510 nm e 700 nm rispettivamente (*Tonutare et al., 2014*).

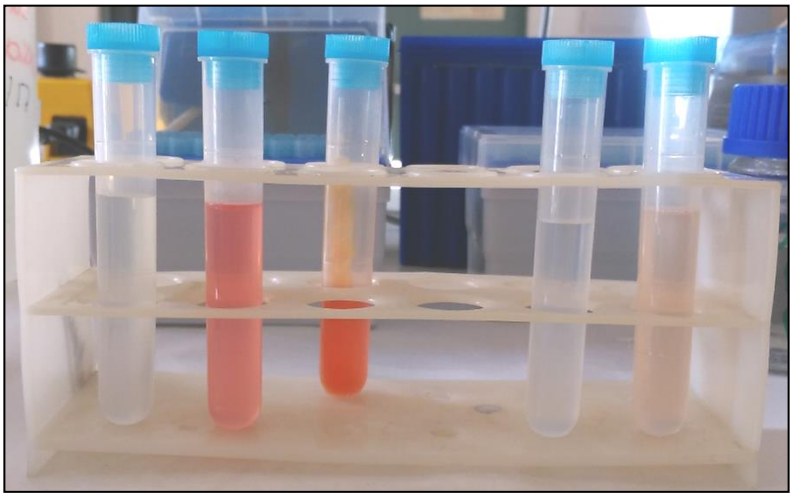


Figura 12 *Campione del test del pH differenziale*

Analisi cromatografica mediante HPLC

La cromatografia è una tecnica quali-quantitativa che permette di separare e determinare i singoli componenti di una miscela complessa. La separazione si basa sulla ripartizione del campione tra fase mobile e fase stazionaria presente nella colonna cromatografica. La differente struttura chimica delle molecole comporta una loro diversa affinità per la fase stazionaria presente in colonna. È dunque necessario definire il tempo di ritenzione che è il tempo che occorre alla molecola per percorrere l'intera fase stazionaria. Maggiore è affinità della molecola per la fase stazionaria, maggiore sarà il tempo di ritenzione e viceversa. In questo lavoro la separazione cromatografica di acidi organici, polifenoli, ed antocianine è stata effettuata mediante un sistema HPLC Perkin Elmer Nelson 3200 Series con campionatore automatico abbinato ad una colonna C18. Le molecole sono state rilevate mediante monitor UV. Per la determinazione del contenuto zuccherino dei campioni è stato, invece, utilizzato lo strumento Waters 2487 Pompa 600 E con rilevatore a indice di rifrazione 2410 e colonna Sugar Pak 1 300mm X 6,5 mm a scambio ionico. Questo strumento presenta un sistema di iniezione manuale.

Preparazione del campione per analisi all'HPLC

I campioni da analizzare sono stati sminuzzati e sono stati pesati 0.5 g, 2 g, 4 g e 2 g di campione per la determinazione rispettivamente di acidi organici, polifenoli, antocianine e zuccheri. A ciascun

campione sono stati successivamente aggiunti i solventi specifici per l'estrazione con le seguenti modalità:

- 4 mL e 5 mL di acqua distillata rispettivamente per acidi organici e zuccheri
- 2 mL di soluzione contenente metanolo e HCl 0,1% per polifenoli e antocianine

La soluzione risultante è stata agitata tramite vortex, frammentata attraverso omogeneizzatore Miccra rt e posta nel sonicatore per 20 minuti. Il campione è stato poi nuovamente omogeneizzato e posto in centrifuga per 5 minuti a 4000 r.c.f.. Il surnatante ottenuto è stato filtrato con filtro a cellulosa Sartorious da 0.45 micron.

Condizioni della corsa cromatografica

I metodi utilizzati per le analisi cromatografiche sono stati ricavati da bibliografia e successivamente ottimizzati in base allo scopo del presente lavoro. I metodi utilizzati per la determinazione di acidi organici, polifenoli e antocianine sono stati successivamente inseriti all'interno del software (Turbocrom) dello strumento (Figura 15). Per tutta la durata dell'analisi la colonna è stata mantenuta ad una temperatura di 30°C. Il flusso, la lunghezza d'onda e le soluzioni della fase mobile variano in base all'anali eseguita. Di seguito vengono riportate le specifiche delle analisi.

- Determinazione acidi organici: flusso 0.8 ml/min, lunghezza d'onda 210 nm, canale unico in cui è stata utilizzata una soluzione contenente $KPO_2KH_2PO_4$, acido fosforico a pH 2,6 con eluizione isocratica che viene mantenuta per un tempo di corsa di 15 minuti (*Scherer et al., 2012*)

- Determinazione dei polifenoli: flusso 1ml/min, lunghezza d'onda 280 nm, canale A con acqua MilliQ e canale B con una soluzione di acetonitrile allo 0,02% ed acido trifluoroacetico per un tempo di corsa di 21 minuti (*Kumar et al., 2008*)

- Determinazione delle antocianine: flusso 1 ml/min, lunghezza d'onda 530, canale A con soluzione con 90% acqua e 10% acido formico, canale B con soluzione di 45% acqua, 22,5% acetonitrile, 10% acido formico, 22,5% metanolo per un tempo di corsa di 65 minuti (*Nyman et al., 2001*)

- Determinazione degli zuccheri: flusso 0.5 ml/min, canale A eluizione isocratica in acqua MilliQ, per un tempo di corsa di 20 minuti (*Cámara et al., 1996*)

La rilevazione e quantizzazione delle diverse molecole è stata effettuata attraverso i sopracitati metodi su standard delle stesse molecole, acquistata dalla ditta Sigma Aldrich, a concentrazioni crescenti.

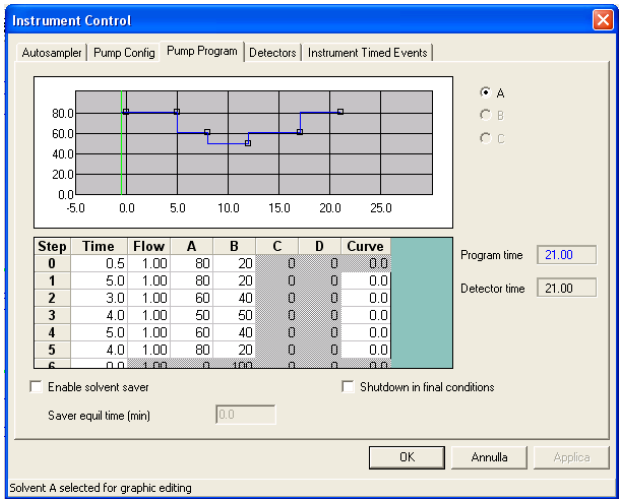


Figura 13 *Condizione di corsa cromatografica nel software Turbocrom*

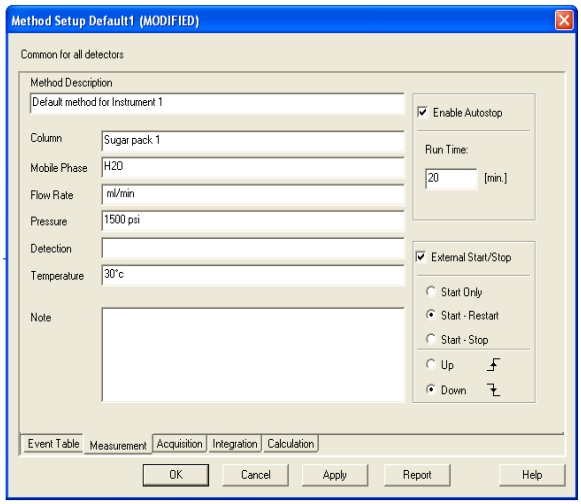
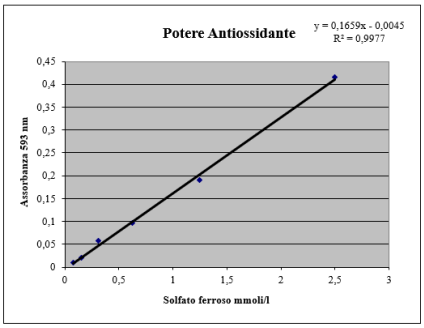
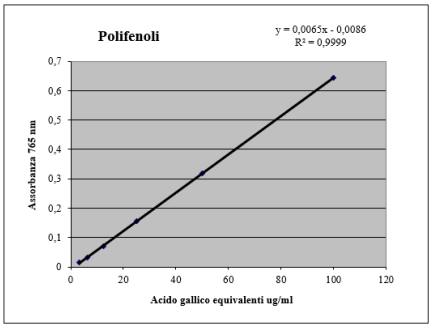


Figura 14 *Condizioni di corso cromatografica per i composti zuccherini*

Elaborazione dei dati

L'elaborazione dei dati ottenuti dalle analisi colorimetriche è stata effettuata mediante confronto con le rispettive rette di calibrazione (Figura 17, 18 e 19). Le rette sono state costruite precedentemente tramite soluzioni a titolo noto di standard universalmente accettati quali il solfato ferroso per il potere antiossidante, l'acido gallico per i polifenoli e la quercetina per i flavonoidi. I valori ottenuti sono stati relazionati all'assorbanza ed inseriti all'interno del programma Microsoft Excel che costruisce una retta di calibrazione secondo il metodo dei minimi quadrati.





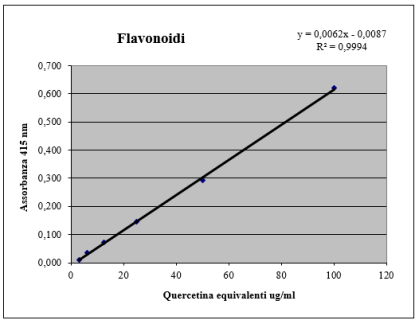


Figura 15, 18 e 19 *Rette di calibrazione per valutare il contenuto di antiossidanti, polifenoli e flavonoidi totali*

Il contenuto di antocianine è stato, invece, calcolato come cianidina-3-O-glucoside (PM= 449,2 e ε = 26900) e il risultato espresso come mg/100g. L'assorbanza (A) del campione è stata calcolata tramite le seguenti equazioni:

$$A = (A_{520} - A_{700})_{pH1.0} - (A_{520} - A_{700})_{pH4.5}$$

Per

Equazione 1 *Calcolo dell'assorbanza*

$$TA\left(\frac{mg}{g_{ex}}\right) = \left[TA\left(\frac{mg}{l}\right) / 100\right] / m_{ex}(g)$$

Equazione 2 *Antocianine totali*

quanto riguarda la rilevazione e quantizzazione di acidi organici, polifenoli, antocianine e zuccheri si è proceduto ad un confronto tra i cromatogrammi ottenuti dalle analisi di campioni di ciliegia con quelli realizzati utilizzando soluzioni standard potendo così determinare il valore di concentrazione delle singole molecole.

RISULTATI

Capacità antiossidante

La ciliegia è una eccellente risorsa di una vasta gamma di composti antiossidanti che hanno la capacità di interferire con il ciclo ossidativo inibendo o ritardando il danno a carico delle biomolecole (*Oroian et al.*, 2015). Tramite il metodo FRAP è stato possibile determinare la capacità antiossidante totale potendo così definire un potenziale effetto positivo del frutto sulla salute umana. Nella Figura 20 sono riportate le concentrazioni di antiossidanti (espresse in mmol/g di campione) per le ciliegie oggetto dello studio. Dal grafico emerge che la capacità antiossidante del prodotto commerciale presenta un valore di 1,13 ± 0,04 mmol/g che risulta inferiore rispetto alle ciliegie autoctone analizzate in questo studio. Il contenuto di antiossidanti nei frutti coltivati localmente, invece, presenta valori compresi tra 3,17 ± 0,01 mmol/g della varietà Crognola e 1,72 ± 0,12 mmol/g della varietà Maggiola.

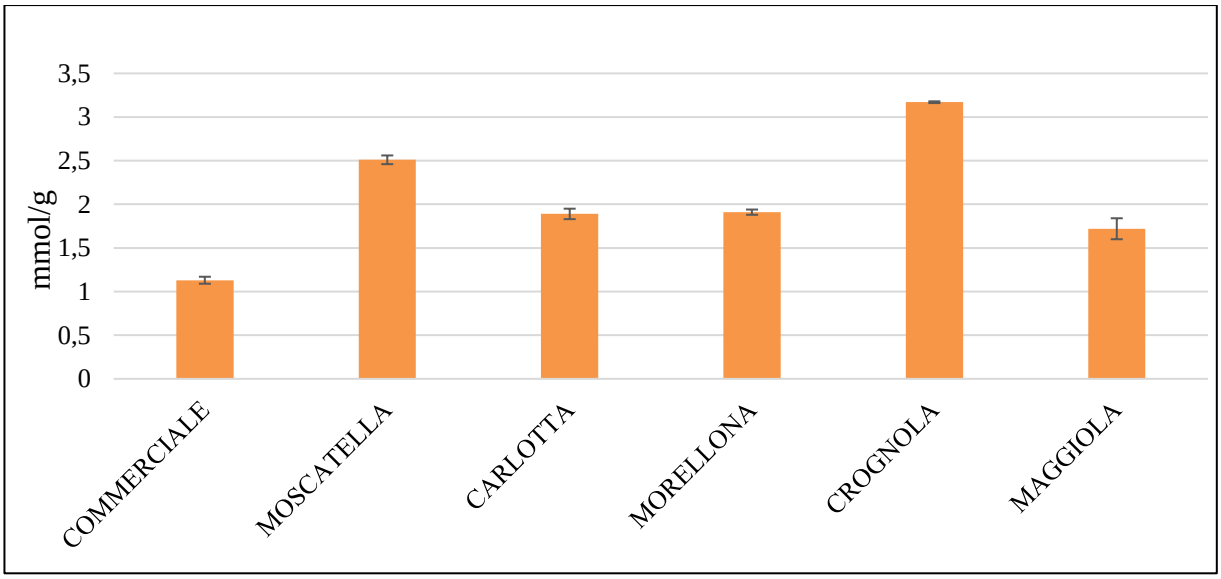


Figura 20 *Riporta i valori ottenuti dal saggio FRAP, grazie al quale viene evidenziato il potere antiossidante*

Contenuto di polifenoli totali

I polifenoli sono metaboliti secondari presenti in modo ubiquitario all'interno degli organismi vegetali. I composti fenolici presentano azione antiossidante sono cioè in grado di eliminare i radicali liberi con conseguente riduzione di insorgenza di malattie cardiovascolari, malattie neuro-degenerative e tumori (*Ferrazzano et al., 2009*). Con il saggio colorimetrico Folin-Ciocalteau è stato possibile determinare il contenuto di polifenoli nelle varietà di ciliegie toscane confrontando i valori con quelli ottenuti per la ciliegia durone e in seguito riportate nel grafico sottostante (Figura 21).

Come è possibile notare dal grafico, la ciliegia durone presenta valori relativamente bassi rispetto ai prodotti locali aggirandosi attorno al 146,05 ± 2,70 mg/100g. Il range di valori riscontrati nei frutti delle varietà autoctone presenta valori compresi tra 368,18 ± 5,70 mg/100g della varietà Crognola e 195,15 ± 11,90 mg/100g della varietà Moscatella. Da questa analisi emerge che le varietà locali presentano valori di polifenoli totali superiori al controllo commerciale analizzato, giustificando così il loro apporto nella capacità totale del frutto.

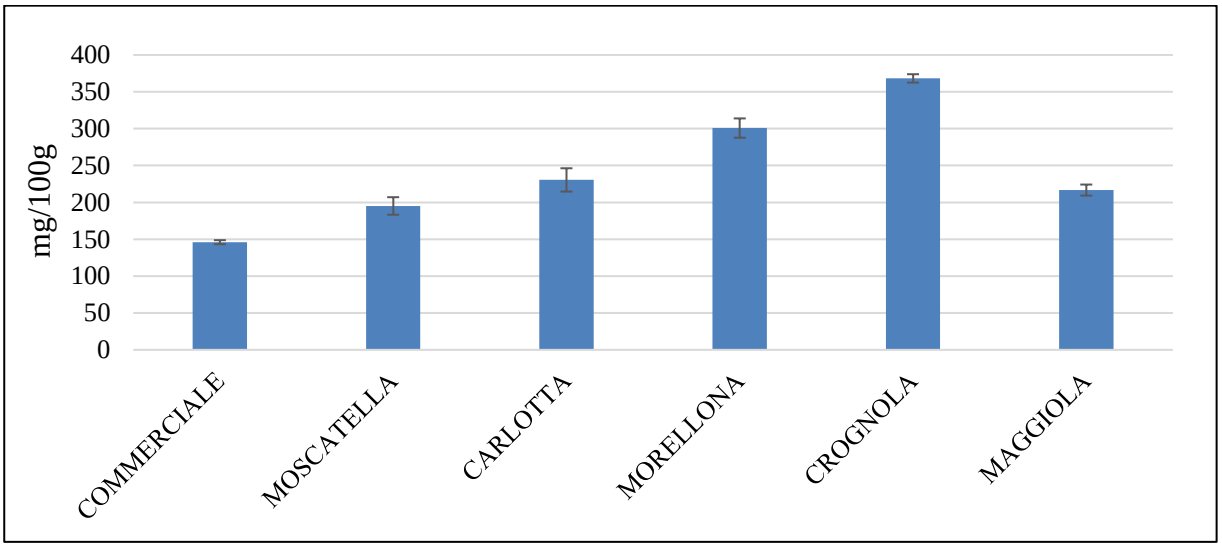


Figura 21 *Riporta i valori emersi dal saggio Folin-Ciocalteau, grazie al quale viene evidenziata la concentrazione di polifenoli*

Contenuto di flavonoidi totali

I flavonoidi sono la sottoclasse più numerosa dei polifenoli e, come essi, presentano capacità antiossidanti. Dal metodo dell'alluminio cloruro è stato possibile determinare il contenuto totale dei flavonoidi confrontando i valori delle varietà locali con quelli di un prodotto commerciale. I risultati riportati nella Figura 22 mostrano come la varietà durone presenta valori di flavonoidi inferiori rispetto a quelli delle varietà autoctone. Il frutto commerciale presenta, infatti, un valore di 32,21 ± 2,79 mg/100g mentre i prodotti locali presentano variazioni da un massimo di 87,21 ± 8,42 mg/100g della varietà Carlotta ad un valore minimo di 36,41 ± 2,51 mg/100g per la varietà Maggiola.

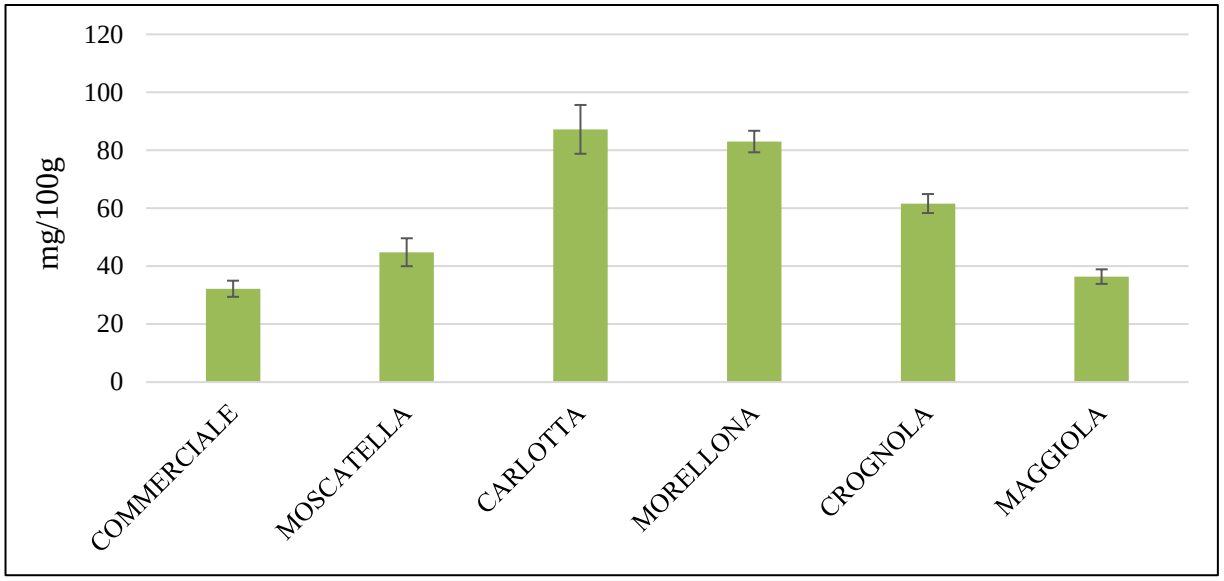


Figura 22 *Riporta i valori emersi dal saggio dell'alluminio cloruro, grazie al quale viene evidenziata la concentrazione di flavonoidi*

Contenuto di antocianine totali

Le antocianine appartengono alla classe dei flavonoidi e costituiscono una delle principali classi di pigmenti vegetali. Attraverso il metodo dei pH differenziali è stato possibile determinare il contenuto di antocianine nelle ciliegie oggetto di studio. Nel presente lavoro le analisi sono state effettuate confrontando il contenuto di antocianine delle varietà locali con quello del prodotto commerciale. Dalla Figura 23 si può notare che la ciliegia durone presenta valori relativamente bassi rispetto ai prodotti locali con valori di 24,65 ± 2,3 mg/100g. L'intervallo di valori riscontrati nelle ciliegie locali varia da un massimo di 69,41 ± 2,5 mg/100g per la varietà Morellona e valore minimo di 27,04 ± 2,40 mg/100g per la varietà Moscatella. Questa ampia variabilità di dati è probabilmente dovuta al fatto che esistono diversi fattori che possono influenzare il contenuto di antocianine nelle ciliegie come la maturità del frutto, la collocazione geografica della pianta, la diversa esposizione alla luce e la temperatura *(Chaovanalikit et al., 2004)*.

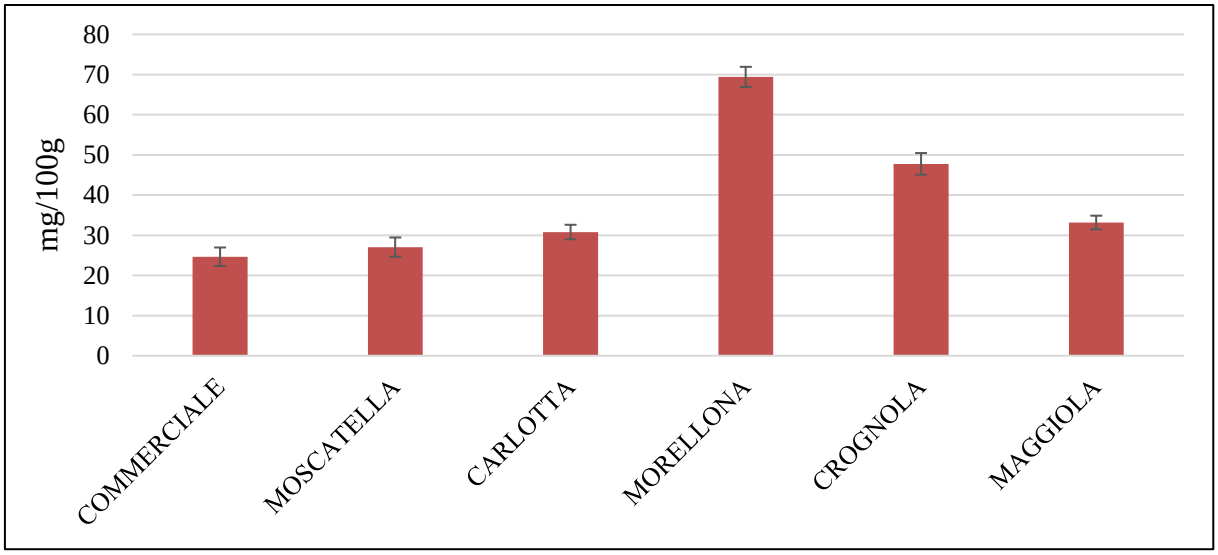


Figura 23 *Riporta i valori emersi dal saggio del pH differenziale, grazie al quale viene evidenziata la concentrazione di antocianine*

Contenuto di acido cumarico e catechine

L'acido cumarico e le catechine sono due polifenoli che, in quanto tali, presentano capacità antiossidante grazie alla quale manifestano effetti positivi sulla riduzione di tumori, diminuiscono l'insorgenza di ictus e malattie neuro-degenerative come Parkinson e Alzheimer e prevengono la comparsa di malattie cardiovascolari (*Braicu et al., 2013*). Oltre alla capacità antiossidanti, l'acido cumarico presenta anche attività antibatterica nei confronti di batteri Gram negativi come la *Salmonella typhimurium* (*Boz, 2015*). Le analisi dei composti fenolici è stata effettuata tramite cromatografia ad alta prestazione (Figura 26) e i dati riportati nella Figura 24. Anche in questo caso, la quantità dei due flavonoidi assume valore minimo per il la ciliegia durone con valori di 8,97 ± 0,1 µg/g per l'acido cumarico e 15,85 ± 1,1 µg/g per le catechine. La concentrazione di acido cumarico nei frutti toscani presenta range di valori compresi tra 10,13 ± 0,3 µg/g (Moscatella) e 38,11 ± 0,3 µg/g (Crognola) mentre la concentrazione di catechine presenta intervallo compreso tra 30,93 ± 1,9 µg/g della varietà Carlotta a 72,54 ± 2,3 mg/g per la varietà Morellona.

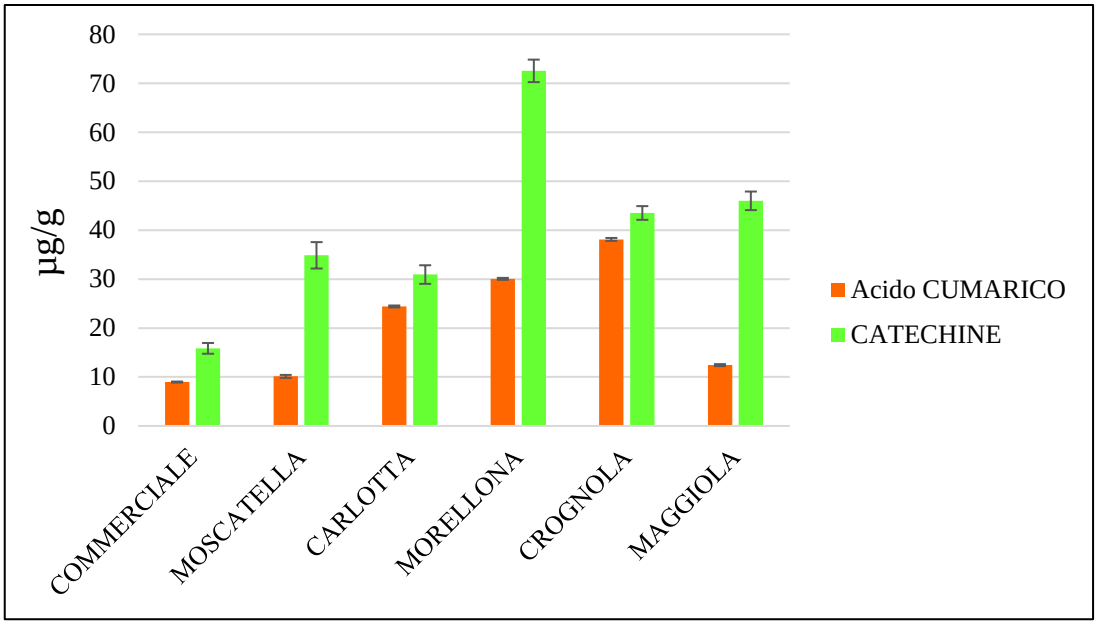


Figura 24 *Riporta i valori emersi dalle analisi all'HPLC in cui vengono evidenziate la concentrazione di acido cumarico e catechine nelle ciliegie oggetto di studio*

Contenuto di quercetina e cianidina

Quercetina e cianidina sono flavonoidi di particolare importanza per la loro capacità antiossidante grazie alla quale, agendo da antagonisti nei confronti delle ROS, riducono l'insorgenza di malattie cronico-degenerative e tumori. Accanto a tale capacità, la quercetina presenta anche proprietà antinfiammatorie, anticancerogene e di prevenzione di malattie cardiovascolari (*Wang et al., 2016*). Nel presente lavoro la determinazione dei due flavonoidi è stata effettuata attraverso cromatografia ad alta prestazione, essenziale per la misurazione precisa dei contenuti delle molecole (Figure 26 e 27). Nella Figura 25 sono state messe a confronto le concentrazioni di quercetina e cianidina nelle ciliegie oggetto del presente studio. Dai dati ottenuti è possibile affermare che tutti i frutti locali presentano una concentrazione più elevata dei due composti rispetto al prodotto commerciale. Nella ciliegia durone, infatti, è stato riscontrato un contenuto di quercetina pari a 25,62 ± 2,1 µg/g e di cianidina di 17,84 ± 1,7 µg/g entrambi inferiori rispetto alle varietà autoctone. I frutti coltivati localmente presentano intervallo di valori compresi tra 95,33 ± 2,1 µg/g della varietà Crognola e 27,93 ± 1,6 µg/g della Moscatella per la quercetina e range di valori di 74,82 ± 1,1 µg/g (Morellona) e 33,54 ± 1,6 µg/g (Moscatella) per la cianidina.

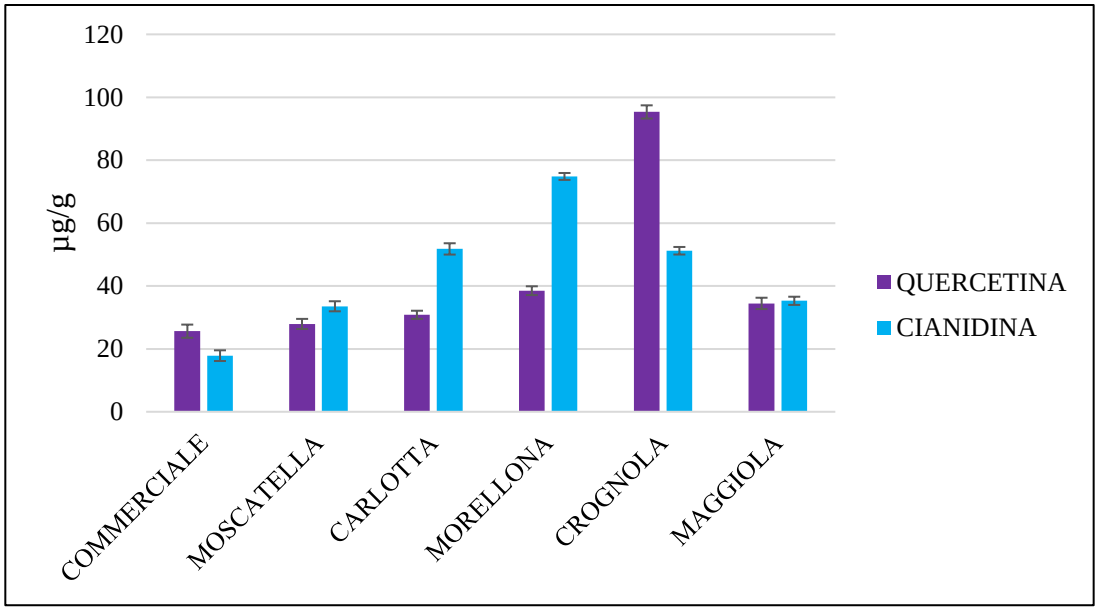


Figura 25 *Riporta i valori emersi dalle analisi all'HPLC in cui vengono evidenziate la concentrazione di quercetina e cianidina nelle ciliegie oggetto di studio*

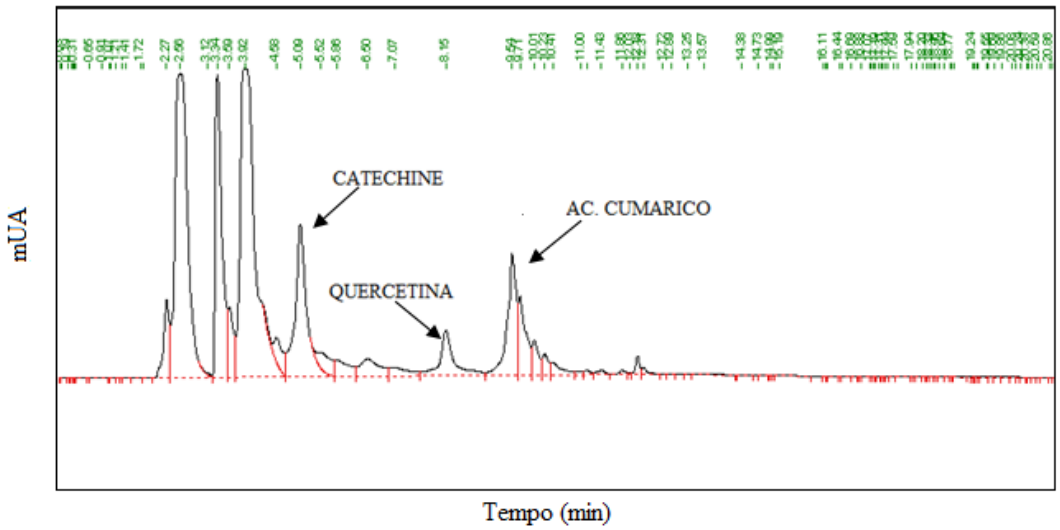


Figura 26 *Cromatogramma di un'analisi HPLC riportante i picchi dei polifenoli*

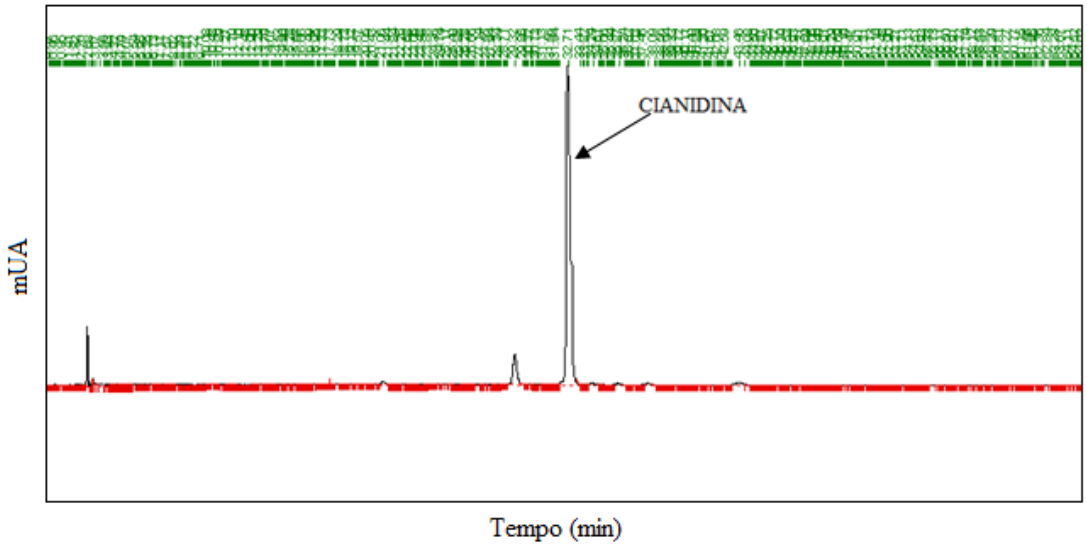


Figura 27 *Cromatogramma di un'analisi HPLC riportante i picchi delle antocianine*

Contenuto di acidi organici

La determinazione di acido citrico e malico è stata effettuata attraverso cromatografia ad alta prestazione (Figura 30) e i risultati sono stati successivamente riportati nella Figura 28 e Figura 29. Le minori concentrazioni dei due acidi sono state riscontrate nella ciliegia durone con valori di 43,21 ± 0,07 µg/g per l'acido citrico e 665, 12 ± 2,2 mg/g per l'acido malico. Nelle varietà autoctone toscane analizzate, la concentrazione di acido citrico presenta valore massimo di 222,31 ± 0,02 µg/g per la ciliegia Morellona e valore minimo di 91,24 ± 0,03 µg/g per la Crognola. L'importanza di questo acido organico a basso peso molecolare risiede nelle sue proprietà chelanti grazie alle quali, aumentando la solubilità dei nutrienti, permette la formazione di complessi organominerali *(Abou Chehade et al., 2017)*. La maggiore concentrazione di acido malico è stata registrata per la ciliegia Carlotta (819,42 ± 1,9 mg/g) mentre la minore concentrazione per la ciliegia Crognola (91, 24 ± 0,03 mg/g). Nelle ciliegie, l'acido malico rappresenta circa il 98% del contenuto totale di acidi organici i quali hanno la capacità di inibire i processi fermentativi e mantenere così inalterate le proprietà organolettiche del frutto. Nell'organismo umano tale acido organico, ha la funzione di stimolare il metabolismo ed aumentare la produzione di energia risultando così utile ai soggetti che soffrono di fibromialgia e stanchezza cronica. Altra caratteristica importante dell'acido malico è la sua capacità antiossidante svolgendo un ruolo cruciale nella prevenzione di malattie neuro-degenerative (*Hyun et al., 2015)*.

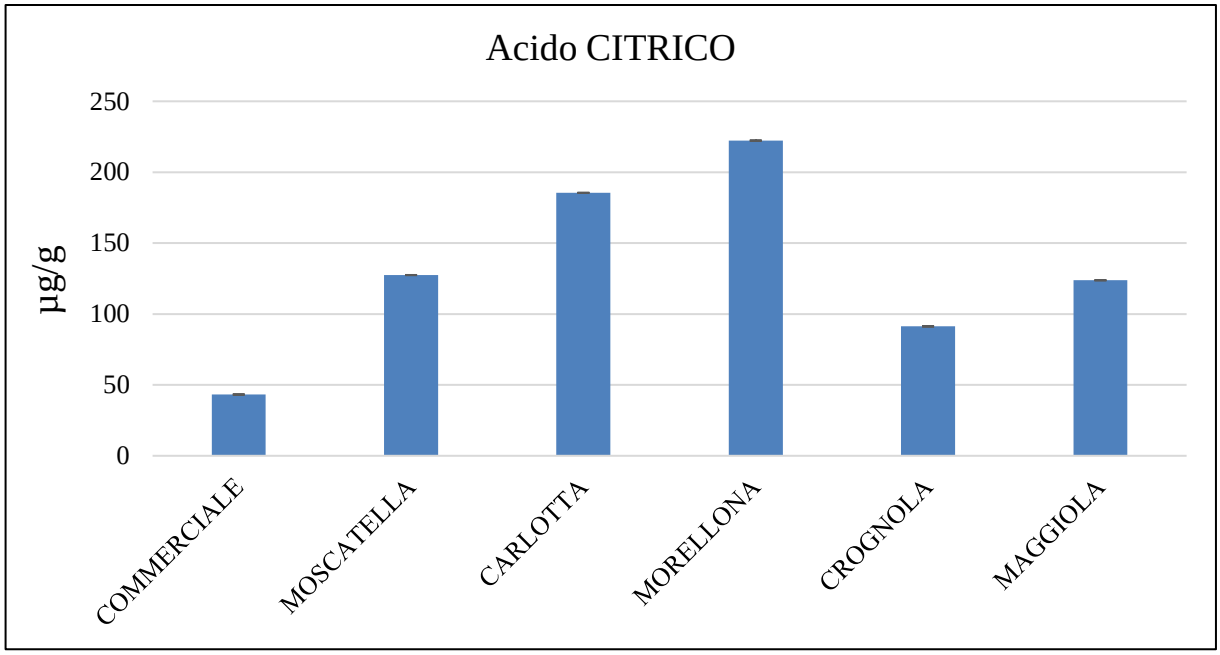


Figura 28 *Riporta i valori emersi dalle analisi all'HPLC in cui vengono evidenziate la concentrazione dell'acido citrico nelle ciliegie oggetto di studio*

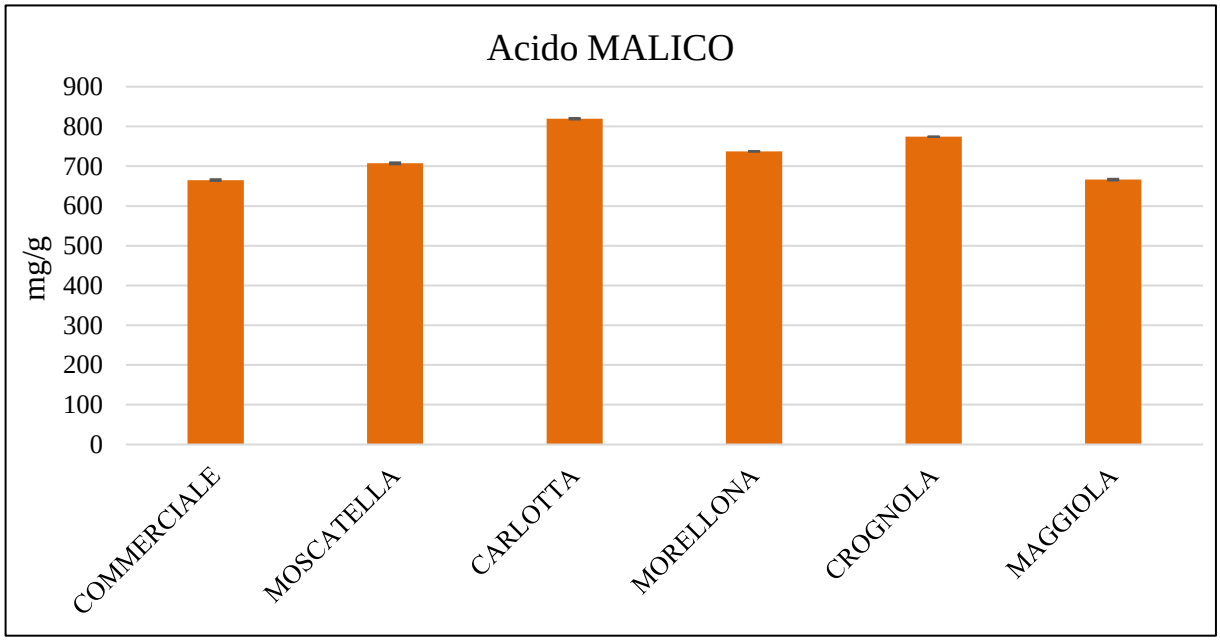


Figura 29 *Riporta i valori emersi dalle analisi all'HPLC in cui vengono evidenziate la concentrazione dell'acido malico nelle ciliegie oggetto di studio*

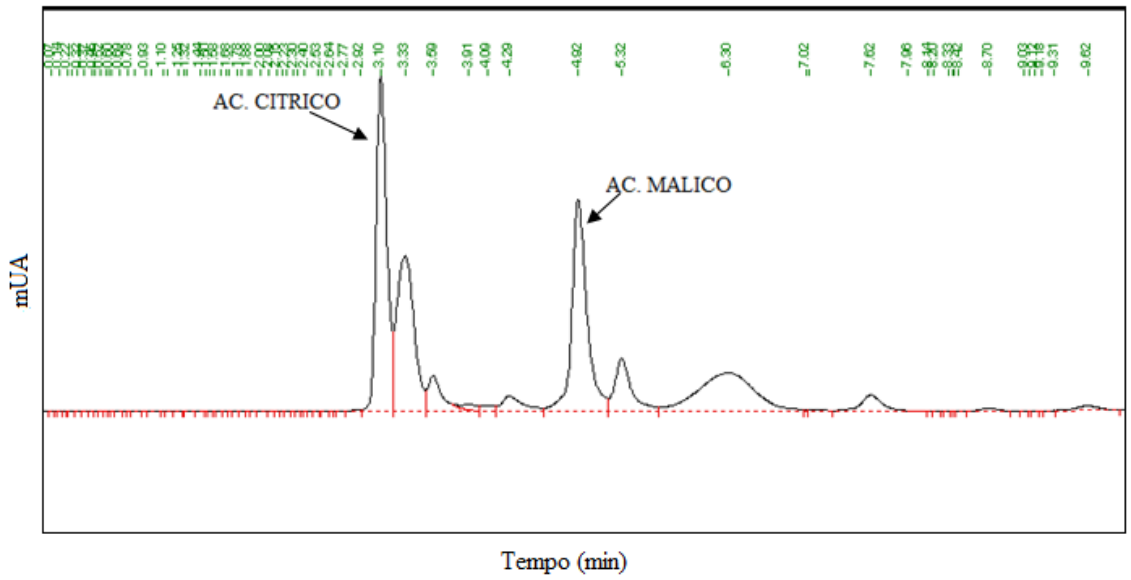


Figura 30 *Cromatogramma di un'analisi HPLC riportante i picchi dell'acido malico e acido citrico*

Contenuto di zuccheri

Gli zuccheri rappresentano la principale fonte di energia risultando, quindi, indispensabili nella dieta di ognuno di noi. La ciliegia è costituita principalmente da carboidrati in cui è il glucosio ad essere il più abbondante seguito da fruttosio, sorbitolo e saccarosio (*Kelebek et al., 2011*). La quantità dei diversi zuccheri analizzati contenuti nei frutti autoctoni e nel frutto commerciale sono state analizzate tramite cromatografia ad alta prestazione (Figura 32). Dal grafico in Figura 31 è possibile notare come i parametri studiati differiscano a seconda della varietà, ma il dato importante è che tutti i frutti autoctoni presentano una concentrazione più elevata dei glucidi rispetto al prodotto commerciale. Nelle varietà autoctone il glucosio presenta range di valori compreso tra 21,36 ± 0,14 µg/g della varietà Carlotta e 14,27 ± 0,13 µg/g della ciliegia Maggiola mentre la varietà durone presenta valore di 12,23 ± 0,21 µg/g. Il contenuto di fruttosio, invece, comprende un intervallo di valori che va da 19,27 ± 0,17 µg/g della varietà Crognola e 13,07 ± 0,19 µg/g della varietà Maggiola mentre la ciliegia durone presenta valore di 13,95 ± 0,31 µg/g. Il contenuto di sorbitolo nella ciliegia durone è di 3,42 ± 0,09 µg/g che risulta essere inferiore al range di valori delle varietà autoctone che comprende valori da 8,82 ± 0,09 µg/g (Crognola) a 4,70 ± 0,10 µg/g (Moscatella). Il contenuto di saccarosio è, in generale, molto basso ed assente in alcune varietà. Nonostante questo è la varietà Crognola ad avere il maggiore contenuto di tale zucchero con un valore di 0,55 ± 0,02 µg/g.

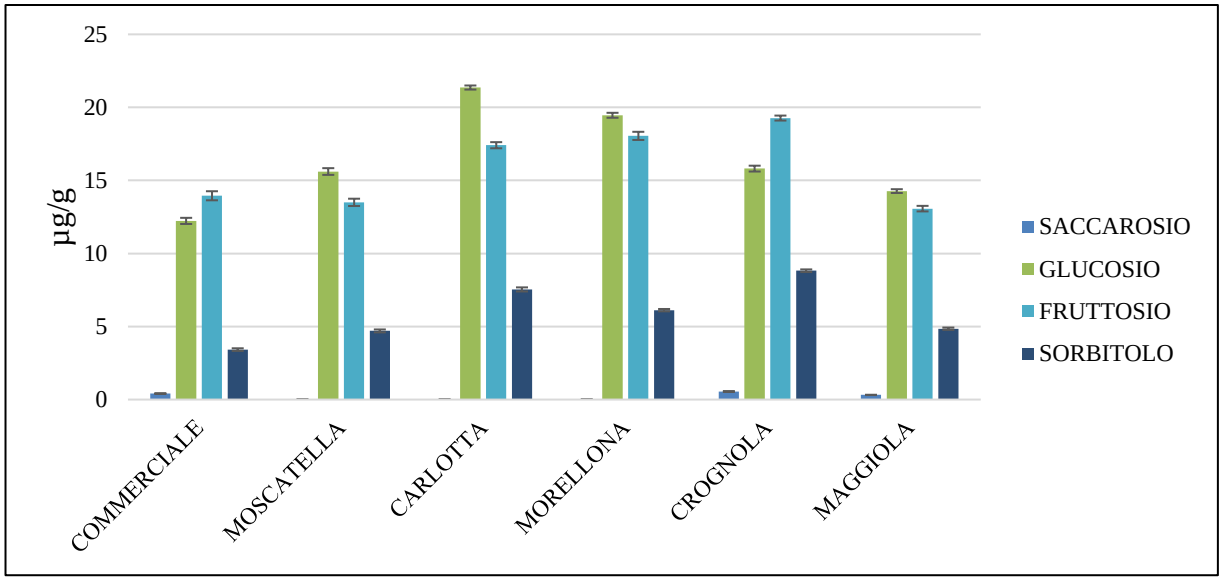


Figura 31 *Riporta i valori emersi dalle analisi all'HPLC in cui vengono evidenziate la concentrazione di saccarosio, glucosio, fruttosio e sorbitolo nelle ciliegie oggetto di studio*

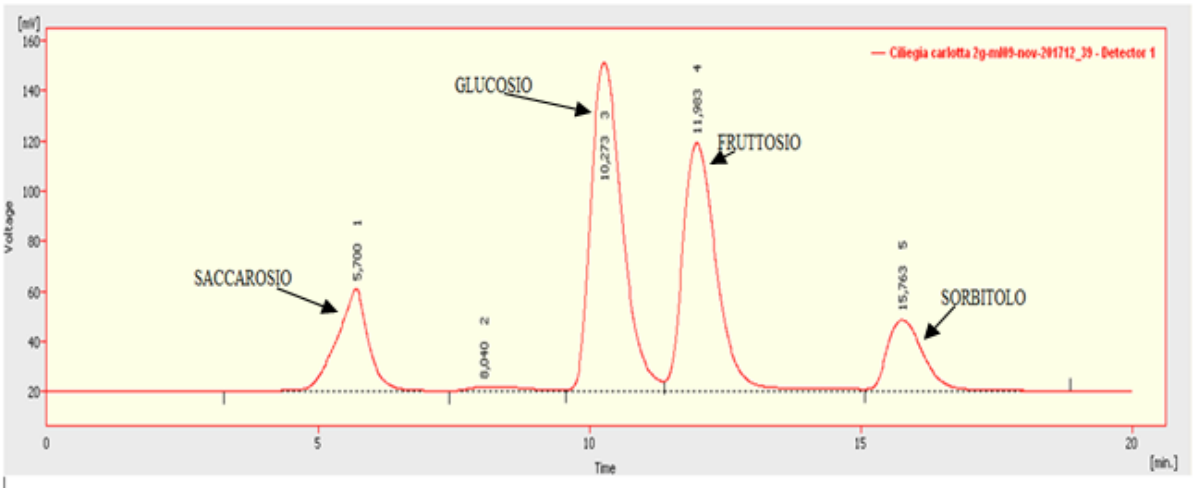


Figura 32 *Cromatogramma di un'analisi HPLC riportante i picchi degli zuccheri analizzati*

ANALISI DI METABOLITI SECONDARI AD ATTIVITA' NUTRACEUTICA IN VARIETA' AUTOCTONE TOSCANE DI ALLIUM CEPA L.

Il territorio della Regione Toscana è caratterizzato da ottime condizioni climatico-ambientali che favoriscono la crescita di un'ampia varietà di specie vegetali. Per questo motivo, la tutela della biodiversità in agricoltura è uno dei più importanti impegni della Regione Toscana già dal 1997 ed attualmente essa opera in questo campo grazie alla LR 64/04 dal titolo "Tutela e valorizzazione del patrimonio di razze e varietà locali di interesse agrario, zootecnico e forestale". A tale scopo è stato creato un database genetico (la Banca Regionale del Germoplasma) il cui obbiettivo è di catalogare le specie presenti nel territorio, permettendone la riproduzione e il mantenimento. Molte delle piante inserite nel database, oltre a rappresentare una fonte di variabilità genetica, sono importanti perché spesso contengono molecole dotate di funzioni nutraceutiche. I bulbi di cipolla sono particolarmente ricchi di queste sostanze, per tale motivo possono essere classificati come "functional food". Con questo termine si indicano quegli alimenti per i quali è stata dimostrata un certo effetto benefico nei confronti della salute umana, oltre ad effetti nutrizionali adeguati. Il presente lavoro si è concentrato sullo studio della capacità antiossidante, sul contenuto totale di polifenoli, flavonoidi e antocianine e sul contenuto di specifici flavonoidi (quercetina, miricetina e campferolo) e di specifiche antocianidine (peonidina e petunidina) presenti in sei varietà autoctone di cipolla (cipolla della Maremma, cipolla rossa Massese, cipolla di Treschietto, cipolla rossa della Valtiberina, cipolla rossa di Lucca e cipolla rossa Fiorentina). Esse sono catalogate nella banca Regionale Toscana e sono tutte a rischio di erosione genetica. I valori rilevati nelle varietà autoctone sono stati confrontati con quelli ottenuti da campioni di cipolla proveniente dalla grande distribuzione. Le analisi condotte hanno confermato che i prodotti locali sono caratterizzati da proprietà nutraceutiche interessanti e talvolta migliori rispetto alla varietà commerciale; per esempio, sono stati osservati valori più alti di anti-ossidanti, polifenoli, flavonoidi ed antocianine. Questi dati sottolineano ulteriormente l'importanza di preservare il germoplasma autoctono della cipolla e rimarcano il potenziale salutistico dei bulbi autoctoni rispetto ai prodotti commerciali aprendo importanti prospettive per una alimentazione sana e sostenibile.

SCOPO DEL LAVORO

La salute umana *in primis* si costruisce a tavola, sulla base del cibo che mangiamo. È dunque fondamentale dare la giusta importanza a una dieta varia ed equilibrata, caratterizzata dall'assunzione bilanciata dei vari nutrienti, scegliendo cibi ricchi di molecole funzionali e derivanti il più possibile da coltivazioni biologiche, locali e rispettose dell'ambiente. **La salvaguardia del pianeta e delle sue biodiversità passa anche dalla tavola e dal cibo che scegliamo**. Per questo motivo, scegliere ogni

giorno un'alimentazione che sia sostenibile per il nostro pianeta e fonte di benessere per l'uomo sta diventando sempre più necessario. Consumare prodotti di stagione è un vantaggio sia a livello nutrizionale che ecologico perché impattano molto meno rispetto ad altri cibi che arrivano da lontano e che impiegano più tempo ed energia per arrivare sulle nostre tavole. Consumare prodotti locali ricchi di sostanze nutraceutiche rappresenta una via per mangiare più sano e per rispettare l'ambiente. Questo lavoro ha lo scopo di analizzare le proprietà nutraceutiche di sei varietà di cipolla custodite e classificate nella Banca Regionale del Germoplasma e di una varietà commerciale. I profili nutraceutici sono stati caratterizzati mediante tecniche analitiche tra le quali la determinazione del potere antiossidante, il contenuto di polifenoli, flavonoidi e antocianine. Gli antiossidanti hanno suscitato negli ultimi anni un grande interesse da parte dei ricercatori in quanto capaci di neutralizzare l'azione dei radicali liberi che risultano coinvolti nell'insorgenza di malattie neuro-degenerative come Parkinson e Alzheimer nonché di malattie tumorali e cardiovascolari. Oltre che contrastare i radicali liberi, gli antiossidanti svolgono numerose attività biologiche come la protezione dei capillari sanguigni, l'azione antinfiammatoria, antibatterica, immuno-stimolante, antiallergica, antivirale, estrogenica (*Ames, 1983*). Una dieta sana previene numerose patologie e di conseguenza porta ad una diminuzione dell'uso di farmaci con il risultato di una maggiore salute per l'uomo e per l'ambiente.

MATERIALI E METODI

Reperimento del materiale vegetale

I campioni di cipolla sono stati raccolti durante l'anno 2017 al loro ottimale grado di maturazione da piante presenti nel campo sperimentale della sede CNR Ivalsa di Follonica, riconosciuto come sezione della Banca Regionale del Germoplasma. Una volta raccolte, le cipolle sono state poste in cella frigorifera a -80°C in modo da arrestare i normali processi interni. Per poter ottenere un concreto raffronto del dato, in questa fase è stata reperita anche una cultivar di cipolla commerciale recuperata dalla grande distribuzione. L'inserimento nello studio del controllo commerciale è utile per conoscere in linea generale la quantità di molecole in analisi presenti nei prodotti della grande distribuzione. Pertanto, la cipolla commerciale è stata utilizzata come metro di paragone nelle analisi. Non è possibile tuttavia considerarla come dato assoluto poiché non rappresenta un dato statisticamente significativo e la varietà di appartenenza è sconosciuta.

Estrazione di molecole nutraceutiche: antiossidanti, polifenoli, flavonoidi

L'estrazione delle molecole da analizzare è stata effettuata utilizzando il bulbo congelato. Il bulbo è stato sminuzzato finemente e successivamente sono stati pesati 3 g di polpa di cipolla. A ciascun campione sono stati aggiunti 9 mL di acetone al 70%. La soluzione è stata successivamente agitata tramite vortex, frammentata attraverso omogeneizzatore Turrax per 5 minuti e posta nel sonicatore a bagno per 20 minuti in modo da garantire la totale rottura delle componenti cellulari. Il campione è stato poi nuovamente omogeneizzato per 1 minuto e posto in centrifuga per 5 minuti a 4000 rpm allo scopo di separare i composti fenolici in sospensione dal particolato. Infine, il surnatante ottenuto è stato filtrato con filtro a cellulosa Sartorius da 0,22 µm per eliminare il materiale non oggetto di analisi *(Abozed et al., 2014).*

Metodo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) per la determinazione degli antiossidanti

Il saggio FRAP è stato ideato da Benzie e Strain nel 1996 al fine di determinare la capacità antiossidante del plasma e successivamente adattato ad analisi di campioni alimentari e botanici. Il saggio colorimetrico FRAP misura la capacità riducente degli antiossidanti nei confronti degli ioni ferro. Si tratta di un metodo basato sul trasferimento di elettroni, in cui gli ioni ferro passano da Fe^{3+} a Fe^{2+}. In determinate condizioni di pH (3,6) e in presenza di TPTZ (2,4,6-Tripyridyl-*S*-triazine), tali ioni formano dei complessi con caratteristiche diverse, in particolare il derivato ridotto (Fe^{2+}-TPTZ) assume una colorazione blu che presenta un assorbimento massimo a 593 nm, misurabile per via spettrofotometrica *(Benzie et al., 1996*) (Figura 9).

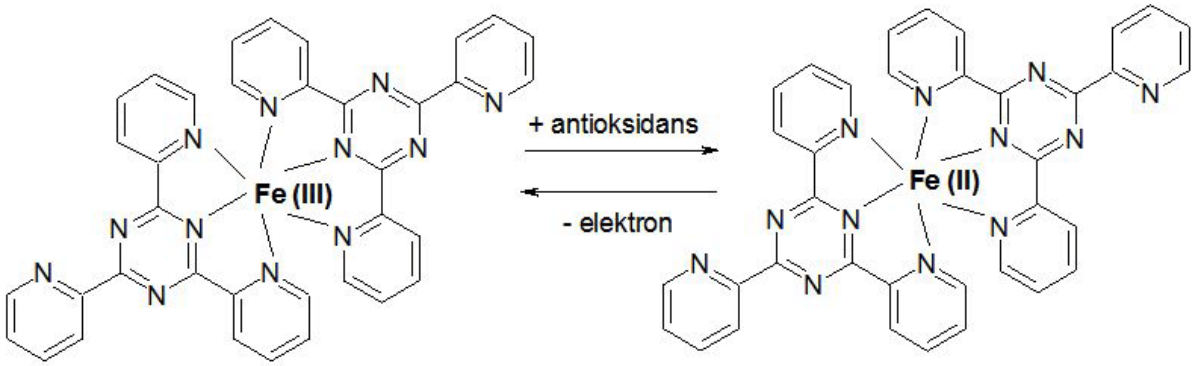


Figura 9 Reazione di riduzione del Fe^{3+} di TPTZ (2, 4, 6-tripiridil-s-triazina), formando un complesso bluastro con Fe^{2+}.

Il FRAP è un metodo volto a valutare il mantenimento dello stato redox delle cellule ed è quindi possibile definire, in modo arbitrario, l'unità FRAP come numero di moli di Fe^{3+} ridotte a Fe^{2+} da una mole di antiossidante testato.

Descrizione della procedura sperimentale

Per la determinazione della quantità di antiossidanti sono state preparate 4 provette, 3 con il campione e 1 per il controllo negativo. L'analisi è stata fatta in triplicato per ogni campione per ottenere una maggiore significatività del dato finale. In ciascuna provetta è stato inserito: 2040 µL di tampone acetato pH 3,6, 200 µL di TPTZ (2,4,6-Tripyridyl-*S*-triazine), 200 µL di cloruro ferrico, 20 µL di estratto di cipolla. I campioni sono stati messi in stufa per 1 ora a 37°C (Figura 10). I dati di assorbanza ottenuti, rapportati ad una retta di calibrazione precedentemente realizzata utilizzando soluzioni a titolo noto di solfato ferroso ($FeSO_4$), hanno permesso di determinare i mg di antiossidanti totali in 100 g di campione. Dei tre valori ottenuti è stata calcolata media e deviazione standard espresse in mmol/100 g di campione.

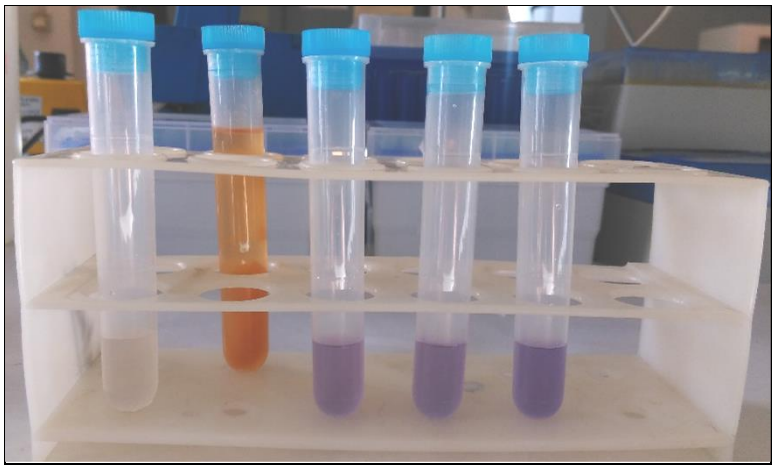


Figura 10 Campioni del test FRAP

Metodo di Folin-Ciocalteu per la determinazione dei polifenoli

La determinazione dei polifenoli totali è stata fatta usando il metodo colorimetrico di Folin-Ciocalteau. Questo saggio fu inizialmente proposto da Folin e Denis nel 1912 e successivamente modificato da Folin e Ciocalteu nel 1927 (*Ainsworth et al., 2007*), ed oggi rappresenta la metodologia adottata nei protocolli ufficiali per l'analisi quantitativa dei polifenoli. Questo metodo si basa sull'ossidazione chimica dei composti fenolici da parte di una miscela ossidante, chiamata reattivo di

Folin-Ciocalteu (FC), costituita da acido fosfotungstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) e fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$). La soluzione ridotta è una miscela di ossidi di colore azzurro la cui intensità risulta essere linearmente proporzionale al numero di residui fenolici presenti sulla molecola antiossidante (Figura 11).

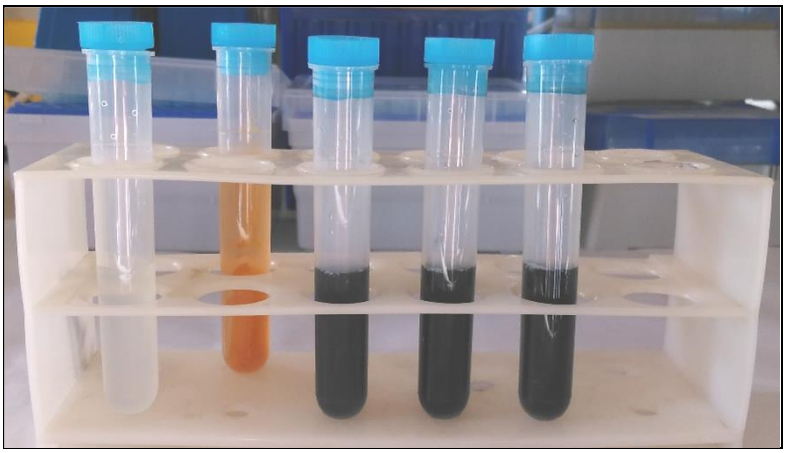


Figura 11 Campioni del test Folin Ciacalteu

Con questo saggio è quindi possibile determinare i residui fenolici tramite spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 765 nm. La reazione di ossidazione del substrato fenolico deve essere condotta in ambiente alcalino ad un pH intorno a 10, per accelerare la cinetica della reazione stessa.

Descrizione della procedura sperimentale

L'esperimento prevede la preparazione di quattro provette, una per il controllo negativo costituito da acqua e tre per il campione. L'esperimento viene ripetuto tre volte per ciascun campione in modo tale da ottenere una maggiore significatività del dato finale. In ciascuna provetta sono stati inseriti: 500 µL di campione, 3000 µL di acqua, 250 µL di reattivo di Folin, 750 µL di soluzione contenente sodio carbonato ($NaCO_3$), 950 µL di acqua distillata. I campioni sono stati inseriti in stufa per 30 minuti a 37°C. Trascorso il tempo di incubazione è stato letto il valore dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 765 nm tramite lo spettrofotometro. I dati di assorbanza ottenuti, rapportati ad una retta di calibrazione precedentemente preparata con soluzione standard di acido gallico ($C_6H_2(OH)_3COOH$), hanno permesso di determinare i mg di polifenoli totali in 100 g di campione. Dei tre valori ottenuti sono stati calcolati media e deviazione standard espresse in mg/100 g.

Metodo dell'alluminio cloruro per la determinazione dei flavonoidi

Il metodo dell'alluminio cloruro permette la determinazione dei soli flavonoidi dividendo il loro contributo da quello dei polifenoli totali (*Smirnova et al., 1998*). Il principio su cui si basa tale test è la capacità del cloruro di alluminio di generare complessi con i gruppi chimici dei flavonoidi. La formazione di questi complessi in ambiente acido è accompagnata da uno spostamento della banda

di assorbimento nello spettro UV che si manifesta nel viraggio della soluzione verso il giallo. Il metodo permette la determinazione del contenuto dei flavonoidi tramite la lettura dello spettrofotometro a 415 nm.

Descrizione della procedura sperimentale

L'esperimento prevede l'utilizzo di quattro provette, una per il controllo negativo costituito da acqua e tre per il campione. La preparazione del campione è ripetuta tre volte per avere una maggiore significatività del dato finale. Sono stati utilizzati 500 µL di estratto a cui viene aggiunto: 1,5 mL di etanolo al 95%, 100 µL di soluzione di cloruro di alluminio ($AlCl_3$), 100 µL di 1 M acetato di potassio (CH_3CO_2K), 2800 µL di acqua. La soluzione ottenuta è stata lasciata 30 minuti a temperatura ambiente (Figura 12). Trascorso il tempo di incubazione è stata letta l'assorbanza del campione a 415 nm tramite lo spettrofotometro. I dati di assorbanza ottenuti, rapportati ad una retta di calibrazione precedentemente realizzata con una soluzione standard di quercetina, hanno permesso di determinare i mg di flavonoidi totali in 100 g di campione. Dei tre valori ottenuti è stata calcolata media e deviazione standard ed espresse in mg/100g.

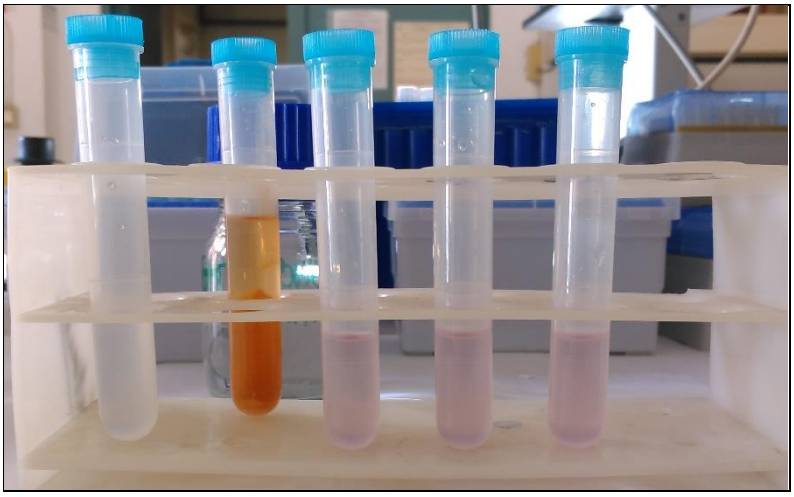


Figura 12 Campioni del test di alluminio cloruro

Estrazione delle antocianine

I campioni da analizzare sono stati sminuzzati e, successivamente, sono stati pesati 3 g per ciascuna varietà di cipolla. A ciascun sono stati aggiunti 9 mL di una soluzione contenente 85% etanolo più 15% HCl 0,1%. La soluzione è stata successivamente agitata tramite vortex, frammentata attraverso omogeneizzatore Turrax per 5 minuti e posta nel sonicatore a bagno per 20 minuti in modo da garantire la totale rottura delle componenti cellulari. Il campione è stato quindi nuovamente omogeneizzato e posto in centrifuga per 5 minuti a 4000 r.c.f. al fine di separare i composti fenolici

in sospensione dal particolato. Il surnatante ottenuto è stato filtrato con filtro a cellulosa Sartorious 0,22 micron per eliminare tutto il materiale non utile ai fini dello studio. Le estrazioni sono state fatte in triplicato per ogni campione (*Hosu et al., 2014*).

Metodo del pH differenziale per la determinazione delle antocianine

Il metodo del pH differenziale sfrutta la capacità delle antocianine di modificare in modo reversibile la propria struttura in seguito alla variazione del pH. Una diversa struttura della molecola comporta una variazione dello spettro di assorbimento permettendo così la misurazione delle antocianine totali in modo rapido e preciso anche in presenza di composti interferenti *(Giusti et al., 2001).*

Descrizione della procedura sperimentale

Per la determinazione delle antocianine sono stati posti in due provette 3 mL di estratto per ciascun campione. A ciascuna provetta sono stati aggiunti 5 mL di due differenti tamponi a pH diverso: nella prima potassio cloruro 0,025 M a pH 1 e nella seconda sodio acetato 0.4 M a pH 4,5 entrambi corretti con acido cloridrico (Figura 13). Dopo 30 minuti di incubazione a temperatura ambiente, le soluzioni ottenute sono state lette allo spettrofotometro con lunghezze d'onda di 510 nm e 700 nm rispettivamente *(Tonutare et al., 2014*).

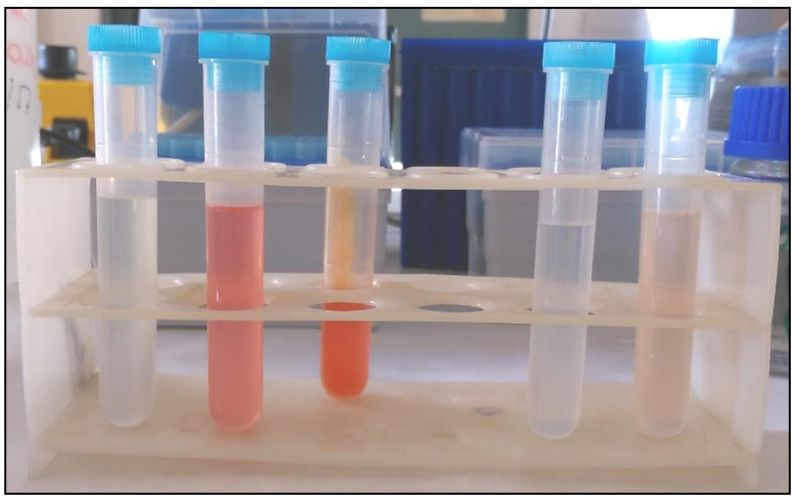


Figura 13 Campione del test del pH differenziale

Analisi cromatografica mediante HPLC

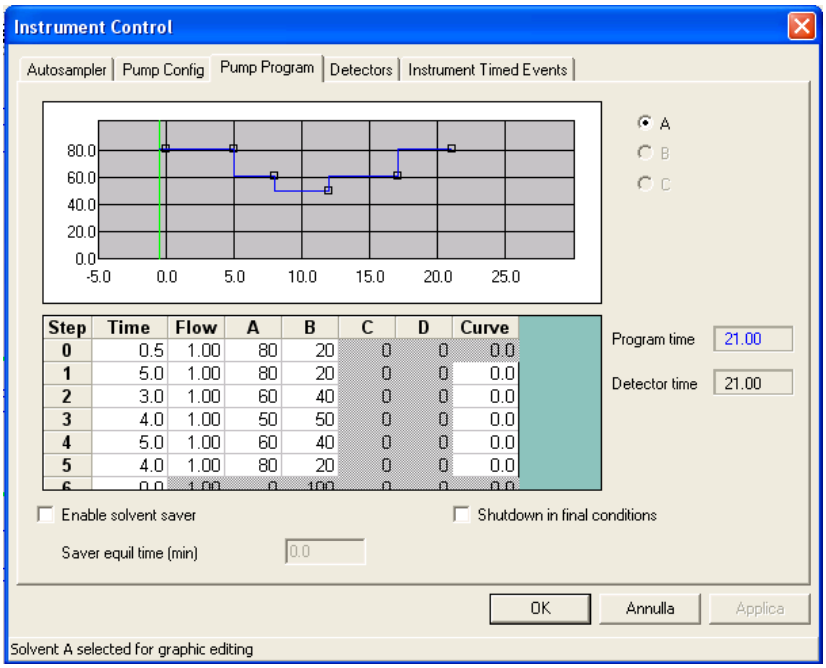
La tecnica cromatografica è una tecnica quali-quantitativa che consiste nello sfruttare in modo particolarmente efficiente la diversa attitudine che ogni molecola o ione possiede nel distribuirsi tra due differenti fasi, una stazionaria e una mobile, presenti nella colonna cromatografica. La diversa struttura chimica delle molecole comporta una diversa affinità per la fase stazionaria presente nella colonna. E' pertanto necessario definire il tempo di ritenzione che è il tempo che occorre alla molecola per percorrere l'intera fase stazionaria. Maggiore è l'affinità per la fase stazionaria e maggiore sarà il tempo di ritenzione e viceversa. In questo lavoro la separazione cromatografica di flavonoidi ed antocianine è stata effettuata mediante un sistema HPLC Perkin Elmer Nelson 3200 Series con campionatore automatico abbinato ad una colonna C18. Le molecole sono state rilevate mediante monitor UV.

Estrazione delle molecole a funzione nutraceutica

L'estrazione delle molecole da analizzare è stata effettuata da bulbo congelato. I campioni sono stati prima sminuzzati e successivamente sono stati pesati 3 g di ciascuna cipolla. Ad ogni campione sono stati aggiunti 9 mL di metanolo e HCl 0,1%. La soluzione è stata successivamente agitata tramite vortex, frammentata attraverso omogeneizzatore Miccra rt per un minuto circa e posta nel sonicatore a bagno per 20 minuti per garantire la completa rottura delle componenti cellulari. Il campione è stato quindi nuovamente omogenizzato e posto in centrifuga per 5 minuti a 4000 rcf allo scopo di separare i composti fenolici in sospensione dal particolato. Il surnatante ottenuto è stato filtrato con un filtro a cellulosa Sartorious da 0,45 µm per eliminare tutto il materiale non oggetto dell'analisi *(Abozed, et al., 2014)*. Gli standard utilizzati sono: petunidina, peonidina, quercetina, campferolo, miricetina.

Condizioni della corsa cromatografica

I metodi che sono stati utilizzati per queste analisi cromatografiche derivano da materiale bibliografico successivamente ottimizzati per il presente lavoro. I metodi utilizzati per la determinazione di polifenoli e antocianine sono stati successivamente inseriti all'interno del software (Turbocrom) dello strumento (Figura 14). La colonna cromatografica è stata mantenuta ad una temperatura di 30°C per tutta la durata dell'analisi. Il flusso, la lunghezza d'onda e le soluzioni della fase mobile variano in base all'analisi eseguita. Di seguito vengono riportate le specifiche delle analisi.



Step	Time	Flow	A	B	C	D	Curve
0	0.5	1.00	80	20	0	0	0.0
1	5.0	1.00	80	20	0	0	0.0
2	3.0	1.00	60	40	0	0	0.0
3	4.0	1.00	50	50	0	0	0.0
4	5.0	1.00	60	40	0	0	0.0
5	4.0	1.00	80	20	0	0	0.0

Figura 14 Condizione di corsa cromatografica nel software Turbocrom

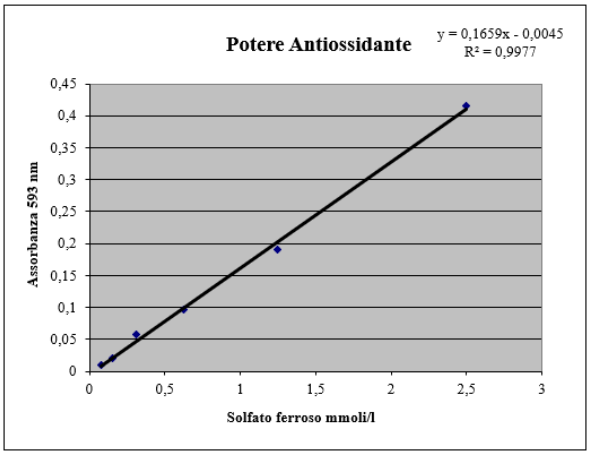
- Determinazione dei polifenoli: flusso 1 ml/min, lunghezza d'onda 280 nm, canale A con acqua MilliQ e canale B con una soluzione di acetonitrile allo 0,02% ed acido trifluoroacetico per un tempo di corsa di 21 minuti (*Kumar et al., 2008*)
- Determinazione delle antocianine: flusso 1 ml/min, lunghezza d'onda 530, canale A con soluzione con 90% acqua e 10% acido formico, canale B con soluzione di 45% acqua, 22,5% acetonitrile, 10% acido formico, 22,5% metanolo per un tempo di corsa di 65 minuti (*Nyman et al., 2001*)

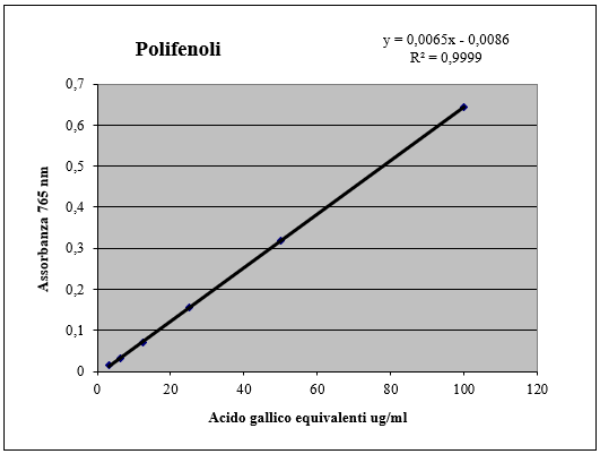
La rilevazione e quantizzazione delle diverse molecole è stata effettuata attraverso i metodi citati in precedenza con standard delle stesse molecole, acquistata dalla ditta Sigma Aldrich, a concentrazioni crescenti.

Elaborazione dei dati

Utilizzando le rispettive rette di calibrazione è stata fatta l'elaborazione dei dati ottenuti dalle analisi colorimetriche (Figure: 15; 16; 17). Le rette sono state costruite precedentemente tramite soluzioni a titolo noto di standard universalmente accettati quali il solfato ferroso per il potere antiossidante, l'acido gallico per i polifenoli e la quercetina per i flavonoidi. I valori ottenuti sono stati relazionati

all'assorbanza ed inseriti all'interno del programma Microsoft Excel che costruisce una retta di calibrazione secondo il metodo dei minimi quadrati.





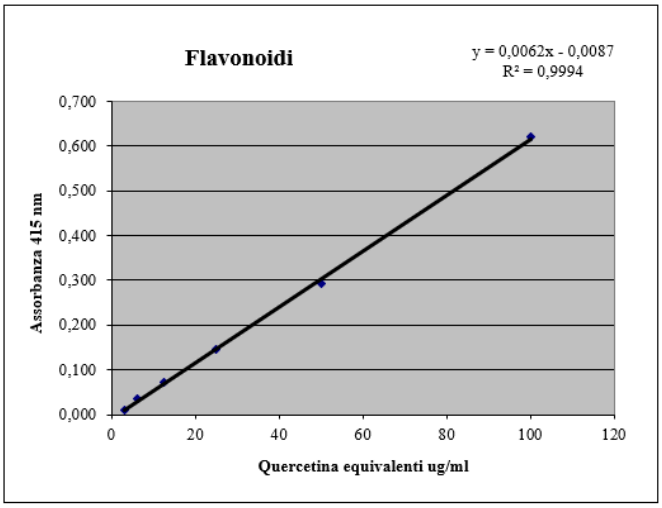


Figure 15;16;17 Rette di calibrazione per valutare il contenuto di antiossidanti, polifenoli e flavonoidi totali

Il contenuto di antocianine è stato, invece, calcolato come cianidina-3-O-glucoside (PM= 449,2 e ε = 26900) e il risultato espresso come mg/100g. L'assorbanza (A) del campione è stata calcolata tramite le seguenti equazioni:

$$A = (A_{520} - A_{700})_{pH1.0} - (A_{520} - A_{700})_{pH4.5}$$

Equazione 3 Calcolo dell'assorbanza

$$TA\left(\frac{mg}{g_{ex}}\right) = \left[TA\left(\frac{mg}{l}\right)/100\right]/m_{ex}(g)$$

Equazione 4 Antocianine totali

Per quanto riguarda la rilevazione e quantizzazione di acidi organici, polifenoli, antocianine e zuccheri si è proceduto ad un confronto tra i cromatogrammi ottenuti dalle analisi di campioni di ciliegia con quelli realizzati utilizzando le soluzioni standard potendo così determinare il valore di concentrazione delle singole molecole.

RISULTATI

Capacità antiossidante

La cipolla rappresenta una fonte eccellente per una vasta gamma di composti antiossidanti che hanno la capacità di interferire con il ciclo ossidativo inibendo o ritardando il danno a carico di biomolecole; essi hanno la funzione di combattere lo stress ossidativo attraverso una serie di sistemi, enzimatici e non enzimatici che limitano il potenziale danno causato dalle ROS *(Antolovich et al., 2002*). Tramite il metodo FRAP è stato possibile determinare la capacità antiossidante totale potendo così definire un potenziale effetto positivo del bulbo della cipolla sulla salute umana. Nella Figura 18 sono riportate le concentrazioni di antiossidanti (espresse in mmol/100 g di campione) per le cipolle oggetto dello studio. Dal grafico emerge che la capacità antiossidante del prodotto commerciale rappresentata da un contenuto di antiossidanti totali di 0,91 ± 0,02 mmol/100 g risulta inferiore rispetto alle cipolle autoctone analizzate in questo studio. In particolare, spicca l'elevato contenuto di antiossidanti nella varietà Massese con un valore di 3,08 ± 0,14 mmol/100 g. Il contenuto di antiossidanti nelle altre varietà coltivate localmente, invece, presenta valori compresi tra 1,87 ± 0,10 mmol/100 g della cipolla rossa della Maremma, 1,23 ± 0,12 mmol/100 g della varietà di cipolla rossa di Lucca, 1,18 ± 0,08 per quella di Treschietto, 1,15 ± 0,11 per la cipolla rossa della Valtiberina. La varietà di cipolla rossa Fiorentina risulta essere quella con minor contenuto di antiossidanti tra le varietà autoctone con un valore vicino a quella commerciale di 0,97 ± 0,09 mmol/100 g.

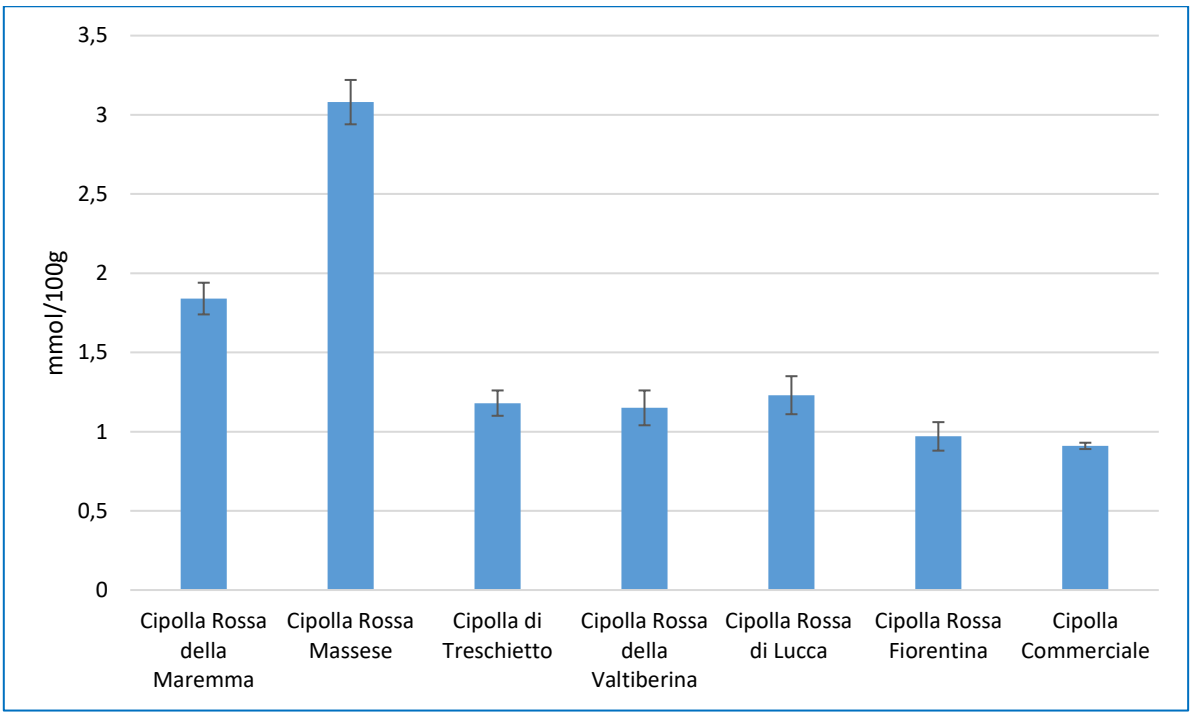


Figura 18 Valori ottenuti dal saggio FRAP, grazie al quale viene evidenziato il potere antiossidante

Contenuto di polifenoli totali

Nel mondo vegetale i polifenoli sono composti ubiquitari, fondamentali nella fisiologia della pianta. Essi contribuiscono alla resistenza nei confronti di microrganismi e insetti, ed inoltre sono responsabili della pigmentazione e delle caratteristiche organolettiche delle piante (*Carratu et al., 2005*). Il termine polifenoli include diverse classi di composti con una struttura chimica comune, sono tutti derivati del benzene con uno o più gruppi idrossilici associati all'anello aromatico (*Scalbert et al., 2000*). I composti fenolici presentano azione antiossidante, sono cioè in grado di eliminare i radicali liberi con conseguente riduzione di insorgenza di malattie cardiovascolari, malattie neuro-degenerative e tumori (*Ferrazzano et al., 2009*). Con il saggio colorimetrico di Folin-Ciocalteau è stato determinato il contenuto di polifenoli totali nelle varietà di cipolle toscane ed in una varietà di cipolla commerciale (Figura 19). Dal grafico si osserva che la cipolla commerciale presenta valori piuttosto bassi rispetto ai prodotti locali aggirandosi attorno al 55,98 ± 0,87 mg/100 g. Nelle cipolle delle varietà autoctone ritroviamo valori superiori ed anche in questa analisi la cipolla rossa Massese risulta essere la più ricca di polifenoli con un valore di 302,83 ± 3,9 mg/100 g, a seguire la cipolla di Treschietto con 150 ± 4,9 mg/100 g, la cipolla rossa di Lucca con 117,91 ± 4,2 mg/100 g, la cipolla della Valtiberina 98,58 ± 3,1 mg/100 g, la cipolla rossa Fiorentina con 89,52 ± 2,9 mg/100 g e la cipolla della Maremma con 69,25 ± 2,6 mg/100 g. Da questa analisi emerge che le varietà locali presentano valori di polifenoli totali superiori al controllo commerciale analizzato, giustificando così il loro apporto nella capacità totale della cipolla.

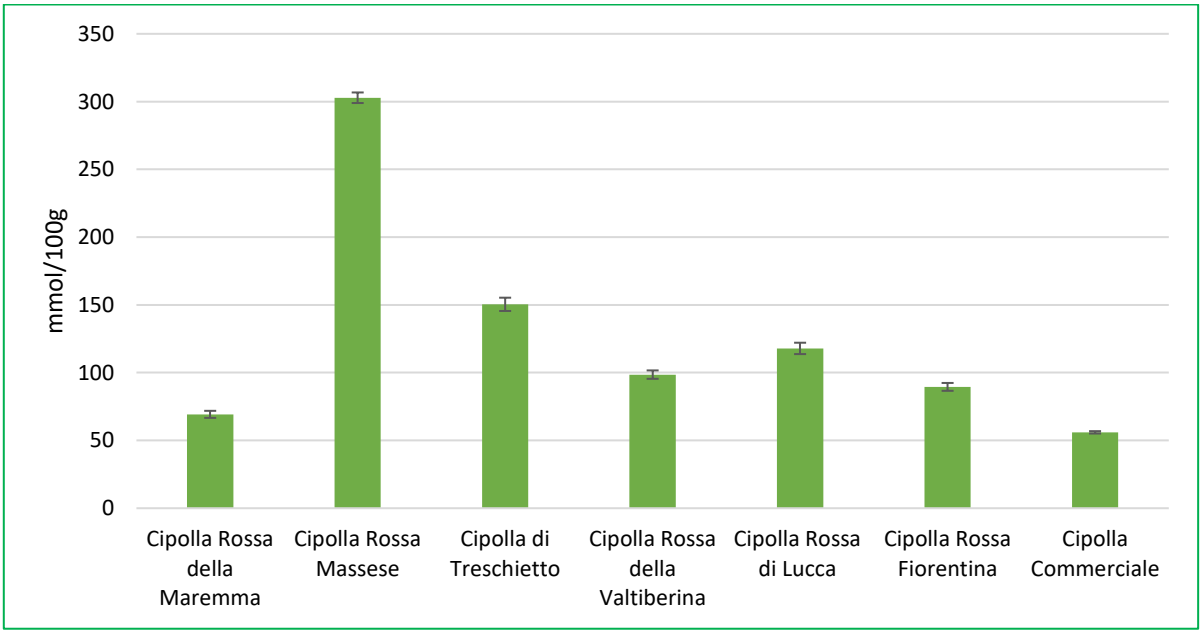


Figura 19 Valori emersi dal saggio Folin-Ciocalteau, grazie al quale viene evidenziata la concentrazione di polifenoli

Contenuto di flavonoidi totali

I flavonoidi rappresentano la sottoclasse più numerosa dei polifenoli che comprende più di 5000 molecole dotate di importante attività antiossidante e sono ampiamente distribuiti nel regno vegetale *(Havsteen et al., 1983*). Nelle piante essi svolgono numerose funzioni; ad esempio, nei fiori hanno il ruolo di renderli attraenti per gli insetti impollinatori mediante la colorazione, mentre nelle foglie hanno il compito di difesa nei confronti di agenti patogeni e radiazioni *(Harborne et al., 2000)*. Inoltre, i flavonoidi sono coinvolti nella regolazione della crescita, nel controllo della respirazione, nella fotosintesi, nella morfogenesi e nella determinazione del sesso (*Harborne et al., 1999; Middleton, 1993*). I flavonoidi sono potenti antiossidanti, contribuiscono alla prevenzione di molte patologie legate all'invecchiamento cellulare e persino alla prevenzione di alcune forme tumorali *(Kanadaswami et al., 2005*); sono inoltre dotati di attività antifungina, antivirale e antibatterica (*Cushnie et al., 2005*).

Con il metodo dell'alluminio cloruro è stato possibile determinare il contenuto totale dei flavonoidi ed effettuare un confronto tra i valori delle varietà locali con quelli di un prodotto commerciale. I risultati riportati nella Figura 20 mostrano come la varietà commerciale di cipolla presenti valori di flavonoidi notevolmente inferiori rispetto a quelli delle varietà autoctone. La varietà commerciale presenta, infatti, un valore di 24,3 ± 0,38 mg/100 g mentre i prodotti locali presentano variazioni da un valore di 80,2 ± 2,9 mg/100 g della varietà di cipolla rossa di Lucca ad un valore minimo di 60,30 ± 2,9 mg/100 g per la varietà di cipolla rossa Fiorentina. Ancora una volta la varietà più ricca di sostanze ad attività antiossidante è la cipolla rossa Massese con un valore molto elevato di flavonoidi, 280,4 ± 3,2 mg/100 g. In bibliografia è riportato che la grande variabilità dei contenuti di flavonoidi è dovuta principalmente a fattori genetici (*Marotti et al., 2002*). Differenze significative nel contenuto di flavonoidi totali sono state riscontrate tra varietà di cipolle rosse e bianche: le cipolle rosse presentano un contenuto di flavonoidi totali considerevolmente più alto rispetto a quelle bianche avendo quindi maggior effetti benefici per la salute umana (*Pèrez-Gragorio et al., 2010*). Alla luce di ciò, la scarsa concentrazione di flavonoidi nella varietà commerciale ne riduce la sua importanza come alimento per la protezione della salute.

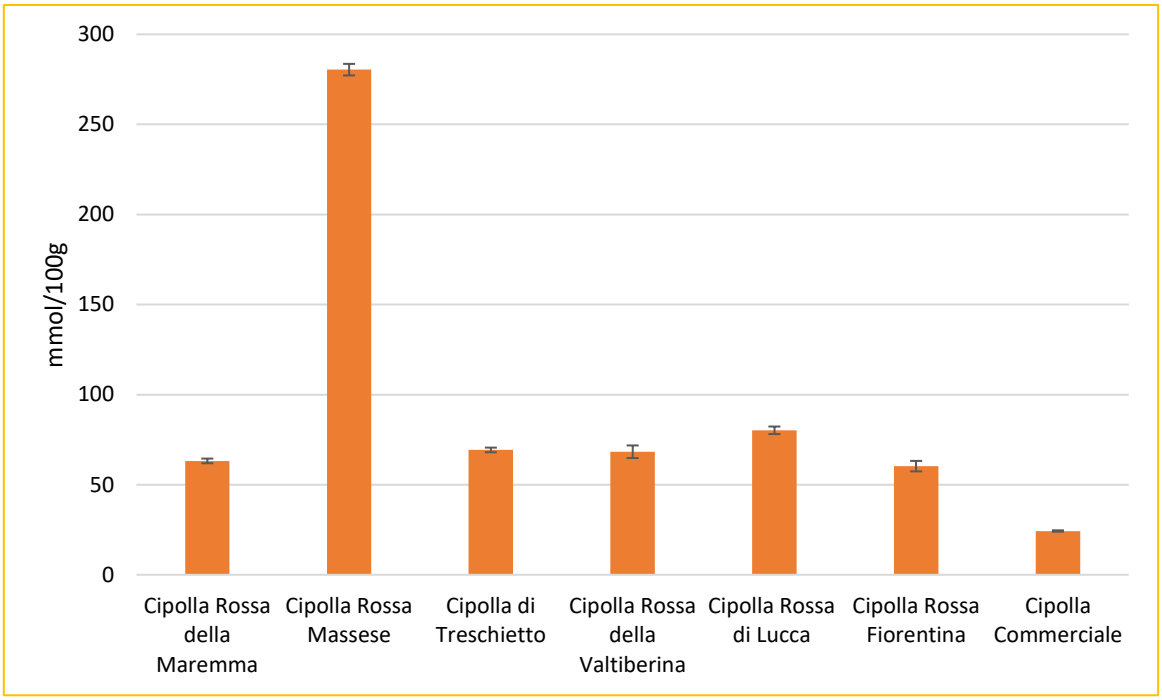


Figura 20 Valori emersi dal saggio dell'alluminio cloruro, grazie al quale viene evidenziata la concentrazione di flavonoidi

Contenuto di antocianine totali

Le antocianine sono composti polifenolici; esse comprendono il più grande gruppo di pigmenti idrosolubili, responsabili dei colori che vanno dal rosa salmone al rosso, dal viola al blu scuro della maggior parte dei fiori, frutti, foglie e steli (*Strack and Wray, 1994*). Queste molecole possono anche avere un ruolo nel meccanismo di resistenza delle piante all'attacco dei parassiti (*Strack and Wray, 1989*). Negli ultimi anni è aumentato l'interesse per le antocianine in virtù delle loro proprietà antiossidanti. In bibliografia è riportato che le antocianine hanno effetti anti-cancerogenici, antinfiammatori, prevengono l'insorgenza di malattie cardiovascolari, sono utili nel controllo di obesità, diabete, ma anche per la vista e per le funzioni cerebrali *(Riaz et al., 2016).*

Attraverso il metodo dei pH differenziali è stato possibile determinare il contenuto di antocianine nelle cipolle oggetto di studio. Nel presente lavoro, le analisi sono state effettuate confrontando il contenuto di antocianine delle varietà locali con quello del prodotto commerciale. Dalla Figura 21 si può osservare che le varietà di cipolla più ricche di antocianine sono nell'ordine la cipolla rossa della Valtiberina con un valore di 55,5 ± 2,8 mg/100 g, la cipolla rossa Fiorentina con 47,3 ± 2,2 mg/100 g e la cipolla rossa Massese con 40,2 ± 2,2 mg/100 g. Questi valori risultano essere superiori alla qualità commerciale che ha un contenuto di 25,5 ± 2,1 mg/100 g ed alla varietà di cipolla rossa di Lucca con 23,3 ± 1,8 mg/100 g. Le varietà di cipolla di Treschietto e della Maremma presentano valori piuttosto bassi, rispettivamente 6,8 ± 0,6 mg/100 g e 7,1 ± 0,8 mg/100 g. Questa

ampia variabilità di dati ottenuti è confermata da studi bibliografici in cui è riportato che la quantità di antocianine e composti fenolici differisce in modo significativo tra diverse varietà di cipolla (*Geetha et al., 2011*). Diversi sono i fattori che possono influenzare il contenuto di antocianine nelle cipolle, in particolare luce e temperatura influiscono in maniera significativa sull'accumulo di queste molecole nei frutti (*Rodrigues et al., 2011*).

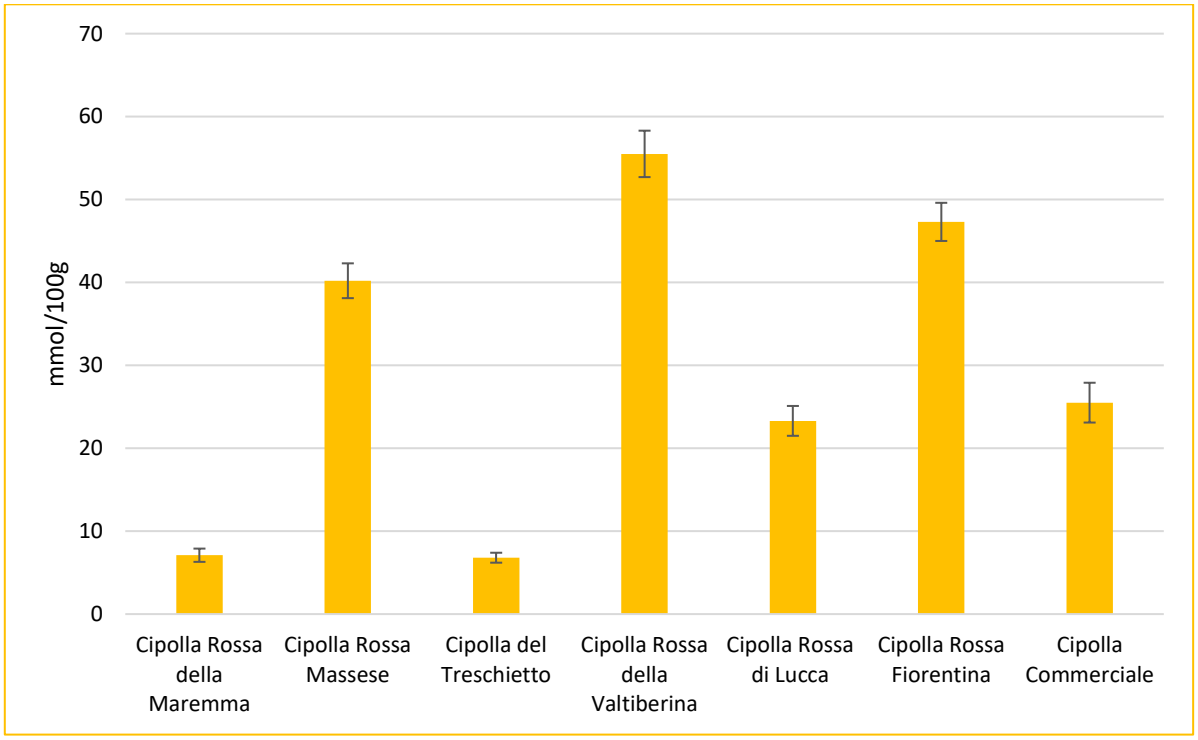


Figura 21 Valori emersi dal saggio del pH differenziale, grazie al quale viene evidenziata la concentrazione di antocianine

Contenuto di quercetina, miricetina e campferolo

Quercetina, miricetina e campferolo sono flavonoidi caratterizzati da un'elevata capacità antiossidante in grado di ridurre l'insorgenza di malattie cronico-degenerative e tumori (*Soobratee et al., 2005*). Nel presente lavoro la determinazione di queste molecole è stata effettuata attraverso cromatografia ad alta prestazione (HPLC), essenziale per la misurazione precisa dei contenuti delle molecole. Nella Figura 22 sono state messe a confronto le concentrazioni di quercetina, miricetina e campferolo nelle cipolle oggetto del presente studio. Dai dati ottenuti è possibile affermare che tutte le varietà locali di cipolla presentano una concentrazione più elevata delle tre molecole oggetto di indagine rispetto al prodotto commerciale. Nella cipolla commerciale è stato riscontrato un contenuto di quercetina pari a 19,86 ± 2,3 µg/g, di miricetina di 19,86 ± 8,1 µg/g e di campferolo 66,68 ± 2,4 µg/g; tutti questi valori sono inferiori rispetto alle varietà autoctone. I bulbi coltivati localmente presentano intervalli di valori più elevati con importanti picchi della varietà Massese con 583,77 ±

3,1 µg/g di quercetina, 593,77 ± 7,6 µg/g di miciritina e 849,14 ± 10,4 µg/g di campferolo. Questi dati confermano i risultati ottenuti con il metodo dell'alluminio cloruro per la determinazione del contenuto dei flavonoidi totali; infatti anche in questo caso le varietà autoctone sono risultate più ricche di flavonoidi rispetto alla varietà commerciale, con la Massese che presenta valori significativamente più alti rispetto alle altre.

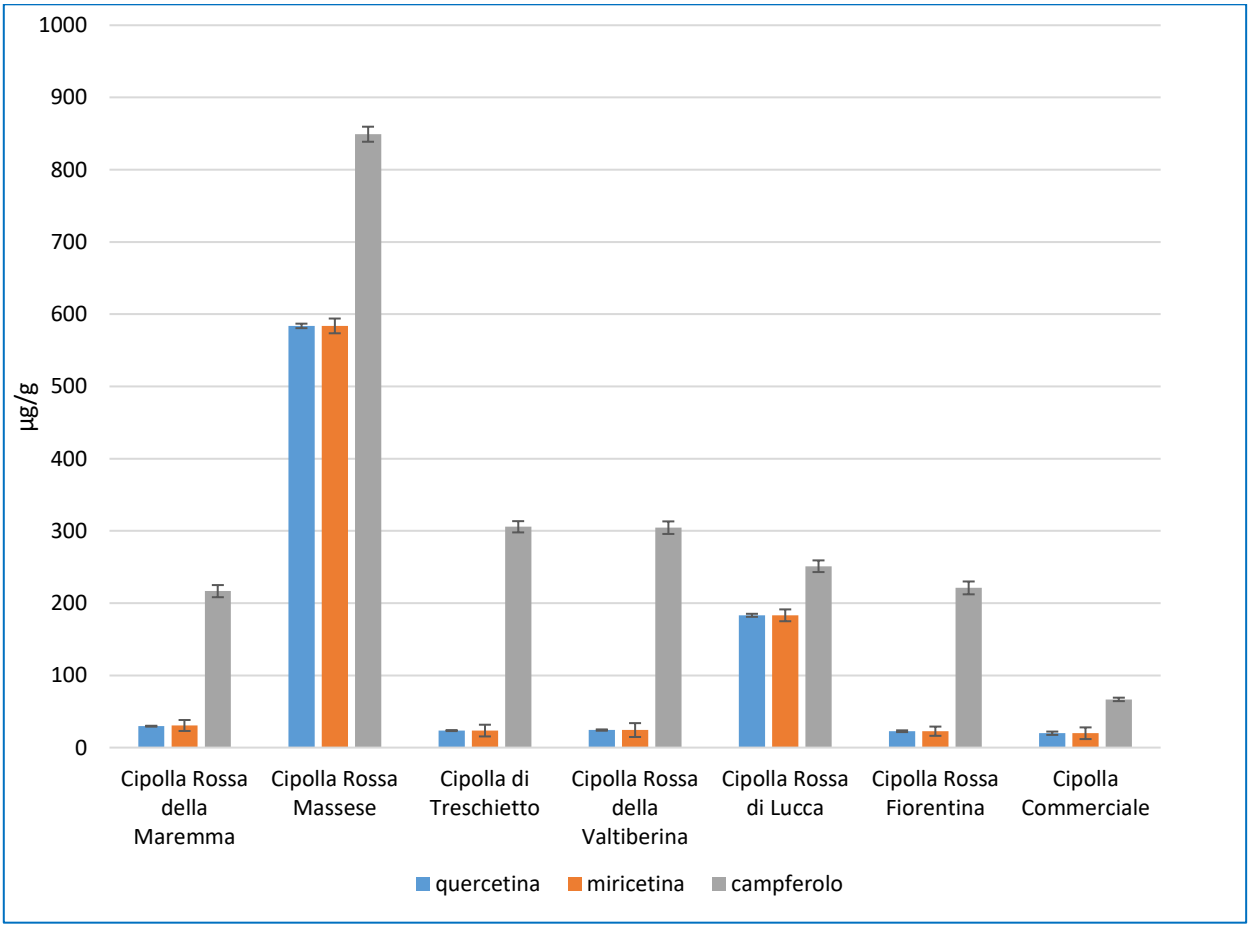


Figura 22 Valori emersi dalle analisi con HPLC in cui vengono evidenziate la concentrazione di quercetina, miricetina e campferolo nelle cipolle oggetto di studio

Contenuto di peonidina e petunidina

La peonidina e la petunidina sono antocianidine, rappresentano la parte agliconica delle antocianine; esse hanno una vasta gamma di funzioni biologiche e benefiche per la salute dell'uomo come quella antiossidante, antinfiammatoria e antitumorale (*Suzuki et al., 2011; Cvorovic et al., 2010*). Nel presente lavoro la determinazione di queste molecole è stata effettuata attraverso cromatografia ad alta prestazione. Nelle sette varietà di cipolla analizzate i contenuti più elevati di antocianidine si sono ottenuti nella cipolla rossa della Valtiberina con 36,47 ± 1,9 µg/g di peonidina e 21,45 ± 1,3 µg/g di petunidina; a seguire la cipolla rossa Fiorentina con 31,18 ± 0,7 µg/g di peonidina e 20,14 ± 2,1 µg/g

di petunidina, la cipolla rossa Massese con 21,64 ± 2,3 µg/g di peonidina e 15,24 ± 1,4 µg/g di petunidina, la cipolla commerciale con 10,96 ± 0,5 µg/g di peonidina e 10,24 ± 2,7 µg/g di petunidina, la cipolla rossa di Lucca con 10,57 ± 1,1 µg/g di peonidina e 7,15 ± 1,9 µg/g di petunidina, la cipolla di Treschietto con 9,57 ± 0,8 µg/g di peonidina e 4,91 ± 1,2 µg/g di petunidina ed infine la cipolla rossa della Maremma con 9,12 ± 0,4 µg/g di peonidina e 5,12 ± 1,3 µg/g di petunidina. (Figura 23). Questi risultati riflettono l'andamento ottenuto con il metodo del pH differenziale per la determinazione delle antocianine totali, ed anche in questa analisi si è osservata un'ampia variabilità di valori per le diverse varietà di cipolla.

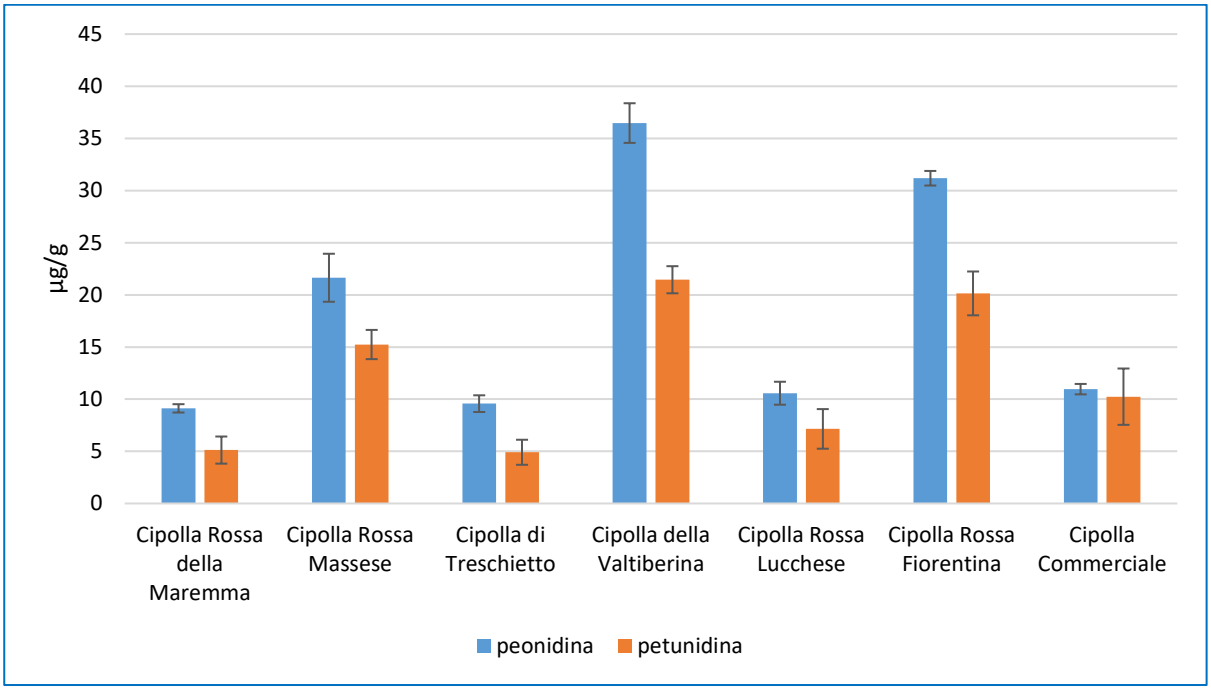


Figura 23 Valori emersi dalle analisi con HPLC in cui vengono evidenziate la concentrazione di peonidina e petunidina nelle cipolle oggetto di studio

Analisi nutraceutiche su prodotti trasformati

Lo scopo di questa fase di lavoro è stato quello di quantificare le molecole salutistiche nei prodotti trasformati derivati da frutti antichi, facenti parte del repertorio regionale toscano. L'osservazione scientifica ha posto l'accento sullo studio di queste molecole anche per verificare il loro comportamento nel materiale alimentare sottoposto alle condizioni di trasformazione. Le analisi sono state condotte su 8 passate di pomodoro monovarietali e confetture derivate da: 3 varietà di mele cotogne, peperone, pomodoro verde, corbezzolo e melograno. I metodi utilizzati hanno evidenziato che esistono differenze nel contenuto di molecole antiossidanti e fenoliche sia nei frutti delle diverse specie che nelle varietà interspecie. Dai risultati riportati nei grafici sottostanti si può affermare che i prodotti trasformati contengono una elevata concentrazione di molecole con capacità nutraceutiche e che quindi i passaggi operati nei vari step di trasformazione da prodotto fresco, non incidono notevolmente nella qualità del prodotto.

Di seguito vengono riportati una parte dei risultati ottenuti dai prodotti trasformati, per i risultati completi si riporta il link al sito: http://www.indaco2.it/basiq/

Risultati salutistici relativi alle passate di pomodoro autoctono monovarietale

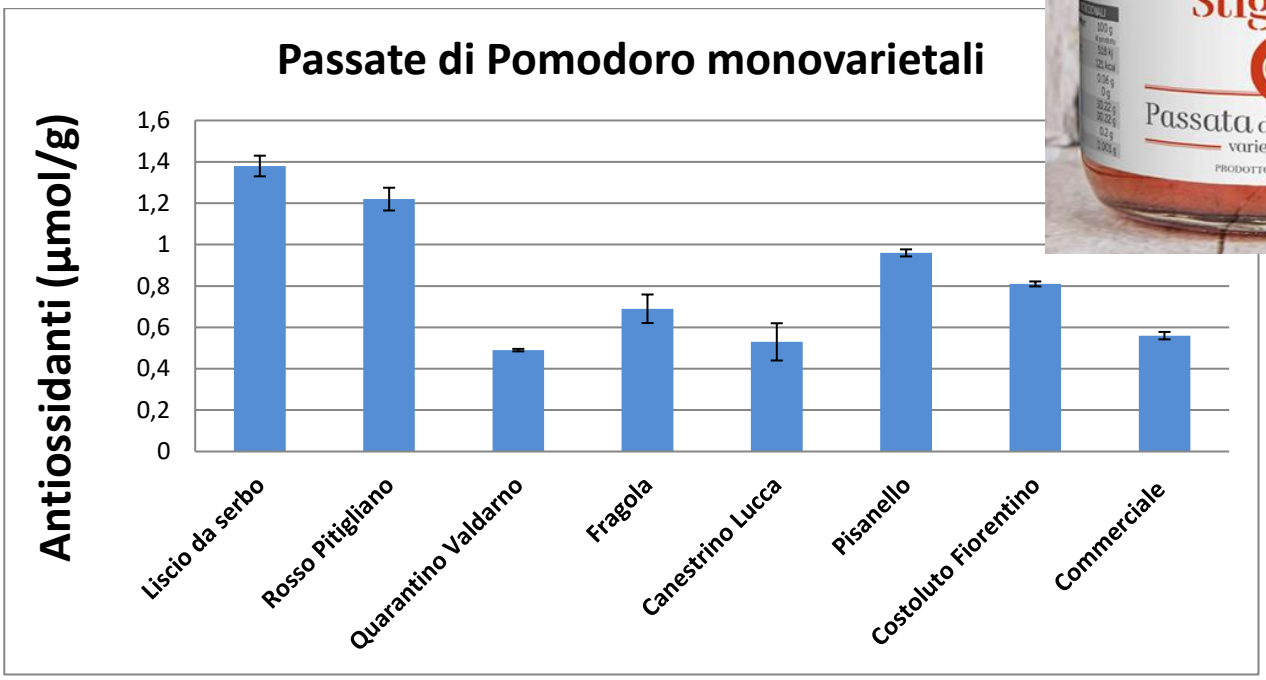


Fig 1: grafico a barre riportante i valori ottenuti dalle analisi quantitative di molecole antiossidanti nei prodotti trasformati di 8 varietà di pomodori

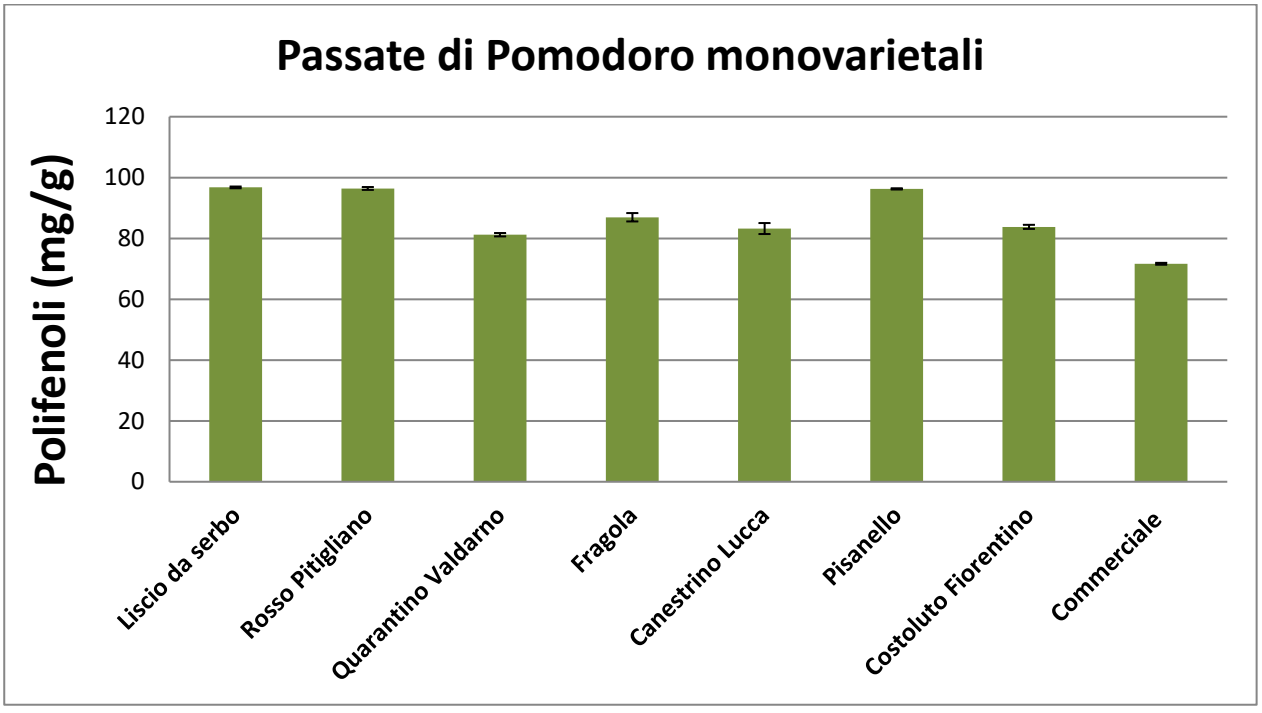


Fig 2: grafico a barre riportante i valori ottenuti dalle analisi quantitative di molecole fenoliche nei prodotti trasformati di 8 varietà di pomodori

Risultati salutistici relativi alle confetture monovarietali di melecotogne

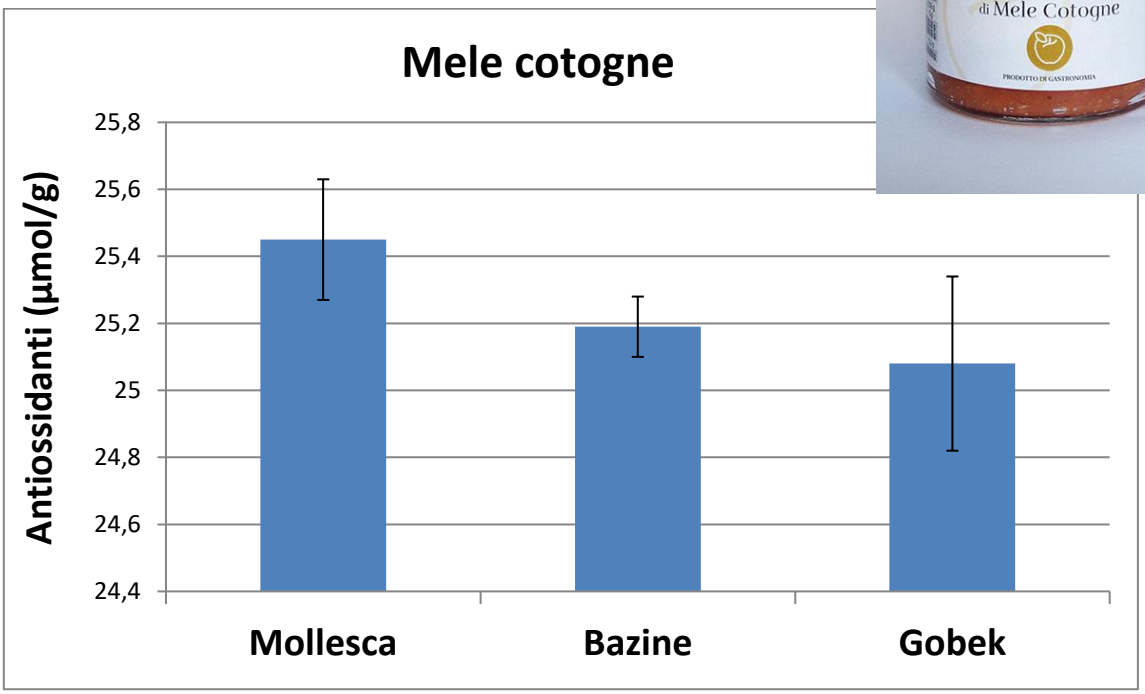


Fig 3 : Grafico riportante i valori di molecole antiossidanti in tre vasetti di confetture di mele cotogne reperite dal repertorio regionale toscano.

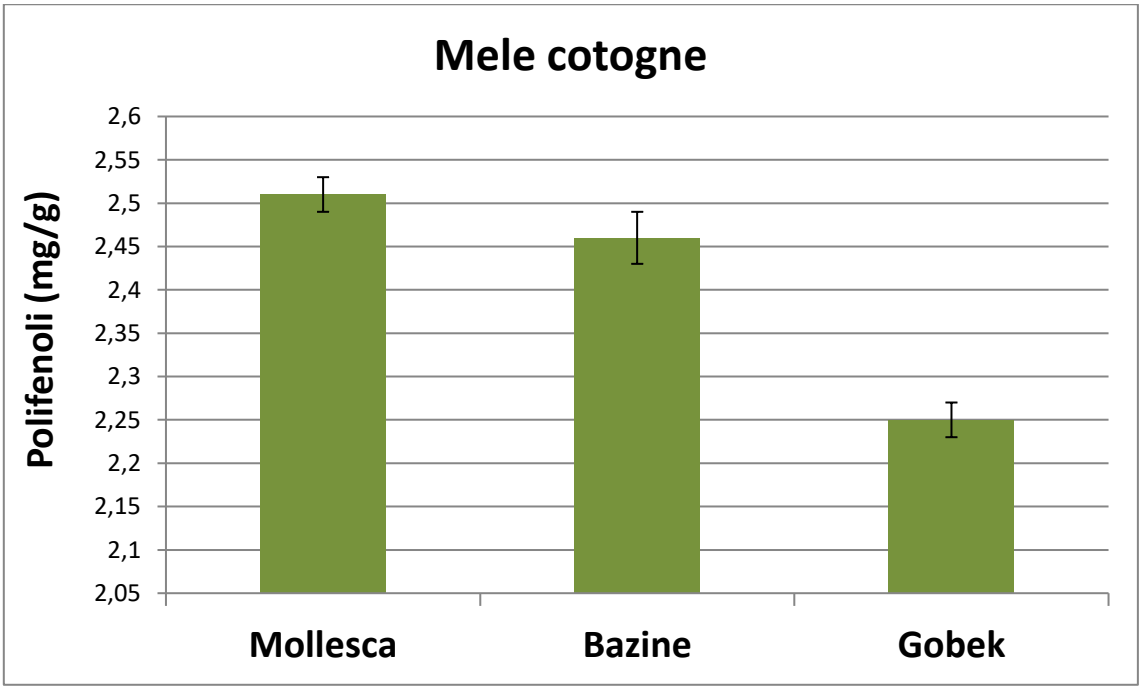


Fig 4: Grafico riportante i valori di molecole fenoliche in tre vasetti di confetture di mele cotogne reperite dal repertorio regionale toscano.

Risultati salutistici relativi alle confetture di peperone e pomodoro verde

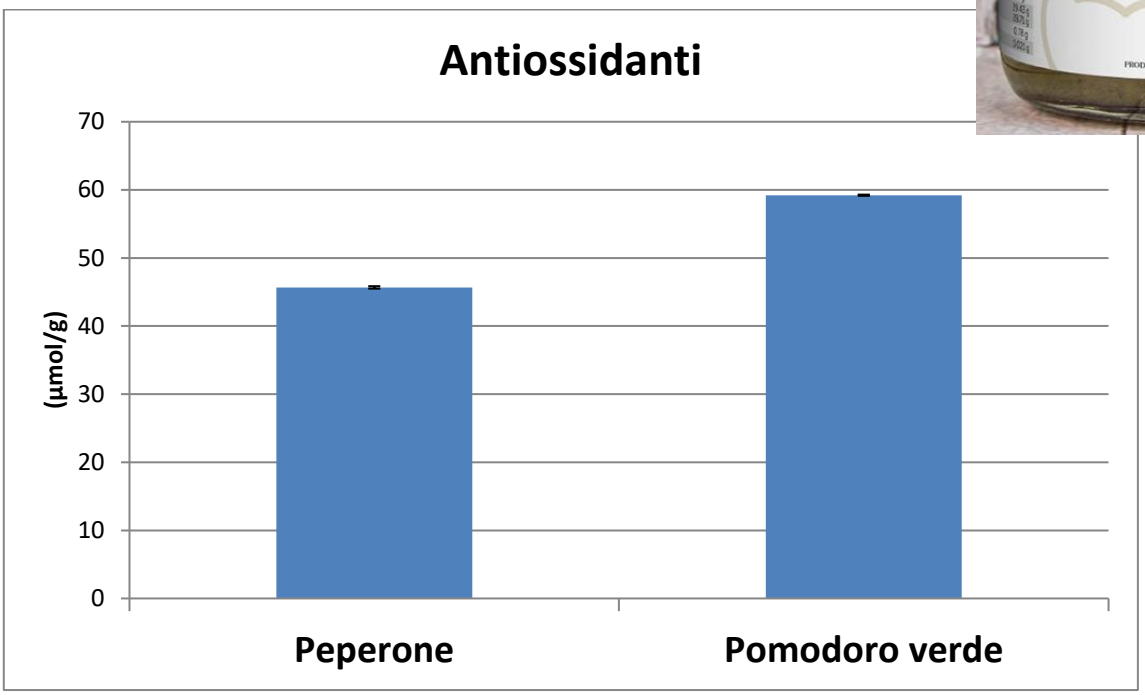


Fig 5: Il grafico riporta i valori di molecole antiossidanti confrontati su prodotti trasformati di Peperone e Pomodoro verde

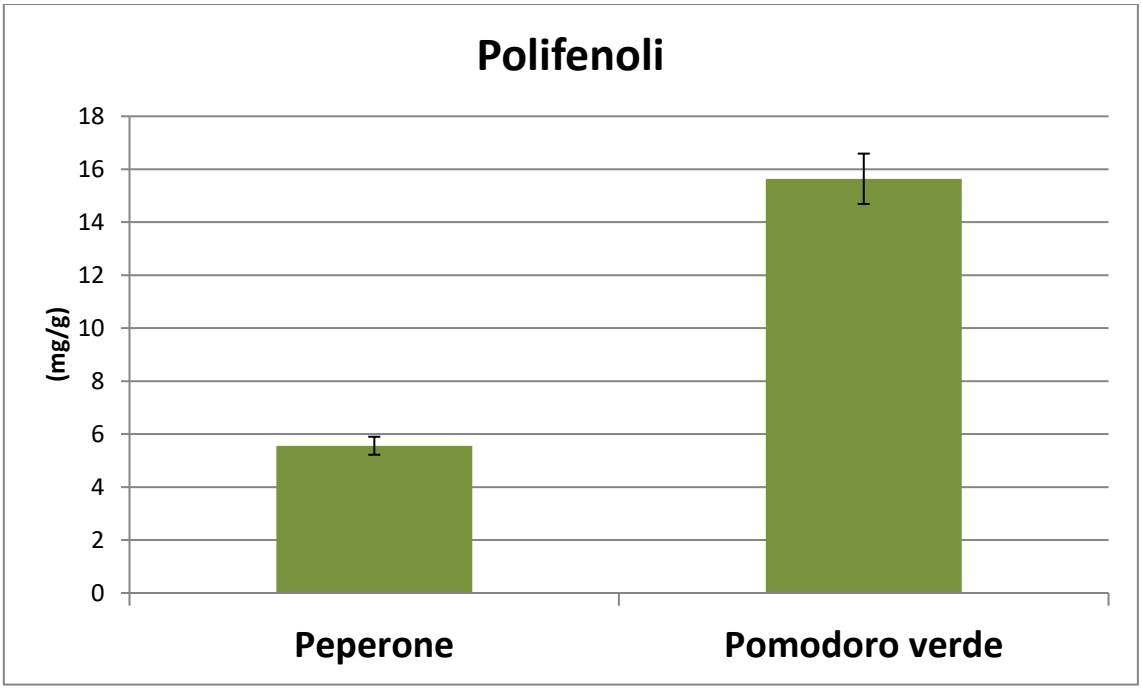


Fig 6: Il grafico il quantitativo di molecole fenoliche derivate dal confronto dei prodotti trasformati di Peperone e Pomodoro verde

Risultati salutistici relativi alla confettura di corbezzolo ed estratto di melagrana

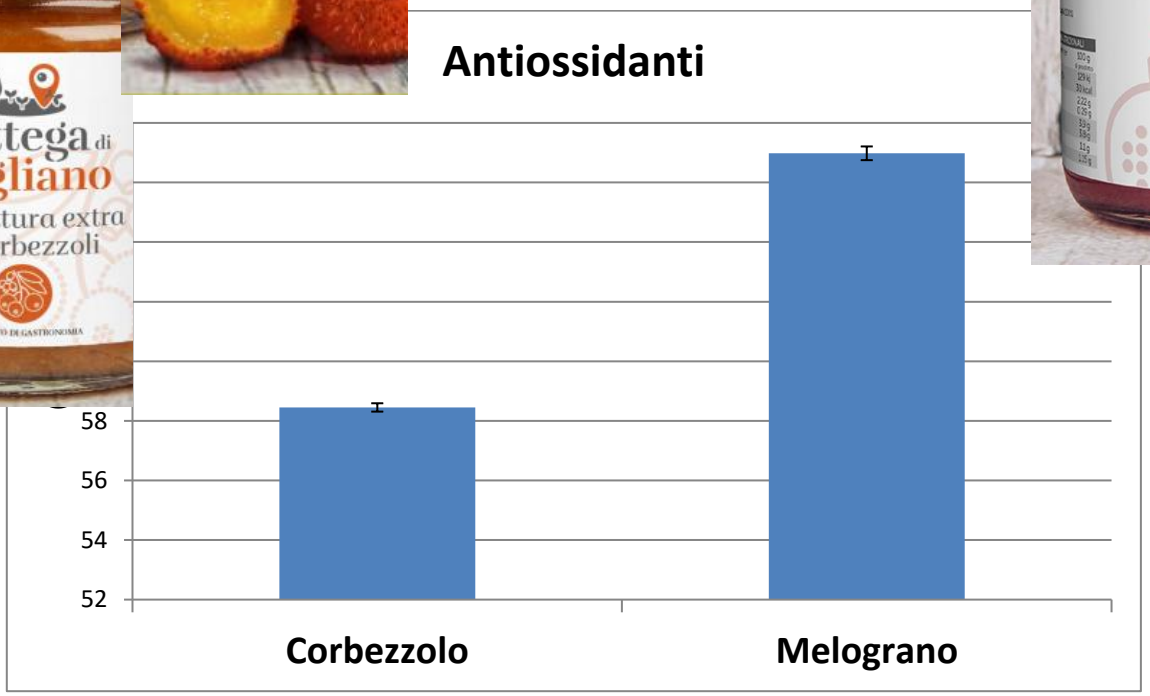


Fig 7: Il grafico riporta i valori di molecole antiossidanti a confronto di prodotti trasformati di Corbezzolo e Melograno

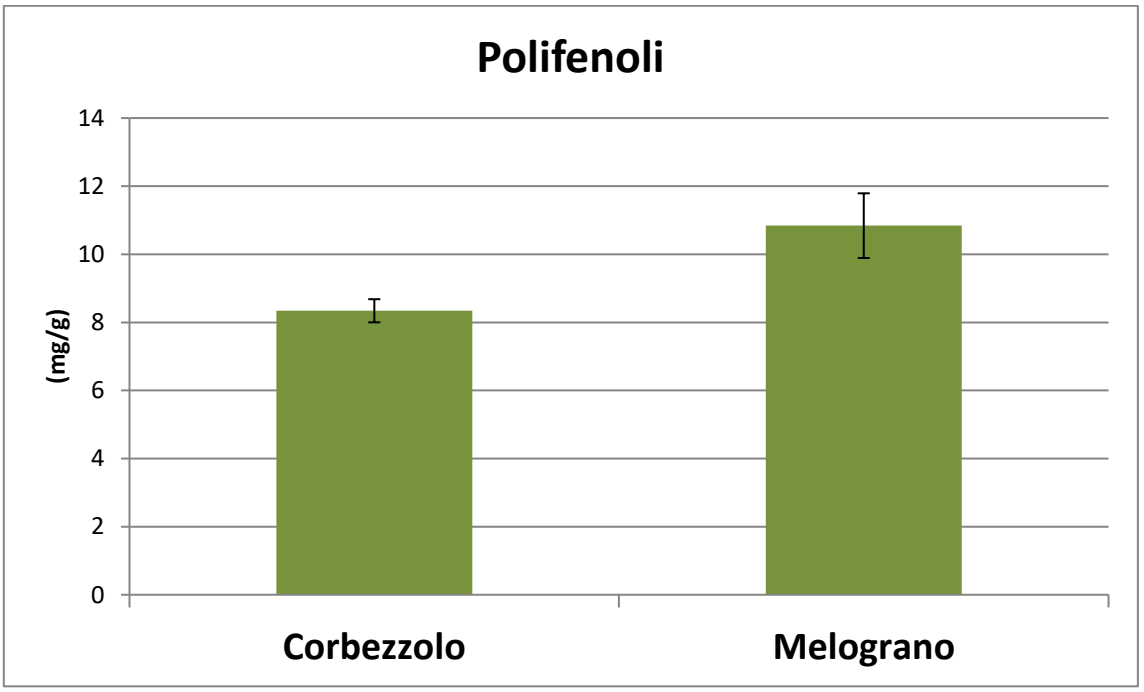


Fig 8: Il grafico mostra la quanttà di molecole fenoliche derivate dal confrontato dei prodotti trasformati di Corbezzolo e Melograno.

Azioni 5.4 e 5.5 che indagano le principali caratteristiche di salubrità su prodotti trasformati

F5.4 Sicurezza alimentare: contaminanti chimici

La qualità di un prodotto destinato all'alimentazione non nasce dal caso, ma è frutto di una serie di valutazioni, scelte, accortezze che fanno la differenza. È qualità anche la salubrità di quanto ingeriamo con la dieta, che dipende, oltre che dai livelli di residui dei prodotti fitosanitari (p.f.) conseguenti ai trattamenti effettuati per difendere le produzioni dalle avversità, anche dalla presenza di microrganismi, di metalli pesanti, di differenti sostanze di origine naturale, quali per esempio le micotossine.

È percezione comune però che specialmente i residui di agrofarmaci rappresentino un indice di cattiva qualità e di rischio per il consumatore, anche se i limiti vengono fissati, dopo attenta valutazione del rischio per il consumatore stesso, con fattori di sicurezza molto conservativi, variabili in funzione delle caratteristiche tossicologiche delle molecole.

Il metodo multiresiduale (metodo UNI EN15662:2009) unità di misura mg/kg è uno screening della maggior parte dei principi attivi immessi nel ciclo dei prodotti ortofrutticoli mediante pesticidi o fertilizzanti.

Il mancato rispetto dei tempi di carenza, previsti per legge, può comportare una più lenta degradazione di alcuni pesticidi e agrofarmaci con conseguente rischio di superamento dei livelli massimi di residuo definiti dalla normativa vigente.

A	**B**
Acefate Acetamiprid Acrinatrina Alaclor Aldicarb Aldicarb sulfone Aldrin Aldrin + Dieldrin (espresso in Dieldrin) Alfametrina Amitraz Anilazina Atrazina Azinfos etile Azinfos metile Azoxistrobina	Benalaxil Bendiocarb Benfuracarb Benzossimato Bifentrin Bitertanolo Boscalid Bromofos Etile Bromofos Metile Bromopropilato Bromuconazolo Bupirimate Buprofezin Butossicarbossima
C	**D**
Cadusafos Captano Carbaril Carbendazim+benomil+tiofanato metile (espresso in carbendazim) Carbofenotion Carbofuran Cianazina Ciazofamid Ciflutrin Cimoxanil Cipermetrina (somma degli isomeri) Ciproconazolo Ciprodinil Ciromazina Clofentezine Clorfenson Clorfenvinfos	DDD + DDT + DDE (espresso in DDT) DDD op' DDD pp' + DDT op' DDE op' DDE pp' DDT pp' Deltametrina Diclobutrazolo Diclofluanide Diclorvos Dicofol Dieldrin Difenilamina Difenoconazolo Diflubenzuron Dimetoato Dimetomorf Diniconazolo

Clorfluazuron Cloroxuron Clortoluron Clormefos Clorobenzilato Cloropropilato Clorpirifos Etile Clorpirifos Metile Clortalonil Clozolinate Cumafos	Disulfoton Diuron Dodina
E Endosulfan Endosulfan Alfa Endosulfan Beta Endrin aldeide Endrin chetone Eptacloro Eptacloro + Eptacloro Epossido Eptacloro Epossido Eptenofos Esaclorobenzene (HCB) Esaconazolo Esaflumuron Esfenvalerate espressi in endosulfan) Etaconazolo Etiofencarb Etion Etofenprox Etoprofos Etrimfos Exitiazox	**F** Famoxadone Fenamifos Fenarimol Fenazaquin Fenbuconazolo Fenclorvos Fenexamide Fenitrotion Fenotiocarb Fenoxicarb Fenpiroximate Fenpropatrin Fenpropidin Fenson Fention Fentoato Fenuron Fenvalerate Fipronil Fluazinam Flucitrinate Fludioxonil Flufenoxuron Flusilazolo Fluvalinate Folpet Fonofos Forate Formotion Fosalone Fosfamidone Fosmet Furalaxil Furatiocarb
H HCH alfa HCH beta HCH delta	**I** Imazalil Imidaclorprid Indoxacarb Iodofenfos Iprodione Iprovalicarb Isofenfos Isoproturon
K Kresoxim metile	**L** Lambda - cialotrina Lindano Linuron Lufenuron
M Malation Mandipropamid	**N** Neburon Nuarimol

Mecarbam Mepanipirim Metalaxil Metamidofos Metidation Metiocarb Metobromuron Metolaclor Metomil Metossicloro Metoxuron Metribuzin Mevinfos Miclobutanil Monocrotofos Monolinuron	
O Ometoato + Dimetoato (espresso in Dimetoato) Oxadixil Oxamil	**P** Paraoxon etile Parathion Etile Parathion Metile Penconazolo Pendimentalin Permetrina Pertane Piperonil Butossido Piraclostrobina Pirazofos Piretrine Piridaben Piridafention Pirifenox Pirimetanil Pirimicarb Pirimifos Etile Pirimifos Metile Piriproxifen Procimidone Procloraz Profenofos Promecarb Prometrina Propamocarb Propargite Propiconazolo Propizamide Propoxur Protoato
Q Quinalfos Quinoxifen Quizalofop Etile	**S** Setossidim Simazina Spinosad Sulfotep
T Tebuconazolo Teflutrin Terbufos Terbutilazina Tetraclorvinfos Tetraconazolo Tetradifon Tetrametrina Tionazina	**V** Vamidotion Vinclozolin

Tolclofos Metile Tolifluanide Tralometrina Triadimefon Triadimenol Triazofos Triciclazolo Triclorfon Trifloxistrobina Trifluralin Tebufenozide Teflubenzuron Tiabendazolo Tiacloprid Tiodicarb Tiofanato Metile Triflumuron	

Risultati analisi multiresiduale

I risultati delle analisi multiresiduale hanno evidenziato l'assenza di residui chimici nei prodotti semilavorati scelti con le concentrazioni di tutte le sostanze elencate in tabella al di sotto del limite di rilevabilità strumentale.

F5.5 Sicurezza alimentare: micotossine

Valutazione e caratterizzazione della presenza di micotossine nei prodotti trasformati.

La ricerca di micotossine si è focalizzata su due tipologie di prodotti semi-trasformati: il pomodoro e le farine.

Attualmente, nei derivati del pomodoro si ritiene inconsueta la presenza delle più importanti e conosciute micotossine, come patulina, aflatossine e ocratossina A, e irrilevante la contaminazione da parte delle micotossine prodotte da Alternaria spp. e Fusarium spp. Infatti le specie fungine che più frequentemente alterano i pomodori appartengono a generi quali Cladosporium, Botrytis, Rhizopus, Mucor, Colletotrichum e solo raramente ai generi Alternaria e Fusarium.

a) Patulina. La specie fungina Penicillium expansum, la più importante responsabile della produzione di patulina in frutti freschi, non è inclusa tra le muffe che frequentemente possono alterare i pomodori. Penicillium expansum è la principale causa di alterazione e di contaminazione da patulina delle mele e delle pere e, in misura inferiore, di frutti con nocciolo come pesche, albicocche, ciliegie, prugne.

b) Aflatossine e ocratossina A. Anche le specie fungine produttrici di aflatossine, Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus e Aspergillus nomius, come quelle produttrici di ocratossina A (Penicillium verrucosum, Penicillium nordicum, Aspergillus ochraceus e Aspergillus carbonarius) non sono incluse tra le più frequenti muffe che normalmente alterano i pomodori.

In una sperimentazione condotta presso la SSICA è stato osservato che nei derivati del pomodoro (passata, doppio e triplo concentrato) contaminati artificialmente, le aflatossine si sono degradate in tre mesi di stoccaggio a temperatura ambiente.

c) Micotossine dei generi Alternaria e Fusarium. Le micotossine prodotte dal genere Alternaria (in particolare: alternarioli e acido tenuazoico) sono indicati come contaminanti occasionali dei derivati del pomodoro e i livelli riscontrati non sono considerati attualmente rilevanti né rappresentano un rischio per il consumatore.

Alcune specie di Fusarium, come F. equiseti, F. moniliforme (verticillioides), F. oxysporum e Fusarium solani, possono instaurarsi sul pomodoro fresco; tuttavia non sono le più frequenti cause d'alterazione di questa bacca. Inoltre, nella letteratura più recente non sono riportate notizie riguardanti la produzione di zearalenone, DON e fumonisine nel pomodoro e nei suoi derivati da parte delle specie di Fusarium. Pertanto, anche le micotossine prodotte da Fusarium spp., non sono considerate di interesse rilevante per i derivati del pomodoro. Nei confronti di queste specie fitopatogene la problematica viene affrontata mediante interventi di prevenzione in campo.

Le micotossine che con più frequenza sono ritrovate nel frumento, sia tenero che duro, sono le tossine prodotte da funghi del genere Fusarium, in particolare F. graminearum e F. culmorum, principali responsabili della cosiddetta "fusariosi della spiga", una malattia che colpisce vari cereali causando disseccamenti parziali o totali della spiga con conseguenti ripercussioni sulla resa e sulla qualità delle cariossidi.

Tra le micotossine che possono contaminare il frumento, ci sono il deossinivalenolo (DON), lo zearalenone (ZEA) e le tossine T2 e HT2. La normativa europea di riferimento stabilisce limiti per le tossine di Fusarium nei cereali destinati al consumo umano e nei loro derivati (farine, prodotti di panetteria, pasticceria, biscotteria, pasta secca) con limiti più restrittivi per gli alimenti destinati a lattanti, bambini ed alla prima infanzia.

Risultati

I campioni di farina (Senatore Cappelli e Farina Verna) sono stati analizzati per la presenza delle suddette tossine di Fusarium mentre le varietà di pomodori sono state analizzate per la presenza di tossine da Alternaria. Tutte le tipologie di semilavorati sono risultati esenti da contaminazione con concentrazioni al di sotto del limite di rilevabilità strumentale.

Siena, 10/09/2018

Prof. Giampiero Cai