

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI PRODUZIONE VEGETALE

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
ORTOFLOROFRUTTICOLTURA
XXII Ciclo.**

**ANALISI DI DIFFERENTI FATTORI CHE
INFLUENZANO LA QUALITA' ALIMENTARE SU
VARI MODELLI SPERIMENTALI DI PRODUZIONI
AGRICOLE**

AGR/04

Coordinatore: Prof. Alberto Graifenberg

Firma

Tutor: Dott. Giuseppe Maiani

Firma.....

Dottoranda: Alessandra Durazzo

Firma

Indice

	<i>pagina</i>
<i>Premessa</i>	8
1.0.0	
<i>Linee di Ricerca</i>	12
2.0.0	13
Linea di Ricerca 1	
2.0.1 Introduzione	13
2.0.2 Obiettivi	13
2.0.3 Descrizione delle orticole	14
2.1.0	14
Materiale e Metodi	
2.1.1 Campionamento	14
2.1.2 Quantificazione dei carotenoidi	16
2.1.3 Quantificazione dei polifenoli	16
2.1.4 Quantificazione della vitamina C	17
2.1.5 Misura del potere riducente totale (FRAP-Ferric Reducing Antioxidant Power)	18
2.1.6 Modelli cellulari-Saggio di vitalità cellulare (MTT)	19
2.1.7 Modelli cellulari- Immunomarcatura della Bromodeossiuridina (BrdU) e analisi in citometria a flusso	20
2.1.8 Analisi Statistica	21
2.2.0	22
Risultati e Discussione	
2.2.1 Valutazione del profilo degli antiossidanti e del potere antiossidante nella rucola	22
2.2.2 Valutazione del profilo degli antiossidanti e del potere antiossidante nella cicoria	25

2.2.3	Valutazione del profilo degli antiossidanti e del potere antiossidante nella lattuga	27
		31
2.2.4	Effetto degli estratti polifenolici sulla vitalità cellulare	
2.2.5	Effetto antiproliferativo degli estratti polifenolici: Immunomarcatura della Bromodeossiuridina (BrdU) e analisi in citometria a flusso	32
2.3.0	Conclusioni	35
3.0.0	Linea di Ricerca 2	36
	3.0.1 Introduzione	36
	3.0.2 Obiettivi	36
3.1.0	Materiale e Metodi	37
	3.1.1 Campionamento	37
	3.1.2 Quantificazione dei carotenoidi	37
	3.1.3 Quantificazione dei polifenoli	37
	3.1.4 Quantificazione della vitamina C	37
	3.1.5 Misura del potere Antiossidante Totale TEAC-Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay	38
	3.1.6 Misura del potere riducente totale FRAP-Ferric Reducing Antioxidant Power	38
	3.1.7 Modelli cellulari- Cambiamenti morfologici dell'epitelio cellulare mediante la misura del potenziale trans-epiteliale	38
	3.1.8 Analisi Statistica	40
3.2.0	Risultati e Discussione	40
	3.2.1 Molecole bioattive	40
	3.2.2 Potere Antiossidante	43
	3.2.3 Funzionalità del pomodoro	44
3.3.0	Conclusioni	47

4.0.0	Linea di Ricerca 3	48
4.0.1	Introduzione	48
4.0.2	Obiettivi	48
4.1.0	Materiale e Metodi	49
4.1.1	Campionamento	49
4.1.2	Quantificazione dei carotenoidi	49
4.1.3	Quantificazione dei polifenoli	49
4.1.4	Quantificazione della vitamina C	49
4.1.5	Misura del potere Antiossidante Totale TRAP Total radical-trapping antioxidant potential	49
4.1.6	Misura del potere riducente totale FRAP-Ferric Reducing Antioxidant Power	50
4.1.7	Analisi Statistica	50
4.2.0	Risultati e Discussione	50
4.2.1	Screening tra le varie cultivar di fragole	50
4.2.2	Valutazione dell'effetto della conservazione domestica	51
4.3.0	Conclusione	52
5.0.0	Linea di Ricerca 4	53
5.0.1	Introduzione	53
5.0.2	Obiettivi	53
5.1.0	Materiale e Metodi	53
5.1.1	Campionamento	53
5.1.2	Quantificazione dei carotenoidi	54
5.1.3	Quantificazione dei polifenoli	55

	5.1.4 Quantificazione della vitamina C	55
	5.1.5 Misura del potere Antiossidante Totale TRAP Total radical-trapping antioxidant potential	55
	5.1.6 Misura del potere riducente totale FRAP-Ferric Reducing Antioxidant Power	55
	5.1.7 Analisi Statistica	55
5.2.0	Risultati	55
	5.2.1 Lombardia	55
	5.2.2 Veneto	56
	5.2.3 Piemonte	57
	5.2.4 Abruzzo	59
	5.2.5 Calabria	61
5.3.0	Conclusioni	61
6.0.0	Conclusioni generali	63
7.0.0	Bibliografia	65

Lista Tabelle

Tab 1	Elenco campionamenti di rucola, lattuga e cicoria in due anni di sperimentazione	15
Tab 2	Elenco campionamenti di recupero per rucola e cicoria.	15
Tab 3	Valori FRAP nella rucola	22
Tab 4	Quantificazione della vitamina C nella rucola	23
Tab 5	Quantificazione della quercetina nella rucola	23
Tab 6	Quantificazione della luteina nella rucola	24
Tab 7	Valutazione delle proprietà antiossidanti e dei livelli dei singoli antiossidanti per la rucola biologica versus la rucola convenzionale	24

Tab 8	Valori FRAP nella cicoria	25
Tab 9	Determinazione di acido caffeico e acido clorogenico nella cicoria	26
Tab 10	Determinazione del contenuto di Vitamina C nella cicoria	26
Tab 11	Determinazione del contenuto di luteina nella cicoria	27
Tab 12	Valutazione delle proprietà antiossidanti e dei livelli dei singoli antiossidanti per la rucola biologica versus la rucola convenzionale	27
Tab 13	Valori FRAP nella lattuga	28
Tab 14a	Determinazione del contenuto di acido caffeico, acido clorogenico, rutina e quercetina nei campioni di lattuga del 1°anno di coltivazione	29
Tab 14b	Determinazione del contenuto di acido caffeico, acido clorogenico, rutina e quercetina nei campioni di lattuga del 2°anno di coltivazione	29
Tab 15	Determinazione del contenuto di Vitamina C nella lattuga	30
Tab 16	Determinazione del contenuto di Luteina e β -Carotene nella lattuga	30
Tab 17	Confronto tra il primo e il secondo anno di coltivazione del pomodoro. Valore medio (mg/Kg) and sd dei composti bioattivi antiossidanti	41
Tab 18	Confronto tra il primo e il secondo anno di coltivazione. Valore medio e sd della Capacità Antiossidante Totale misurata tramite TEAC (mmol Trolox/ Kg) e FRAP (mmol Fe^{2+} /Kg)	44
Tab 19	Capacità Antiossidante Totale e composti bioattivi in differenti ecotipi di fragole	51
Tab 20	Livelli dei composti bioattivi contenuti nelle fragole "Favetta di Terracina" fresche e conservate	52
Tab 21	Classificazione dei prodotti tipici selezionati per il progetto	54
Tab 22	Confronto tra i valori FRAP e TRAP, dosaggio della Vitamina C nelle ciliegie di Aprica e nelle ciliegie commerciali	56
Tab 23	Confronto tra i valori del potenziale antiossidante totale delle patate di Rotzo e delle patate commerciali, sia sul prodotto crudo che cotto.	56
Tab 24	Confronto tra i valori FRAP e TRAP e dosaggio della Vitamina C tra i lamponi del Cansiglio e i lamponi commerciali	57
Tab 25	Confronto tra i valori FRAP e TRAP delle pere Madernassa e delle pere commerciali (con e senza buccia)	58

Tab 26	Confronto tra i valori FRAP e TRAP delle patate biologiche e delle patate integrate della Val Belbo (prodotto crudo e prodotto cotto)	58
Tab 27	Confronto tra i valori FRAP e TRAP delle mele limoncelle e delle mele commerciali (con e senza buccia)	59
Tab 28	Confronto tra i valori di TRAP e FRAP delle carote della Piana del Fucino e delle carote commerciali (analisi sul prodotto crudo e cotto).	60
Tab 29	Confronto tra i valori di α -carotene e β -carotene delle carote della Piana del Fucino e delle carote commerciali (analisi sul prodotto crudo e cotto).	60
Tab 30	Confronto tra i valori FRAP e TRAP della cicoria di pascolo e della cicoria commerciale (prodotto cotto). Dosaggio dell'acido clorogenico	61
Figure		
Fig 1	Effetto degli estratti di rucola sulla vitalità cellulare delle cellule CaCo-2	31
Fig 2	Effetto degli estratti di lattuga sulla vitalità cellulare delle cellule CaCo-2	32
Fig 3	Effetto degli estratti di cicoria sulla vitalità cellulare delle cellule CaCo-2	32
Fig 4	Effetto degli estratti di rucola sulla distribuzione del ciclo cellulare	33
Fig 5	Incorporazione di BrdU in cellule di controllo e in cellule trattate con estratto di rucola	34
Fig 6	Visione schematica del sistema colture-cellulare Caco2 (multiwell)	40
Fig 7a	Attività Antiossidante/pro-ossidante ottenuta usando modelli in vitro ed espresso come TEER (Ohm/cm ²) attraverso il tempo in campioni di pomodoro biologico e convenzionale rispettivamente con l'aggiunta di differenti concentrazioni di estratti polifenolici di pomodoro.	46
Fig 7b	Analisi istologica di un monostrato di cellule <i>CaCO₂</i> trattate con concentrazioni crescenti di estratto polifenolico di pomodoro coltivato secondo pratiche agronomiche biologiche (B-C-D) e convenzionali (E-F-G) . Per entrambi gli estratti ad una concentrazione di 10 μ M, si presentava un iniziale effetto (pro)-ossidante.	46

Premessa

Gli alimenti rappresentano un settore socialmente ed economicamente importante dell'attività umana. Le piante, gli animali e i loro prodotti derivati rappresentano una fondamentale e rinnovabile risorsa a disposizione dell'umanità, la cui conservazione, ivi compresa la salvaguardia della biodiversità, rappresenta un “dovere” da parte dell'uomo.

Nel passato la “qualità alimentare” è stata identificata con le proprietà nutrizionali e sensoriali degli alimenti; nell'ultimo decennio c'è stata un'estensione ed un arricchimento del concetto di qualità alimentare. La qualità sta diventando un parametro soggettivo, che differisce da individuo ad individuo e dipende dai punti di vista del consumatore: “la qualità dipende dalla persona, dal luogo e dal tempo” (Kapsak *et al.* 2008); c'è un interesse crescente verso una nutrizione adeguata e salutare e verso la consapevolezza della diversità dei bisogni degli individui e delle comunità. La richiesta del consumatore di maggiori informazioni sulla qualità alimentare e sulla caratterizzazione e la misura dei valori nutrizionali e dei fattori antinutrizionali degli alimenti è sempre più rilevante. Pertanto è necessario sviluppare un modello che guidi il consumatore nelle sue scelte e nelle sue valutazioni.

Data l'enorme diversità all'interno della comunità umana, le richieste di consumi individuali non sono assolutamente omogenee. La produzione alimentare e i consumi alimentari si adattano continuamente al cambiamento della società, così la biodiversità pone le basi nei confronti di tali cambiamenti.

Al tempo stesso, emergono cambiamenti sempre maggiori nel campo della sicurezza alimentare riguardo ai rischi di contaminazioni microbiologiche e chimiche.

Un'analisi comprensiva della relazione tra il consumo e la produzione alimentare è necessaria per promuovere patterns di consumi alimentari equilibrati che garantiscano sicurezza ed alta qualità nutrizionale e nel contempo un basso impatto ambientale.

Il grande progresso nei processi tecnologici (tecnologie avanzate ed innovative), nelle pratiche agricole (produzioni alimentare, trasporto e processing) e i

cambiamenti nello stile di vita hanno concentrato l'attenzione verso le produzioni locali e i cibi funzionali come elementi principali per migliorare la qualità alimentare. In particolare, diventa importante lo studio di alimenti tradizionali, locali e stagionali: prodotti alimentari, coltivati con tecniche basate su una tradizione storica e culturale di uno specifico territorio e che occorre solo in un luogo specifico.

Inoltre si stanno sviluppando i cibi funzionali, che rispetto ai cibi convenzionali, potrebbero avere proprietà ed effetti benefici per la salute umana. Appartengono ai cibi funzionali: i cibi che possono influenzare una o più funzioni target nell'organismo, i cibi in cui è stata incorporata una componente bioattiva, o i cibi in cui è stata eliminata una componente, o cibi in cui la biodisponibilità di più componenti è stata modificata.

In questo contesto è importante sottolineare come la qualità nutrizionale di un alimento dipende, oltre che da fattori intrinseci peculiari di ogni prodotto, da fattori connessi all'ambiente e alla trasformazione/degradazione causata dall'attività umana. L'insieme di questi fattori gioca un ruolo cruciale sulla qualità del prodotto che è legata al rapporto dei macro e micronutrienti in esso contenuti. Di seguito è riportata una classificazione dei fattori estrinseci:

1. **Fattori genetici:** specie, varietà.
2. **Pratiche agricole:** caratteristiche del terreno, esposizione alla luce solare, irrigazione, stagione, condizioni geografiche, condizioni pedo-climatiche, fertilizzazione del terreno, stadio di maturazione, periodo e metodo di raccolta.
3. **Trattamenti domestici:** cottura, conservazione, modalità di consumo.
4. **Processi tecnologici:** pastorizzazione, congelamento, macinazione, essiccazione, trattamenti ad alta pressione, cottura, conservazione.

Quindi i fattori che influenzano il contenuto di nutrienti sono molteplici e includono il clima, la geografia e la geochimica, le pratiche agricole (come la fertilizzazione) e la composizione genetica delle specie alimentari. In passato, per esempio, i dati di composizione di un alimento generico erano considerati

sufficienti per la maggior parte degli scopi, ma ora l'utilità della conoscenza di dati di composizione specifica per ogni cultivar sta diventando essenziale.

L'etichetta dei prodotti alimentari dovrebbe contenere quindi le origini, i programmi agricoli, le sostanze tossiche ed eventuali contaminanti. In aggiunta, informazioni sulle metodiche di preparazione alimentare e sui processi a cui sono sottoposti gli alimenti, potrebbero aiutare a comprendere le differenze del quadro nutrizionale in relazione alla cottura o ai differenti trattamenti subiti.

Si devono colmare i vuoti sui dati di composizione e di consumo. Per quanto riguarda la composizione nutrizionale, punto di partenza deve essere la formulazione di "nuovi e completi" databases, che tengano conto di tutte le caratteristiche specifiche dell'alimento e della relazione di esso con l'ambiente. Le nuove tabelle e i nuovi databases dovranno essere divulgati ed inseriti in programmi, progetti istituzionali ed educativi, iniziative di educazione nutrizionale che tengano conto della tutela della salute del consumatore

Dati reali sulla composizione nutrizionale dei singoli alimenti stanno diventando essenziali per la formulazione di appropriate diete terapeutiche, e c'è un numero sempre maggiore di alimenti, resi "interessanti" dalle loro proprietà nutrizionali e terapeutiche. Il valore nutrizionale delle matrici vegetali può essere valutato attraverso lo studio della composizione in macronutrienti, ma l'aspetto attualmente di maggiore interesse, è il gran numero di composti naturali definiti come "molecole ad azione antiossidante", largamente presenti in frutta e verdura. Tali effetti protettivi sono stati attribuiti alle molecole antiossidanti (polifenoli, vitamina C, vitamina E e carotenoidi). Gli antiossidanti presentano un ampio range di effetti biologici come attività antibatterica, antinfiammatoria, epatoprotettiva, anticarcinogenica ed azione vasodilatatoria. Queste sostanze in virtù delle proprietà che esplicano *in vitro* ed *ex vivo* sembrano confermare l'effetto salutistico associato al consumo di alimenti di origine vegetale. Via via che sono emersi dati certi sul ruolo degli antiossidanti nella difesa della salute, la ricerca ha moltiplicato i suoi sforzi per comprendere quali sono i fattori in grado di influenzare il contenuto in molecole bioattive di frutta e verdura.

L'attività di ricerca portata avanti nello svolgimento di tale dottorato si colloca appunto nella migliore comprensione e descrizione dei fattori che influenzano la qualità alimentare. L'interesse suscitato dagli effetti benefici dei composti fitochimici ha focalizzato l'attenzione dei ricercatori verso l'identificazione di tecniche e di protocolli per il miglioramento della qualità alimentare attraverso il raggiungimento di un contenuto ottimale di molecole bioattive, incrementando e massimizzando i loro livelli negli alimenti e di conseguenza verso produzioni alimentari più nutritive e più salutistiche.

.

1.0.0 Linee di Ricerca

L'attività prevista è suddivisa nelle seguenti linee di Ricerca:

1. **Linea di Ricerca 1 : Valutazione dell'influenza delle tecniche di coltivazione (biologico verso convenzionale, integrato) ed ambientali (pieno campo verso serra) sulle caratteristiche nutrizionali, qualitative e salutistiche dei cicoria, rucola e lattuga.**
2. **Linea di Ricerca 2: Valutazione dell'influenza di differenti pratiche agronomiche (organico vs convenzionale) sulla qualità nutrizionale del pomodoro.**
3. **Linea di Ricerca 3: Valutazione dell'influenza dello storage sui livelli di molecole bioattive caratteristiche delle fragole, dopo uno screening di differenti cultivars di fragole.**
4. **Linea di Ricerca 4: Confronto tra prodotti tipici e commerciali.**

2.0.0 Linea di Ricerca 1

2.0.1 Introduzione

La presente linea di ricerca ha come fondamento le conoscenze relative al ruolo dei sistemi antiossidanti nel processo di tolleranza allo stress ossidativo.

Le condizioni di crescita coinvolgono un gran numero di fattori agronomici, che potrebbero avere un forte impatto sul profilo nutrizionale di queste orticole.

Questi includono la tipologia e le caratteristiche del terreno, le ore di esposizione alla luce solare, l'irrigazione, il controllo ai pesticidi, la stagione, il luogo di coltivazione e i metodi di coltivazione. La letteratura mostra differenze significative tra alimenti ottenuti secondo un sistema di coltivazione biologico e convenzionale, e come queste differenze possano influenzare la qualità nutrizionale di un alimento e indirettamente la salute del consumatore.

2.0.2 Obiettivi

L'obiettivo della ricerca è stato quello di valutare l'influenza delle tecniche di coltivazione (biologico verso convenzionale, integrato) ed ambientali (pieno campo verso serra) sulle caratteristiche nutrizionali, qualitative e salutistiche dei prodotti vegetali. Gli alimenti selezionati sono lattuga, cicoria e rucola. Per ogni coltura è stata scelta un'area di coltivazione: la provincia di Milano per la cicoria, quella di Bergamo per la lattuga e quella di Brescia per la rucola.

L'attività di ricerca, focalizzata sulla quantificazione di alcune molecole bioattive naturali nutrienti e non nutrienti (vitamine, polifenoli, carotenoidi), e sulla valutazione del potere antiossidante totale è stata articolata come segue:

- identificazione e quantificazione di alcune molecole naturali ad azione antiossidante;
- valutazione della capacità antiossidante totale degli estratti ottenuti dagli alimenti in studio;

-effetto degli estratti sulla vitalità cellulare ed loro effetto antiproliferativo tramite analisi del ciclo cellulare (cellule CaCo2).

2.0.3 Descrizioni delle orticole oggetto di questo studio

La rucola è una pianta erbacea, annuale o biennale, che non presenta particolari problemi di coltivazione, e cresce bene in tutti i tipi di terreno. Il ciclo vegetativo di questa erba è molto breve: dal momento della semina, che si effettua a primavera direttamente in piena terra, al completamento del ciclo vitale trascorrono spesso solo poche settimane. In condizioni climatiche ideali, talvolta, le piante mantengono la vegetazione anche in inverno.

La rucola (*Eruca sativa*) è una coltura molto diffusa ed è consumata solitamente fresca (foglie o germogli) per il suo tipico gusto speziato/saporito. Inoltre, è menzionata nella farmacopea tradizionale e nella letteratura antica per le sue molteplici proprietà benefiche, dovute ai diversi componenti bioattivi quali carotenoidi, vitamina C, fibra, flavonoidi e glucosinolati.

La cicoria Pan di Zucchero è una coltura tendenzialmente autunnale con semine e/o trapianto nell'estate (luglio/agosto). La raccolta avviene da settembre a dicembre, successivamente, il prodotto viene conservato. Tuttavia, negli ultimi anni, ci sono coltivazioni primaverili con semine o trapianti a marzo/aprile e raccolte a maggio/giugno. I principali componenti sono polifenoli, acidi organici amari, fibre, inulina, soprattutto contenuti nelle foglie, glucidi, vitamine del gruppo B, vitamina C, vitamina K, provitamina A.

Il termine "lattuga" include differenti cultivars. Numerosi studi hanno dimostrato come i vari tipi di lattuga siano una fonte di composti bioattivi quali vitamina C, flavonoidi (in particolare quercetina e luteolina), fibra, lignani.

2.1.0 Materiale e Metodi

2.1.1 Campionamento

I prodotti freschi sono stati opportunamente porzionati e pre-trattati al fine di ottimizzare le differenti procedure di estrazioni .

Nella tabella 1 e 2 si elencano i campionamenti effettuati:

Tabella 1. Elenco campionamenti di rucola, lattuga e cicoria in due anni di sperimentazione.

Orticola	Tecnica di coltivazione	Azienda	Regime		1°annodi sperimentazione	2°anno di sperimentazione
Rucola	Convenzionale	Fogliamica Orticoltura dei F.lli Tebaldini (BS)	Serra		• 1°campionamento	•1°campionamento
	Integrato	Ferrari Elio (BS)			• 2°campionamento • 3°campionamento	•2°campionamento •3°campionamento
Lattuga	Biologica	Fontana Giovanni (BG)	1°anno Serra	2° anno Pieno Campo	•1°campionamento* •2°campionamento* • 3°campionamento	•1°campionamento •2°campionamento •3°campionamento
	Integrato	Mioorto (BG)				
Cicoria	Convenzionale	De Ponti Fratelli (MI)	Pieno Campo		• 1°campionamento • 2°campionamento • 3°campionamento	•1°campionamento •2°campionamento •3°campionamento
	Integrato	Scotti Fratelli (MI)				

* Alla coltura integrato è stata sostituita quella convenzionale

Come riportato nella tabella 2 sono stati effettuati due campionamenti di recupero per valutare i parametri biochimici del prodotto biologico di rucola e cicoria.

Tabella 2. Elenco campionamenti di recupero per rucola e cicoria.

Orticola	Tecnica di coltivazione	Azienda	Regime
Rucola	Convenzionale	Fogliamica Orticoltura dei F.lli Tebaldini (BS)	Serra
	Biologica	Azienda Agricola Toti (BG)	
Cicoria	Convenzionale	De Ponti Fratelli (MI)	Pieno Campo
	Biologica	Mercato Generale	

2.1.2 Quantificazione dei carotenoidi

Sono stati determinati secondo la metodica descritta da Sharpless (1999) debitamente adattata alla matrice alimentare. Questo metodo è utilizzato dal National Institute of Standards and Technology (NIST). In breve, circa 1-3 g di campione è stato combinato con 3 ml di THF (tetraidrofurano) e 2.7 ml di metanolo. La miscela è stata saponificata per 30 minuti a 40° C in bagnomaria dopo aver aggiunto 0.3 ml di una soluzione metanolica di KOH 40 % (w/v). Dopo aggiunta di circa 0.15 g di acido ascorbico per neutralizzare il KOH, i carotenoidi sono stati estratti per 3 volte con 15 ml di esano-etere etilico (50:50). Le fasi organiche (circa 45 ml) sono state combinate ed evaporate sotto un flusso di azoto e il residuo ridissolto in 10 ml di n-esano. Per l'analisi 1 ml di campione è stato evaporato e ricostituito in 1 ml di fase mobile (50% di metanolo, acetonitrile 45% e il 5% tetraidrofurano). 50 microlitri dell'estratto ricostituito sono stati iniettati in una colonna Waters Nova Pack C18 (3.9 mm x 150 mm, 4 µm), ad un flusso isocratico di 1 ml/min. Gli estratti sono stati analizzati da sistema HPLC Perkin-Elmer serie 200 ISS. La fase mobile è composta da metanolo/acetonitrile/tetraidrofurano (50:45:5) e i picchi sono stati rilevati con rivelatore spettrofotometrico variabile (Perkin-Elmer LC-95, Norwalk, CO, USA) collegato a un personal computer Pe Nelson mod 1020 (Perkin-Elmer). La lunghezza d'onda di identificazione adottata per i carotenoidi è stata di 450 nm (Maiani et al, 1995).

2.1.3 Quantificazione dei polifenoli

Possono essere idrolizzati o no, in modo da ottenere le forme libere e glicosilate ed estratti mediante la metodica descritta da Hertog et al (1992). Il metodo utilizzato per la determinazione dei polifenoli è stato convalidato da Serafini et al. (2002). Brevemente, polifenoli sono stati estratti da circa 3 gr di alimento omogeneizzati con acetato di etile, dopo idrolisi acida con HCl-metanolo (1:1 v/v) a 90° C per 2 h. L'analisi quantitativa è stata effettuata utilizzando un sistema HPLC della serie ESA, dotato di un rivelatore coulometrico e un software

operativo di controllo delle apparecchiature e di elaborazione dei dati (ESA, Chemsford, MA, USA). E' stata utilizzata una colonna Supelcosil LC-18 (25 cm x 4.6 cm, 5 μ m) dotata di precolonna Perisorb Supelguard LC-18 (Supelco, Milano Italia). Il volume iniettato è stato di 30 μ l. L'eluizione cromatografia secondo gradiente è stata eseguita a 30° C con un flusso costante di 1 ml/min utilizzando 0.02 M di fosfato di sodio, portato a pH 2.8 con acido orto fosforico l'85 % (solvente A) e metanolo (solvente B). I potenziali delle celle analitiche sono stati fissati a 60, 120, 200, 340, 480, 620, 760 e 900 mV. Il gradiente lineare è stato avviato al 13 % del solvente B poi aumentato al 40 % entro 13.5 min quindi al 90 % entro 25.5 min e raggiungimento delle condizioni finali del 100 % entro 3 minuti più tardi e mantenimento per 5 min. Ritorno alle condizioni iniziali del 13 % del solvente B entro 3 min e condizionamento per 6 min (Serafini et al.2002).

2.1.4 Quantificazione della vitamina C

L'estrazione di AA totale dall'alimento è stata effettuata secondo la metodica descritta da Margolis et al. (1990). Brevemente, 1 gr di campione è stato sospeso in 5 ml di acqua. Dopo aggiunta di 1 ml of fosfato di potassio bibasico 0.5 mol/L contenente 100 gL⁻¹ di DTT (1,4 dithiothreitol), il campione è stato agitato con vortex per 15 sec, e mantenuto a T ambiente per 30 min. Successivamente all'aggiunta di una soluzione di MPA (400 gL⁻¹ acido metafosforico), dopo centrifugazione (1000 giri, 30 min, 5° C) la fase chiara della sospensione è stata trasferita in flaconcini da 1.8 ml. La separazione cromatografica è stata condotta con una colonna Capcell Pak NH2 250 x 4.6 mm (SHISEIDO, Tokyo, Giappone), utilizzando un sistema HPLC della serie ESA, dotato di un rivelatore coulometrico e un software operativo di controllo delle apparecchiature e di elaborazione dei dati (ESA, Chemsford, MA, USA). I potenziali degli elettrodi sono stati impostati a 0, 100, 200, 300 e 400 mV. La colonna è stata equilibrata a 40° C con un flusso isocratico di 0.8 ml/min⁻¹ di fase mobile composta da 0.680 g di potassio fosfato monobasico, 200 ml di acqua, 800 ml di acetonitrile e 7.5 ml di acido fosforico concentrato. Il volume di iniezione è stato di 30 μ l (Serafini et al. 2002).

2.1.5 Misura del Potere Riducente Totale (FRAP-Ferric Reducing Antioxidant Power)

La misura del potere riducente totale viene eseguita su estratti ottenuti trattando i campioni selezionati secondo la metodica di Pellegrini et al. 2003, di seguito riportata. Il campione viene tagliato in piccoli pezzi e frullato in corrente d'azoto; viene pesato 1 g di campione frullato che viene sottoposto a quattro estrazioni successive. L'estrazione dei composti idrosolubili è effettuata aggiungendo al campione 4 ml di acqua bidistillata e ponendo in agitazione in bagno agitato Dubnoff a 200 rpm per 15 minuti a temperatura ambiente e centrifugando a 3500 rpm per 10 minuti. Il surnatante viene recuperato e trasferito in una provetta da 10 ml, e conservato in frigo; al residuo polposo vengono aggiunti 2 ml di acqua bidistillata e viene ripetuta la procedura di estrazione. I surnatanti recuperati dalle due estrazioni vengono riuniti, viene misurato il volume totale e l'estratto viene aliquotato in contenitori da 2 ml, nuovamente centrifugato a 10000 rpm per 5 minuti (al fine di allontanare eventuali particelle solide) e trasferito in contenitori da 1.5 ml per l'analisi. Per l'estrazione della frazione liposolubile, il residuo polposo viene sottoposto a due ulteriori estrazioni: prima con 4 ml e poi con 2 ml di acetone, procedendo come nell'estrazione dei composti idrosolubili. Anche in questo caso, l'estratto acetone viene riunito e trasferito in contenitori per essere analizzato.

Il metodo FRAP rappresenta una misura diretta del potere riducente totale di una soluzione. Il metodo, colorimetrico, si basa sulla riduzione del complesso tra ferro (III) ed il composto tripiridil-triazina (TPTZ), da parte di composti riducenti che causa la formazione del complesso ferro(II)-TPTZ con sviluppo di una colorazione blu, che può essere monitorata spettrofotometricamente misurando il cambiamento di assorbanza della soluzione in esame a 595 nm (Benzie et al. 1996).

2.1.6 Modelli cellulari-Saggio di vitalità cellulare (MTT)

Le cellule umane di adenocarcinoma del colon sono state ottenute dalla European Tissue Culture Collection e coltivate in D-MEM con GlutaMAX™-I addizionato del 10 % di siero fetale bovino e 100 IU/ml di penicillina e 100 µg/ml di streptomicina (tutte comprate dalla Gibco-Invitrogen).

Le cellule sono state mantenute a 37°C in atmosfera umidificata contenente il 5 % di CO₂.

Le cellule sono state trattate con estratti polifenolici per 24 h per tutte le metodiche utilizzate. In parallelo sono stati analizzati controlli negativi costituiti da cellule non trattate o trattate solo con il solvente (metanolo).

Il test dell'MTT è un saggio di citotossicità colorimetrico che permette di testare la proliferazione e la vitalità cellulare ed in particolare l'efficienza mitocondriale. L'MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) è un sale di tetrazolio che nel caso di cellule vitali viene ridotto dall'ambiente altamente riducente delle cellule proliferanti per azione della deidrogenasi mitocondriale. La riduzione dell'MTT determina la formazione di cristalli di formazano che attribuiscono la caratteristica colorazione violacea ai mitocondri delle cellule vitali. Al contrario in cellule non proliferanti o morte aventi quindi mitocondri non attivi, l'MTT non verrà ridotto con una conseguente colorazione violacea meno intensa (Mosmann, 1983).

Questo saggio di citotossicità è stato utilizzato come analisi preliminare per determinare le dosi non tossiche degli estratti al fine di ricavare le concentrazioni utili per gli esperimenti eseguiti successivamente. Le cellule sono state seminate in piastre a 24 pozzetti alla concentrazione di 1×10^5 cellule/pozzetto.

Successivamente le cellule sono state incubate per 24 h in terreno completo con i vari estratti alle concentrazioni crescenti 0.5- 1-5-10-50-100 ml/l.

Dopo l'incubazione, è stato eliminato il terreno, sono stati fatti due lavaggi in PBS e si è aggiunto in ogni pozzetto 1 ml di terreno fresco completo addizionato con 80µl di una soluzione 5mg/ml in PBS di MTT (Tiazolil blu). Le piastre sono state incubate per 2 ore a 37°C (il tempo d'incubazione non deve superare le 4 ore dato che l'MTT è citotossico). Terminata l'incubazione, il terreno è stato rimosso e si è

aggiunto in ciascun pozzetto 1ml di DMSO per sciogliere i cristalli di formazano formati. Quindi sono stati prelevati 100 µl di ciascun campione e sono stati posti in piastre a 96 pozzetti per la lettura spettrofotometrica, effettuata con un lettore di micropiastre (BIORAD model 550), alla lunghezza d'onda di 570 nm. La vitalità cellulare è stata calcolata misurando la differenza in termini densità ottica tra i campioni trattati rispetto ai controlli.

2.1.7 Modelli cellulari- Immunomarcatura della Bromodeossiuridina (BrdU) e analisi in citometria a flusso

Per indagare un eventuale modulazione del ciclo cellulare operata dagli estratti sulle Caco-2, è stata effettuata la marcatura immunofluorescente della Bromodeossiuridina (BrdU) incorporata nel DNA. La distribuzione delle cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare abbinata all'incorporazione di BrdU, costituisce un tipo di analisi più approfondito che permette di valutare lo stato proliferativo delle cellule. La BrdU, un analogo sintetico della timina, viene incorporata nel DNA delle cellule proliferanti. L'analisi biparametrica al citofluorimetro permette di valutare sia il contenuto totale di DNA, sia l'incorporazione di BrdU nel DNA e determinare in questo modo la percentuale di cellule proliferanti (Youdin et al. 2000; Hemler et al. 2007).

Le cellule sono state seminate alla concentrazione di 1.2×10^6 in fiasche da 75 cm² e dopo 24h dalla semina, sono state trattate con i vari estratti polifenolici alla concentrazione 10ml/l. Dopo 24h è stata aggiunta la BrdU, in concentrazione 30µM (da una stock 30mM), al terreno di coltura per 1h a 37°C. Si è proceduto poi alla rivelazione della BrdU incorporata nel DNA. Le cellule sono state staccate mediante tripsinizzazione; lavate in PBS, fissate con fisiologica ed etanolo freddo (-20°C) al 70% e conservate a -20°C almeno 2h. Successivamente, dopo aver riportato le cellule a temperatura ambiente e averle lavate in PBS, sono state incubate per 30 minuti in 1ml di HCl 2N (idrolisi acida) per denaturare il DNA. In seguito i campioni, previa centrifugazione, sono stati risospesi in una soluzione neutralizzante (Na₂B₄O₇ 0.1M, pH= 8.2) per 15 minuti e poi lavati per

15 minuti in PBT (PBS contenente 1% BSA e 0.2% Tween-20) per la permeabilizzazione. I pellets sono stati quindi incubati 1h, a temperatura ambiente in agitazione al buio, in 100 µl di anticorpo primario monoclonale anti-BrdU (Clone B44, Becton Dickinson, UK) diluito 1:20 in PBT. Dopo tre lavaggi di 10 minuti in PBT, i campioni sono stati incubati per 30 minuti, a temperatura ambiente al buio, in 100 µl di anticorpo secondario anti-immunoglobuline di topo, coniugato con fluorocromo (FITC, Amhersham Biosciences, UK) diluito 1:100 in PBT. Dopo l'incubazione e tre lavaggi di 10 minuti in PBT, il DNA delle cellule è stato colorato con ioduro di propidio: i campioni sono stati risospesi in PBS contenente Ribonucleasi A (2mg/ml) e ioduro di propidio (5µg/ml).

La colorazione è stata effettuata a temperatura ambiente al buio per 30 minuti. I campioni sono stati conservati tutta la notte a 4°C e, il giorno successivo, sono stati misurati con il citometro a flusso Coulter Epics XL (Coulter Corporation, USA). L'emissione di fluorescenza dello ioduro di propidio è stata misurata con filtro a banda 620/30 nm, mentre quella della FITC con filtro a banda 530/30nm. Per ogni campione sono state analizzate 1×10^4 cellule; i dati sono stati espressi come percentuale di BrdU incorporata dalle cellule trattate con gli estratti rispetto ai controlli.

2.1.8 Analisi Statistica

I dati sono espressi come medie $\pm$ d.s. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il programma STATISTICA per Windows (release 4 • 5; StatSoft Inc, Vigonza PD, Italia).

2.2.0 Risultati e Discussione

2.2.1 Valutazione del profilo degli antiossidanti e del potere antiossidante nella rucola

La tabella 3 riporta le proprietà antiossidanti della rucola riscontrate nei due anni di coltivazione con sistema convenzionale ed integrato.

Tabella 3. Valori FRAP nella rucola .

Rucola	FRAP (mmolkg ⁻¹) 1° anno di coltivazione			FRAP (mmolkg ⁻¹) 2° anno di coltivazione		
	1°	2°	3°	1°	2°	3°
Convenzionale	4.44±0.11 ^{c,d}	6.93±0.22 ^{a,c,e}	7.90±0.24 ^{d,e}	7.76±0.69 ^h	9.92±0.46 ^{b,h,i}	7.27±0.17 ⁱ
Integrato	4.13±0.17 ^{f,g}	7.22±0.34 ^{a,f}	7.67±0.27 ^g	8.56±0.70 ^{l,m}	11.02±0.45 ^{b,l,n}	7.31±0.26 ^{m,n}

^a 2° campionamento, 1° anno di coltivazione: integrato vs convenzionale, P<0.01

^b 2° campionamento, 2° anno di coltivazione: integrato vs convenzionale, P<0.05

^{c,d,f,g} 1° anno di coltivazione: 2°,3° campionamento vs 1° campionamento, P<0.001

^e 1° anno di coltivazione, convenzionale: 3° campionamento vs 2° campionamento, P<0.05

^h 2° anno di coltivazione, convenzionale: 2° campionamento vs 1° campionamento, P<0.05

ⁱ 2° anno di coltivazione, convenzionale: 2° campionamento vs 3° campionamento, P<0.001

^l 2° anno di coltivazione, integrato: 2° campionamento vs 1° campionamento, P<0.01

^m 2° anno di coltivazione, integrato: 1° campionamento vs 3° campionamento, P<0.05

ⁿ 2° anno di coltivazione, integrato: 2° campionamento vs 3° campionamento, P<0.001

Osserviamo differenze statisticamente significative dovute alla stagionalità tra i periodi di raccolta. Al contrario, l'analisi dei campioni non ha mostrato differenze significative tra i prodotti coltivati in regime convenzionale ed integrato, eccetto che per il secondo campionamento sia del primo che del secondo anno di coltivazione, in cui risulta significativamente più alto il valore FRAP del prodotto integrato.

Tabella 4. Quantificazione della vitamina C nella rucola.

Rucola	Vitamina C (mg/100 gr) 1° anno di coltivazione			Vitamina C (mg/100 gr) 2° anno di coltivazione		
	1°	2°	3°	1°	2°	3°
Convenzionale	81.74±6.32 ^{a,b}	53.78±4.40 ^{a,m}	57.02±4.22 ^{b,n}	27.59±1.57 ^{e,g}	20.78±0.21 ^{e,f,o}	34.15±0.19 ^{f,g,p}
Integrato	73.56±0.51 ^{c,d}	76.18±0.00 ^{c,m}	80.98±10.75 ^{d,n}	29.46±1.08 ^{h,i}	37.25±1.40 ^{h,i,o}	41.11±0.74 ^{i,l,p}

^{a,b} 1° anno di coltivazione, convenzionale: 1° campionamento vs 2° e 3° campionamento, P<0.001

^{c,d} 1° anno di coltivazione, integrato: 1° campionamento vs 2° e 3° campionamento, P<0.01

^e 2° anno di coltivazione, convenzionale: 1° campionamento vs 2° campionamento, P<0.001

^{f,g} 2° anno di coltivazione, convenzionale: 3° campionamento vs 1° e 2° campionamento, P<0.001

^h 2° anno di coltivazione, integrato: 2° campionamento vs 1° campionamento, P<0.001

ⁱ 2° anno di coltivazione, integrato: 3° campionamento vs 2° campionamento, P<0.05

^l 2° anno di coltivazione, integrato: 3° campionamento vs 1° campionamento, P<0.001

^{m,n} 2° e 3° campionamento, 1° anno di coltivazione: integrato vs convenzionale, P<0.05

^{o,p} 2° e 3° campionamento, 2° anno di coltivazione: integrato vs convenzionale, P<0.001

Dalla tabella 4 registriamo variazioni significative dei livelli di vitamina C dovute alla stagionalità. Per la vitamina C sono stati trovati valori significativamente più alti per il prodotto integrato rispetto al convenzionale sia per il primo che per il secondo anno di coltivazione.

Tabella 5. Quantificazione della quercetina nella rucola.

Rucola	Quercetina (mg/100 gr) 1° anno di coltivazione			Quercetina (mg/100 gr) 2° anno di coltivazione		
	1°	2°	3°	1°	2°	3°
Convenzionale	3.26±0.44 ^{a,c}	0.83±0.57 ^{c,d}	2.50±0.43 ^d	1.89±1.29 ^g	7.74±2.51 ^{b,g}	3.31±0.53
Integrato	0.68±1.09 ^{a,e}	0.50±0.37 ^f	2.65±0.10 ^{e,f}	3.90±2.52	3.75±0.74 ^b	3.87±0.10

^a 1° campionamento, 1° anno di coltivazione: convenzionale vs integrato, P<0.01

^b 2° campionamento, 2° anno di coltivazione: convenzionale vs integrato, P<0.01

^c 1° anno di coltivazione, convenzionale: 1° campionamento vs 2° campionamento, P<0.01

^d 1° anno di coltivazione, convenzionale: 3° campionamento vs 2° campionamento, P<0.05

^{e,f} 1° anno di coltivazione, integrato: 3° campionamento vs 1° e 2° campionamento, P<0.05

^g 2° anno di coltivazione, convenzionale: 2° campionamento vs 1° campionamento, P<0.05

Per quanto concerne la quercetina (tabella 5), i risultati da noi ottenuti mostrano ampie variazioni nei due regimi di coltivazione. Tuttavia confrontando i dati con quelli riportati da Arabbi et al. (2004), dove il contenuto di quercetina quantificato era 13.9±0.1 mg/100g e con l' USDA Database 1 (2007), dove il range di livelli di quercetina nella rucola va da 0 mg/100g a 13.9 mg/100g, i nostri

risultati, con una concentrazione media di 6.95 mg/100g, si collocano all'interno di questo range.

In uno studio sulle differenti specie di rucola condotto da Martínez-Sánchez et al. (2007), attraverso studi di spettrometria di massa, sono stati isolati ed identificati nuovi e differenti glicosidi della quercetina mono- e di- acetilati. Secondo Bennet et al. (2006), la rucola in tutte le sue parti, eccetto nelle radici, contiene livelli significativi di flavonoidi poliglicosilati. Weckerle et al. (2001) hanno isolato dalle foglie di *Eruca Sativa* e caratterizzato tramite tecniche NMR tre nuovi glucopiranosidi della quercetina.

Tabella 6. Quantificazione della luteina nella rucola.

Rucola	Luteina (µg/gr) 1° anno di coltivazione			Luteina(µg/gr) 2° anno di coltivazione		
	1°	2°	3°	1°	2°	3
Convenzionale	46.53±9.3	54.48±19.7	51.45±12.1	45.53±8.4	52.48±18.6	50.45±10.2
Integrato	44.5±19.8	51.82±11.3	41.92±6.15	42.5±10.8	51.82±10.7	40.92±5.30

Nei livelli luteina (tabella 6) non si riscontrano differenze statisticamente significative tra il primo ed il secondo anno di attività e tra i due sistemi culturali.

Tabella 7. Valutazione delle proprietà antiossidanti e dei livelli dei singoli antiossidanti per la rucola biologica *versus* la rucola convenzionale.

Rucola	FRAP (mmolkg-1)	Vitamina C (mg/100g)	Quercetina (mg/100g)	Luteina (µg/gr)
Biologico	9.73±0.59 ^a	22.08±0.16 ^b	8.61±1.16 ^c	47.30±1.07 ^d
Convenzionale	7.04±0.12 ^a	29.32±4.02 ^b	3.21±0.84 ^c	52.80±0.28 ^d

^{a,c} biologico vs convenzionale P<0.01

^b convenzionale vs biologico P<0.05

^d convenzionale vs biologico P<0.001

Il campione biologico (tabella 7) mostra livelli significativamente più elevati di FRAP (P<0.01) e quercetina (P<0.01) rispetto al campione convenzionale che per contro mostra livelli significativamente più elevati (P<0.05 e P<0.001) rispettivamente di vitamina C e luteina.

Inoltre il campione biologico (tabella 7) presenta un valore FRAP (9.73 ± 0.59 mmolk g^{-1}) che si colloca nel range di valori ottenuti per i diversi regimi di coltivazione.

2.2.2 Valutazione del profilo degli antiossidanti e del potere antiossidante nella cicoria

La tabella 8 riporta i dati relativi al potere antiossidante. I valori ottenuti, particolarmente bassi nel primo anno di coltivazione, mostrano che il potenziale antiossidante della cicoria convenzionale è sempre statisticamente più elevato rispetto a quello della cicoria integrato nel primo anno di coltivazione. Notiamo, inoltre, un'influenza della stagionalità sul potere antiossidante: i risultati sono significativamente maggiori nel periodo di piena crescita della cicoria rispetto al periodo tardivo di raccolta.

Tabella 8. Valori FRAP nella cicoria.

Cicoria	FRAP(mmolk g^{-1}) 1° anno di coltivazione			FRAP (mmolk g^{-1}) 2° anno di coltivazione		
	1°	2°	3°	1°	2°	3°
Convenzionale	$2.23 \pm 0.14^{a,g,h}$	$1.02 \pm 0.08^{b,g}$	$1.00 \pm 0.11^{c,h}$	$1.58 \pm 0.12^{d,m,n}$	$0.624 \pm 0.05^{e,m,o}$	$0.326 \pm 0.04^{f,n,o}$
Integrato	$0.92 \pm 0.04^{a,i,l}$	$0.58 \pm 0.04^{b,i}$	$0.49 \pm 0.04^{c,l}$	$1.19 \pm 0.08^{d,p,q}$	$0.871 \pm 0.06^{e,p,r}$	$0.429 \pm 0.02^{f,q,r}$

^a 1° campionamento, 1° anno di coltivazione: convenzionale vs integrato, $P < 0.001$

^{b,c} 2° e 3° campionamento, 1° anno di coltivazione: convenzionale vs integrato, $P < 0.05$

^d 1° campionamento, 2° anno di coltivazione: convenzionale vs integrato, $P < 0.01$

^e 2° campionamento, 2° anno di coltivazione: integrato vs convenzionale, $P < 0.01$

^f 3° campionamento, 2° anno di coltivazione: integrato vs convenzionale, $P < 0.05$

^{g,h,i,l} 1° anno di coltivazione: 1° campionamento vs 2° e 3° campionamento, $P < 0.001$

^{m,n} 2° anno di coltivazione, convenzionale: 1° campionamento vs 2° e 3° campionamento, $P < 0.001$

^o 2° anno di coltivazione, convenzionale: 2° campionamento vs 3° campionamento, $P < 0.01$

^p 2° anno di coltivazione, integrato: 1° campionamento vs 2° campionamento, $P < 0.01$

^q 2° anno di coltivazione, integrato: 1° campionamento vs 3° campionamento, $P < 0.001$

^r 2° anno di coltivazione, integrato: 2° campionamento vs 3° campionamento, $P < 0.001$

Dall'analisi dei campioni di cicoria pan di zucchero ottenuti nel secondo anno di coltivazione registriamo un valore significativamente più alto del prodotto convenzionale solo nel primo campionamento ($P < 0.01$). Anche nel secondo anno di coltivazione si nota una forte influenza della stagionalità sulla capacità

antiossidante: notiamo una forte diminuzione delle proprietà antiossidanti allontanandoci dal periodo di piena crescita.

I livelli dei singoli antiossidanti seguono lo stesso andamento mostrando dei livelli bassi rispetto ai valori normalmente riportati in letteratura. Le tabelle 9, 10, 11 e 12 riportano i bassi livelli riscontrati nel contenuto dei singoli antiossidanti.

Tabella 9. Determinazione di acido caffeico e acido clorogenico nella cicoria.

Cicoria	Ac. Clorogenico (mg/100 gr)	Ac. Caffeico (mg/100 gr)	Campionamenti
Convenzionale	0.28±0.03	0.37±0.08	1° campionamento
Integrato	0.22±0.10	0.40±0.22	1° anno di coltivazione
Convenzionale	0.27±0.02	0.34±0.60	2° campionamento
Integrato	0.21±0.11	0.20±0.50	1° anno di coltivazione
Convenzionale	0.28±0.01	0.44±0.07	3° campionamento
Integrato	0.21±0.02	0.18±0.04	1° anno di coltivazione
Convenzionale	0.34±0.05	0.33±0.01 ^{a,b}	1° campionamento
Integrato	0.21±0.01	0.31±0.02 ^{c,d}	2° anno di coltivazione
Convenzionale	0.20±0.11	0.18±0.05 ^a	2° campionamento
Integrato	0.22±0.10	0.20±0.04 ^c	2° anno di coltivazione
Convenzionale	0.20±0.04	0.15±0.05 ^b	3° campionamento
Integrato	0.21±0.02	0.18±0.04 ^d	2° anno di coltivazione

^{a,c} 2° anno di coltivazione, Ac. Caffeico: 1° campionamento vs 2° campionamento, P<0.05

^b 2° anno di coltivazione, convenzionale, Ac. Caffeico: 1° campionamento vs 3° campionamento, P<0.01

^d 2° anno di coltivazione, integrato, Ac. Caffeico: 1° campionamento vs 3° campionamento, P<0.05

Tabella 10. Determinazione del contenuto di Vitamina C nella cicoria.

Cicoria	Vitamina C (mg/100 gr) 1° anno di coltivazione			Vitamina C (mg/100 gr) 2° anno di coltivazione		
	1°	2°	3°	1°	2°	3°
Convenzionale	10.10±1.10 ^{a,d}	9.41±1.41 ^{b,e}	5.89±0.51 ^{d,e}	5.63±0.04 ^c	2.76±0.84	3.90±1.47
Integrato	5.24±0.25 ^{a,f,g}	3.08±0.16 ^{b,f,h}	6.77±0.71 ^{g,h}	2.77±0.23 ^{c,i,l}	3.60±0.37 ^l	2.06±0.01 ⁱ

^{a,b} 1° e 2° campionamento, 1° anno di coltivazione: convenzionale vs integrato, P<0.01

^c 1° campionamento, 2° anno di coltivazione: convenzionale vs integrato, P<0.001

^d 1° anno di coltivazione, convenzionale: 1° campionamento vs 3° campionamento, P<0.01

^e 1° anno di coltivazione, convenzionale: 2° campionamento vs 3° campionamento, P<0.05

^f 1° anno di coltivazione, integrato: 1° campionamento vs 2° campionamento, P<0.01

^g 1° anno di coltivazione, integrato: 3° campionamento vs 1° campionamento, P<0.05

^h 1° anno di coltivazione, integrato: 3° campionamento vs 2° campionamento, P<0.001

ⁱ 2° anno di coltivazione, integrato: 1° campionamento vs 3° campionamento, P<0.05

^l 2° anno di coltivazione, integrato: 2° campionamento vs 1° campionamento, P<0.05

^m 2° anno di coltivazione, integrato: 2° campionamento vs 3° campionamento, P<0.001

Tabella 11. Determinazione del contenuto dei luteina nella cicoria.

Cicoria	Luteina (µg/gr) <i>1° anno di coltivazione</i>			Luteina (µg/gr) <i>2° anno di coltivazione</i>		
	1°	2°	3°	1°	2°	3°
Convenzionale	6.14±1.36 ^{a,b,c}	1.98±1.32 ^b	1.46±0.09 ^c	5.16±1.42 ^{d,e}	1.88±1.22 ^d	1.86±0.09 ^e
Integrato	2.16±0.83 ^a	2.72±1.64	2.02±1.32	2.56±0.93	2.32±1.54	1.98±1.14

^a 1° campionamento, 1° anno di coltivazione: convenzionale vs integrato, P<0.05

^b 1° anno di coltivazione, convenzionale: 1° campionamento vs 2°campionamento, P<0.05

^c 1° anno di coltivazione, convenzionale: 1° campionamento vs 3°campionamento, P<0.01

^{d,e} 2° anno di coltivazione, convenzionale: 1° campionamento vs 2° e 3°campionamento, P<0.05

Tabella 12. Valutazione delle proprietà antiossidanti e dei livelli dei singoli antiossidanti per la cicoria biologica versus cicoria convenzionale.

Cicoria	FRAP (mmolkg-1)	Vitamina C (mg/100g)	Ac. Caffeico (mg/100g)	Ac.Clorogenico (mg/100g)	Luteina (µg/gr)
Biologico	1.15±0.09	4.89±0.06	0.38±0.02	1.11±0.02 ^a	5.14±3.96
Convenzionale	1.19±0.25	4.53±0.20	0.36±0.03	0.38±0.01 ^a	5.23±1.34

^a Biologico versus Convenzionale P < 0.001

Non sono presenti differenze significative tra il due sistemi colturali eccetto che per il contenuto di acido clorogenico più elevato nel campione biologico (P<0.001).

2.2.3 Valutazione del profilo degli antiossidanti e del potere antiossidante nella lattuga

La tabella 13 riporta le proprietà antiossidanti per la lattuga riscontrate nel primo e nel secondo anno di coltivazione.

Tabella 13. Valori FRAP nella lattuga.

Lattuga	FRAP (mmolkg⁻¹) <i>1° anno di coltivazione</i>			FRAP (mmolkg⁻¹) <i>2° anno di coltivazione</i>		
	1°	2°	3°	1°	2°	3°
Biologico	5.33±0.35 ^{e,f}	6.35±0.08 ^{a,f,g}	3.26±0.15 ^{b,e,g}	1.85±0.05 ^{h,i}	1.55±0.00 ^{c,i}	3.82±0.54 ^{d,h}
Convenzionale	4.83±0.16	1.8±0.04 ^a				
Integrato			1.30±0.06 ^b	1.92±0.19 ^{l,m}	2.72±0.22 ^{c,m}	2.73±0.32 ^{d,l}

^a 2° Campionamento, 1° anno di coltivazione: biologico vs convenzionale P <0.001

^b 3° Campionamento, 1° anno di coltivazione: biologico vs integrato P<0.001

^c 2° Campionamento, 2° anno di coltivazione: integrato vs biologico, P<0.001

^d 3° Campionamento, 2° anno di coltivazione: biologico vs integrato, P <0.05

^e 1° anno di coltivazione, biologico, 1° campionamento vs 3°campionamento, P<0.01

^f 1° anno di coltivazione, biologico, 2° campionamento vs 1°campionamento, P<0.01

^g 1° anno di coltivazione, biologico, 2° campionamento vs 3°campionamento, P<0.001

^h 2° anno di coltivazione, biologico, 3° campionamento vs 1° campionamento, P<0.001

ⁱ 2° anno di coltivazione, biologico, 3° campionamento vs 2° campionamento, P<0.001

^l 2° anno di coltivazione, integrato, 3° campionamento vs 1° campionamento, P<0.05

^m 2° anno di coltivazione, integrato, 2° campionamento vs 1° campionamento, P<0.05

Dallo studio della Pellegrini et al. (2003), il valore FRAP per la lattuga verde è risultato essere 4.94 mmol Fe²/kg p.s. Nel primo anno sono state evidenziate differenze tra prodotto convenzionale e biologico (P<0.001) (2° campionamento) e tra prodotto biologico e integrato (P<0.001) (3° campionamento). Nel secondo anno sono risultate significative le differenze tra prodotto biologico ed integrato per il secondo (P<0.001) e terzo campionamento (P<0.05).

Di seguito si riportano i livelli riscontrati per i singoli polifenoli (tabella 14a e 14b):

Tabella 14a. Determinazione del contenuto di acido caffeico, acido clorogenico, rutina e quercetina nei campioni di lattuga del 1°anno di coltivazione.

Lattuga	Ac.Clorogenico (mg/100 gr)	Ac. Caffeico (mg/100 gr)	Rutina (mg/100gr)	Quercetina (mg/100gr)	Campionamenti
Biologico	15.93±1.59 ^e	7.59±2.66 ^g	17.51±1.96	0.99±0.32 ^c	1°campionamento 1°anno di coltivazione
Convenzionale	22.24±7.74	4.87±0.53	24.50±12.08	6.84±1.53 ^c	
Biologico	16.93±1.60 ^f	6.59±2.78 ^h	18.51±1.98	1.10±0.31 ^d	2°campionamento 1°anno di coltivazione
Convenzionale	21.24±6.73	3.87±0.43	23.50±10.08	5.83±1.10 ^d	
Biologico	0.87±0.23 ^{a,e,f}	0.73±0.05 ^{b,g,h}	n.d.	n.d.	3°campionamento 1°anno di coltivazione
Integrato	0.35±0.05 ^a	0.11±0.02 ^b	15.50±2.46	1.21±0.05	

^a 3° campionamento, 1° anno di coltivazione, Ac. Clorogenico: biologico vs integrato, P<0.05

^b 3° campionamento, 1° anno di coltivazione, Ac. Caffeico: biologico vs integrato, P<0.001

^{c,d} 1° e 2° campionamento, 1° anno di coltivazione, Quercetina: convenzionale vs biologico, P<0.01

^e 1° anno di coltivazione, biologico, Ac. Clorogenico : 1° campionamento vs 3° campionamento, P<0.001

^f 1° anno di coltivazione, biologico, Ac. Clorogenico : 2° campionamento vs 3° campionamento, P<0.001

^g 1° anno di coltivazione, biologico, Ac. Caffeico : 1° campionamento vs 3° campionamento, P<0.001

^h 1° anno di coltivazione, biologico, Ac. Caffeico : 2° campionamento vs 3° campionamento, P<0.001

Tabella 14b. Determinazione del contenuto di acido caffeico, acido clorogenico, rutina e quercetina nei campioni di lattuga del 2°anno di coltivazione.

Prodotto Lattuga	Ac. Clorogenico (mg/100 gr)	Ac. Caffeico (mg/100 gr)	Rutina (mg/100gr)	Quercetina (mg/100gr)	Campionamenti
Biologico	n.d.	0.07±0.01 ^a	15.50±0.21 ^c	1.00±0.62	1°campionamento 2°anno di coltivazione
Integrato	0.17±0.06	0.36±0.03 ^{a,g}	11.67±0.92 ^c	0.79±0.14	
Biologico	n.d.	0.07±0.01 ^b	15.50±0.21 ^d	1.00±0.72 ^e	2°campionamento 2°anno di coltivazione
Integrato	0.24±0.05 ^f	0.21±0.03 ^{b,g}	6.89±0.82 ^{d,h}	0.23±0.12 ^e	
Biologico	0.54±0.19	0.54±0.38	30.25±12.53	0.99±0.29	3°campionamento 2°anno di coltivazione
Integrato	0.37±0.08 ^f	0.24±0.08	20.78±8.03 ^h	0.79±0.37	

^a 1° campionamento, 2° anno di coltivazione, Ac. Caffeico: integrato vs biologico, P<0.001

^b 2° campionamento, 2° anno di coltivazione, Ac. Caffeico: integrato vs biologico, P<0.01

^c 1° campionamento, 2° anno di coltivazione, Rutina: biologico vs integrato, P<0.01

^d 2° campionamento, 2° anno di coltivazione, Rutina: biologico vs integrato, P<0.001

^e 2° campionamento, 2° anno di coltivazione, Quercetina: biologico vs integrato, P<0.01

^f 2° anno di coltivazione, integrato, Ac. Clorogenico : 3° campionamento vs 1° campionamento, P<0.05

^g 2° anno di coltivazione, integrato, Ac. Caffeico : 1° campionamento vs 2° campionamento, P<0.05

^h 2° anno di coltivazione, integrato, Rutina : 3° campionamento vs 2° campionamento, P<0.05

Nel lavoro di Arabbi et al. (2004), i principali flavonoidi identificati nella lattuga sono i glicosidi della quercetina. I risultati riscontrati nella lattuga non mostrano nel primo anno di coltivazione differenze significative nei livelli di rutina tra le

varie pratiche agronomiche, mentre nel secondo anno di coltivazione i livelli di rutina risultano più elevati nella coltura biologica vs quella integrata.

Tabella 15. Determinazione del contenuto di Vitamina C nella lattuga.

Lattuga	Vitamina C (mg/100 gr) 1° anno di coltivazione			Vitamina C (mg/100 gr) 2° anno di coltivazione		
	1°	2°	3°	1°	2°	3°
Biologico	6.39±0.54 ^d	15.67±2.61 ^{a,d,e}	13.28±0.59 ^{b,e}	4.57±0.45 ^f	6.51±0.18 ^{c,f}	5.45±1.12
Convenzionale	6.6±0.76	4.69±1.12 ^a				
Integrato			5.23±0.81 ^b	3.17±1.19	3.10±0.31 ^c	4.31±1.52

^a 2° campionamento, 1° anno di coltivazione, biologico vs convenzionale, P<0.01

^b 3° campionamento, 1° anno di coltivazione, biologico vs integrato, P<0.001

^c 2° campionamento, 2° anno di coltivazione, biologico vs integrato, P<0.001

^d 1° anno di coltivazione, biologico: 2° campionamento vs 1° campionamento, P<0.001

^e 1° anno di coltivazione, biologico: 3° campionamento vs 1° campionamento, P<0.01

^f 2° anno di coltivazione, biologico: 2° campionamento vs 1° campionamento, P<0.05

I valori di vitamina C per la lattuga secondo regime biologico sono più alti, sia rispetto la coltivazione convenzionale (2° campionamento, 1° anno di coltivazione P<0.01) sia integrata (3° campionamento, 1° anno di coltivazione P<0.001 e 2° campionamento, 2° anno di coltivazione P<0.001). I valori di vitamina C sono più bassi per il secondo anno di coltivazione rispecchiando i valori ottenuti per il FRAP. Dal lavoro di Nicolle et al. (2004), i livelli di vitamina C variano da 6.1 a 9.9 mg/100g di prodotto fresco.

Tabella 16. Determinazione del contenuto di Luteina e β -Carotene nella lattuga.

Lattuga	Luteina ($\mu\text{g/g}$)	β -Carotene ($\mu\text{g/g}$)	Campionamenti
Biologico	12.7±3.6 ^a	27.17±6.90	1°campionamento 1°anno di coltivazione
Convenzionale	6.24±1.64 ^a	35.28±7.86	
Biologico	25.29±6.90 ^b	53.56±0.00 ^c	2°campionamento 1°anno di coltivazione
Convenzionale	9.30±2.72 ^b	27.71±5.96 ^c	
Biologico	13.17±5.9	22.89±18.9	3°campionamento 1°anno di coltivazione
Integrato	8.80±3.23	32.95±16.98	
Biologico	4.78±2.61	13.91±1.09	1°campionamento 2°anno di coltivazione
Integrato	1.80±0.48	n.d.	
Biologico	7.57±2.61	36.91±8.71	2°campionamento 2°anno di coltivazione
Integrato	4.58±0.68	30.73±0.00	
Biologico	6.27±1.62	26.91±4.71	3°campionamento 2°anno di coltivazione
Integrato	4.08±0.64	20.73±0.00	

^{a,b} 1° e 2° campionamento, 1° anno di coltivazione, luteina, biologico vs convenzionale, P<0.05

^c 2° campionamento, 1° anno di coltivazione, β -carotene biologico vs convenzionale, P<0.01

I valori di luteina sono significativamente più alti per la lattuga biologica nel 1° e 2° campionamento del 1° anno di coltivazione ($P < 0.05$).

2.2.4 Effetto degli estratti polifenolici sulla vitalità cellulare

Per valutare l'effetto citotossico degli estratti polifenolici derivati dagli alimenti selezionati su cellule tipo CaCO₂ sono stati eseguiti esperimenti preliminari mediante il test MTT. Come mostrato nelle figure 1, 2 e 3 gli estratti hanno causato una riduzione della vitalità cellulare solo alle due concentrazioni più alte utilizzate (50 e 100 ml/l) portandola a valori compresi tra il 10% e il 70%. Per quanto riguarda il tipo di orticola, i campioni di cicoria sembrano mostrare una maggiore citotossicità. Infatti tutti i campioni di cicoria alla concentrazione 100ml/l portano la vitalità a valori al di sotto del 10%. Per quanto riguarda la modalità di coltivazione o il periodo di raccolta, non si osservano correlazioni con la citotossicità nel caso dei campioni di rucola. Una maggiore citotossicità può invece essere osservata nel caso dei campioni di lattuga e di cicoria coltivati in modalità convenzionale o integrata, e raccolti nei periodi più avanzati dell'anno.

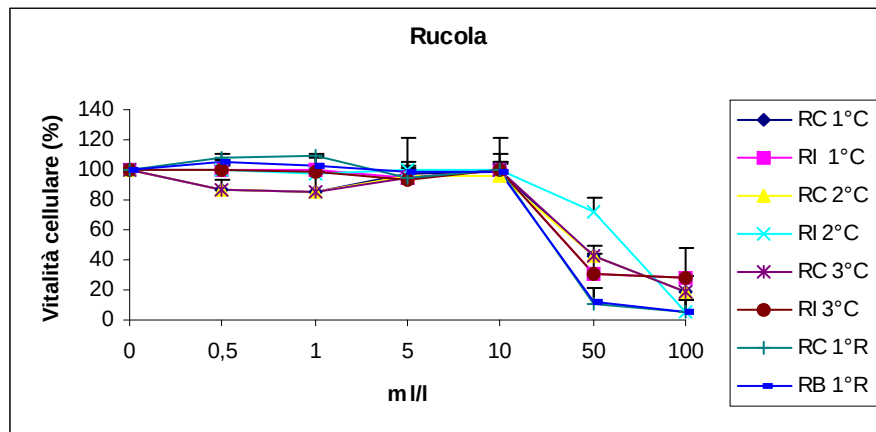


Figura 1. Effetto degli estratti di rucola sulla vitalità cellulare delle cellule CaCo-2.

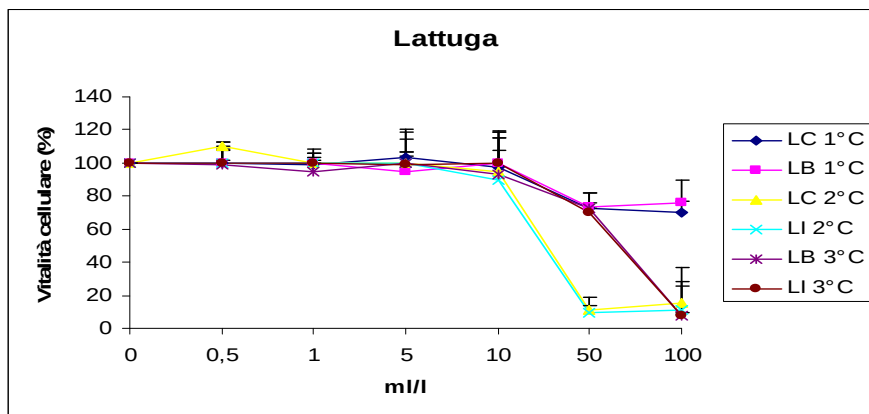


Figura 2. Effetto degli estratti di lattuga sulla vitalità cellulare delle cellule CaCo-2.

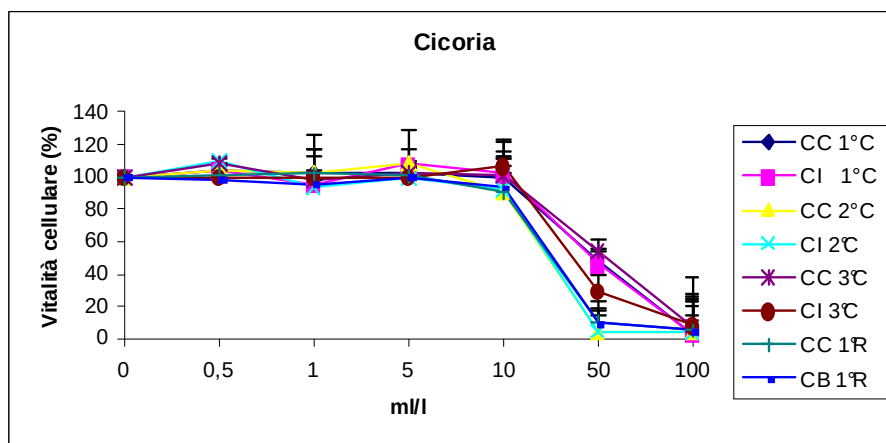


Figura 3. Effetto degli estratti di cicoria sulla vitalità cellulare delle cellule CaCo-2.

2.2.5 Effetto antiproliferativo degli estratti polifenolici: immunomarcatura della Bromodeossiuridina (BrdU) e analisi in citometria a flusso

L'incorporazione di BrdU, in campioni di cellule trattate, è indice della distribuzione delle cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare e quindi della valutazione dello stato proliferativo delle cellule.

I risultati hanno mostrato una riduzione dell'incorporazione della BrdU, rilevando che il potenziale antiproliferativo di estratti di vegetali alimentari nei confronti di cellule neoplasiche in coltura può essere dipendente dalle specie vegetali e dalle condizioni di coltivazione.

Mentre i campioni di cicoria non hanno mostrato alcun effetto significativo sul ciclo cellulare, tutti i campioni di rucola, indipendentemente dalla modalità di coltivazione o dal periodo di raccolta, alla concentrazione 10ml/l hanno determinato un significativo accumulo di cellule in fase G1 con conseguente riduzione di cellule in fase S e G2/M (figura 4) (inibiscono cioè la proliferazione delle cellule in fase neoplastica).

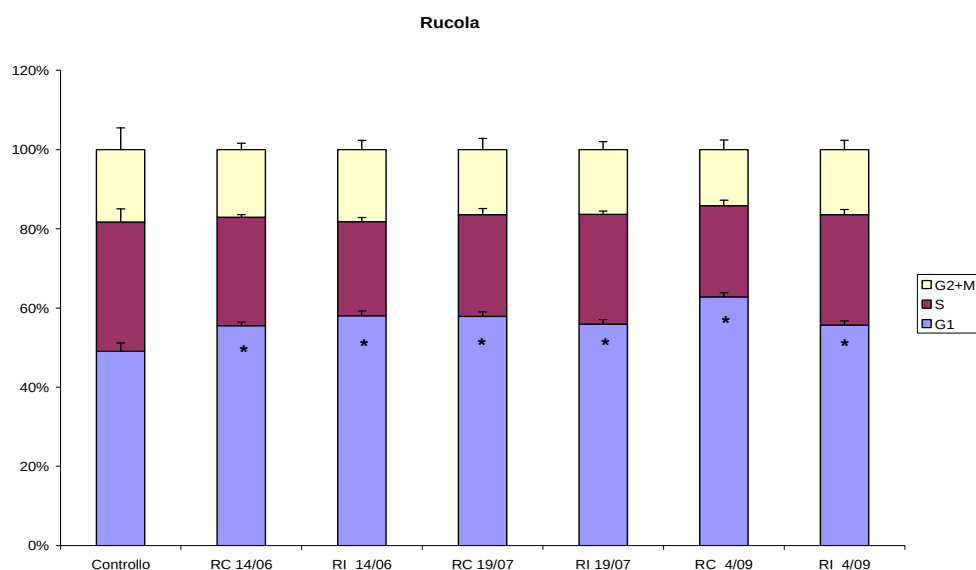


Figura 4. Effetto degli estratti di rucola sulla distribuzione del ciclo cellulare.

Ciò ha come conseguenza una riduzione di incorporazione della BrdU delle cellule in fase S come dimostrato dalla valutazione quantitativa dell'immunofluorescenza della BrdU nelle cellule trattate con i vari estratti di rucola alla concentrazione 10ml/L (figura 5).

.

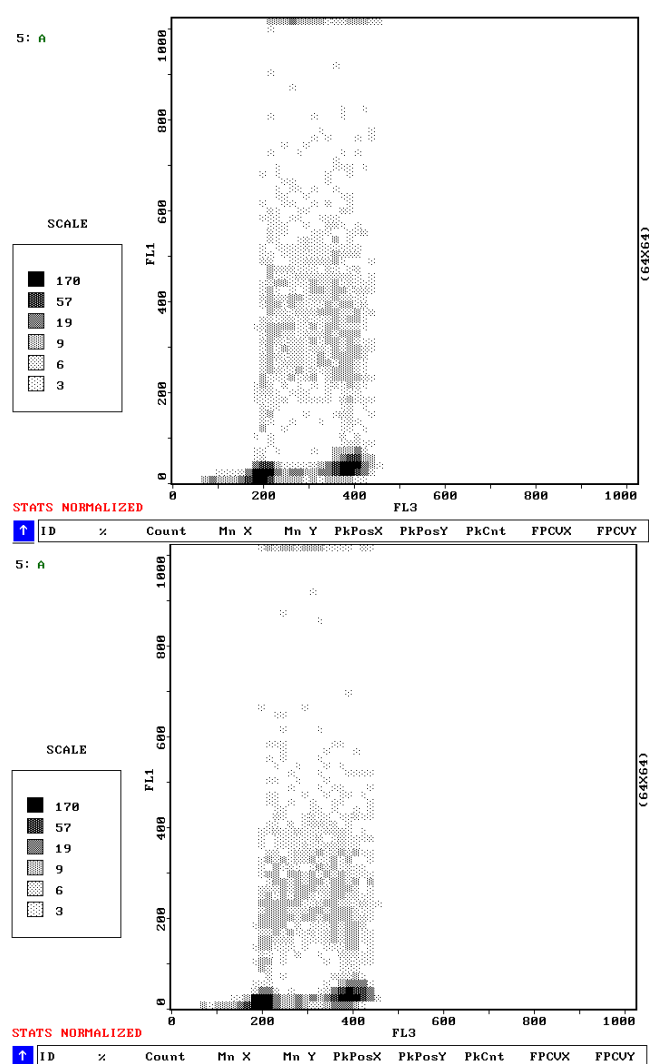


Figura 5. Incorporazione of BrdU in cellule di controllo e cellule trattate con estratto di rucola.

I campioni di lattuga, che pure hanno mostrato un effetto simile a quello esercitato dai campioni di rucola sulla distribuzione delle Caco-2 nelle varie fasi del ciclo, non hanno invece raggiunto la significatività statistica. Per quanto riguarda però l'analisi quantitativa di BrdU, i campioni di lattuga a coltivazione convenzionale e biologica del 1° campionamento del 1° anno di coltivazione e quello a coltivazione biologica del 3° campionamento del 1° anno di coltivazione hanno determinato una riduzione significativa nell'incorporazione di BrdU.

2.3.0 Conclusioni

I risultati ottenuti mostrano che il sistema colturale (biologico, convenzionale e integrato) e il tipo di coltivazione (pieno campo, serra) influenzano la qualità nutrizionale di un alimento. A queste si deve aggiungere l'effetto non trascurabile delle condizioni pedo-climatiche.

I risultati ottenuti indicano come rucola, lattuga e cicoria, da un punto di vista industriale, potrebbero rappresentare una interessante ed economica fonte di estratti polifenolici. Inoltre potrebbero essere utilizzati in campagne di salute pubblica finalizzate ad incrementare il consumo di vegetali per contribuire alla prevenzione di malattie croniche.

3.0.0 Linea di Ricerca 2

3.0.1 Introduzione

Il pomodoro, uno dei prodotti ortofrutticoli maggiormente consumati, grazie al suo profilo nutrizionale peculiare rappresenta una delle principali fonti di vitamine.

I pomodori sono ricchi di vitamina C e di alcuni componenti minori dotati di attività antiossidante: carotenoidi e composti fenolici. A tali molecole è stata attribuita una specifica azione di protezione nei confronti di alcune patologie croniche.

Nell'alimentazione, i pomodori rappresentano la principale fonte di licopene, che appartiene alla famiglia dei carotenoidi e possiede proprietà antiossidanti e anticancerogene.

In questi ultimi anni, gli antiossidanti naturalmente presenti nelle materie prime vegetali sono stati oggetto di numerose ricerche; tali composti, privi di valore nutrizionale, esplicano nell'uomo un'importante attività antiossidante contrastando l'azione di composti chimici particolarmente reattivi come i radicali liberi il cui accumulo è alla base dei fenomeni degenerativi delle cellule e quindi dell'invecchiamento cellulare. A tali composti è stata inoltre attribuita una potenziale attività anticancerogena.

3.0.2 Obiettivi

Obiettivo di questo studio è stato di valutare l'influenza di differenti pratiche agronomiche (biologico vs convenzionale) sulla qualità nutrizionale di pomodori coltivati secondo le stesse condizioni di crescita durante due anni di coltivazione. La nostra attenzione è stata focalizzata sulla valutazione dell'influenza del metodo di coltivazione e del periodo di campionamento sulla qualità nutrizionale attraverso la determinazione del contenuto di flavonoidi, acidi idrossicinnamici e carotenoidi e la valutazione dell'Attività Antiossidante Totale e il danno cellulare (misurato tramite la valutazione del Trans Epithelial Electrical Resistance -TEER e la determinazione dell'analisi istologica). In quest'ottica abbiamo cercato di

capire e spiegare il ruolo del pomodoro come “cibo funzionale” nella protezione della salute umana.

3.1.0 Materiale e Metodi

3.1.1 Campionamento

Cultivar di pomodoro Perfectpeel sono stati forniti dall’Azienda Stuard (Parma, Italia). I prodotti biologici e convenzionali sono stati coltivati nelle stesse condizioni di crescita in un’area di coltivazione a pieno campo: stagione, luogo, grado di maturazione e età della pianta. La tipologia del terreno era argillosa. La coltivazione biologica e convenzionale è stata condotta in due distinti appezzamenti. Il grado di maturazione delle bacche era del 100%. Inoltre, sono stati considerati i dati sulle temperature, sulle relative umidità e l’esposizione alla luce solare.

Per l’analisi quantitativa sono state usate bacche di pomodoro provenienti da ogni trattamento. I campioni sono stati omogenizzati in un Waring blender. Tre replicati erano preparati per ogni campione. Le analisi dei carotenoidi, vitamina C, polifenoli ed attività antiossidante sono state eseguite subito dopo l’estrazione.

3.1.2 Quantificazione dei carotenoidi

Per la descrizione delle metodologie per la determinazione dei carotenoidi si rimanda alla descrizione riportata nella sezione 2.1.2.

3.1.3 Quantificazione dei polifenoli

Per la descrizione delle metodologie per la determinazione dei polifenoli si rimanda alla descrizione riportata nella sezione 2.1.3.

3.1.4 Quantificazione della vitamina C

Per la descrizione delle metodologie per la determinazione della vitamina C si rimanda alla descrizione riportata nella sezione 2.1.4.

3.1.5 Misura del potere Antiossidante Totale TEAC-Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay

L'analisi TEAC è stata effettuata su estratti ottenuti secondo la metodica riportata nella sezione 2.1.5. Il metodo TEAC è stato descritto originariamente da Miller et al. (1993). Re e colleghi (1999) hanno migliorato il metodo TEAC mediante l'uso del cromoforo ABTS^{•+} preformato. L'introduzione di questo catione in una soluzione etanolica, permette così la determinazione sia degli antiossidanti liposolubili e sia degli antiossidanti idrosolubili presenti nella matrice alimentare. Il metodo TEAC è semplice, attendibile e adatto per la valutazione della capacità da estratti da alimento. Il principio del metodo si basa sul fatto che l'attività antiossidante di una sostanza si può valutare come l'abilità di catturare radicali liberi o di inibire la loro formazione. Le letture vengono effettuate utilizzando uno spettrofotometro termostato a 30°C ad una lunghezza d'onda di massimo assorbimento (734 nm) per 10 minuti ad intervalli di 30 secondi. L'attività antiossidante del campione è stata calcolata usando la curva standard di calibrazione. IL valore del TEAC è espresso come mmolTrolox/Kg.

3.1.6 Misura del potere riducente totale FRAP-Ferric Reducing Antioxidant Power

Per la descrizione delle metodologie per la determinazione del potere riducente totale si rimanda alla descrizione riportata nella sezione 2.1.5.

3.1.7 Modelli cellulari- Cambiamenti morfologici dell'epitelio cellulare mediante la misura del potenziale trans-epiteliale

L'estratto polifenolico idrolizzato ottenuto dal pomodoro è stato preventivamente portato a secco e quindi solubilizzato nel mezzo di coltura con l'aggiunta di una concentrazione in sali biliari (0.5 mg/ml). Sono state effettuate una serie di diluizioni operative ottenendo una serie di concentrazioni crescenti di polifenoli nel mezzo da 2 a 17 µmoli.

Il mezzo di coltura che è stato usato è il Dulbecco (DMEM) contenete 25mM di glucosio e 3.7 g/l NaHCO₃ e ulteriormente supplementato con 4mM di L-

glutamina, 10% di siero fetale bovino, 1% aminoacidi non essenziali, 1×10^5 U/l penicillina e 100 ug/l di streptomycin. Le cellule sono state incubate a 37°C con un'umidità del 90%, in una atmosfera al 95% di O₂ e 5% CO₂. Il mezzo di coltura è stato cambiato 3 volte alla settimana fino a confluenza ed alla relativa differenziazione cellulare che richiede circa 14-18 giorni.

La confluenza e la differenziazione delle colture è monitorata dalla misura del potenziale elettrico fra il compartimento apicale e il compartimento basolaterale (trans-epitelial electrical resistance) (Grasset al. 1984), con controlli estemporanei tramite l'osservazione giornaliera con il microscopio invertito (Diavert, Leitz Germany).

Il monostrato di cellule differenziate è stato trattato con il mezzo contenente le diverse concentrazioni dell'estratto polifenolico idrolizzato, il tutto in quadruplo. L'esperimento ha avuto una durata di tre ore per far rientrare nel tempo più di un intero ciclo metabolico delle stesse cellule e calcolare il trasporto e l'assorbimento delle stesse molecole. Le misure delle resistenze transepiteliali hanno avuto una cadenza di trenta minuti. Alla fine delle tre ore è stato condotto il saggio del rosso fenolo per valutare la tenuta delle giunzioni strette e quindi l'eventuale danno cellulare riscontrabile tramite l'analisi istologica del campione.

La permeabilità apparente è stata calcolata riferendosi a una curva standard di concentrazioni di rosso fenolo crescenti rilevate tramite spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 560 nm.

$$P_{app}(\text{cm s}^{-1}) = C_t \times V_{bl} / \Delta_t \times C_o \times A$$

C_t = concentrazione rosso fenolo in Baso laterale (mM) letta allo spettrofotometro

$$V_{bl}=0,250 \text{ cm}^3$$

$$\Delta_t=(3600 \text{ secondi})$$

C_o =concentrazione rosso fenolo apicale (1 mM)

$$A=\text{Area filtri } (0,33 \text{ cm}^2)$$

In figura 6 si riporta una visione schematica del modello sperimentale.

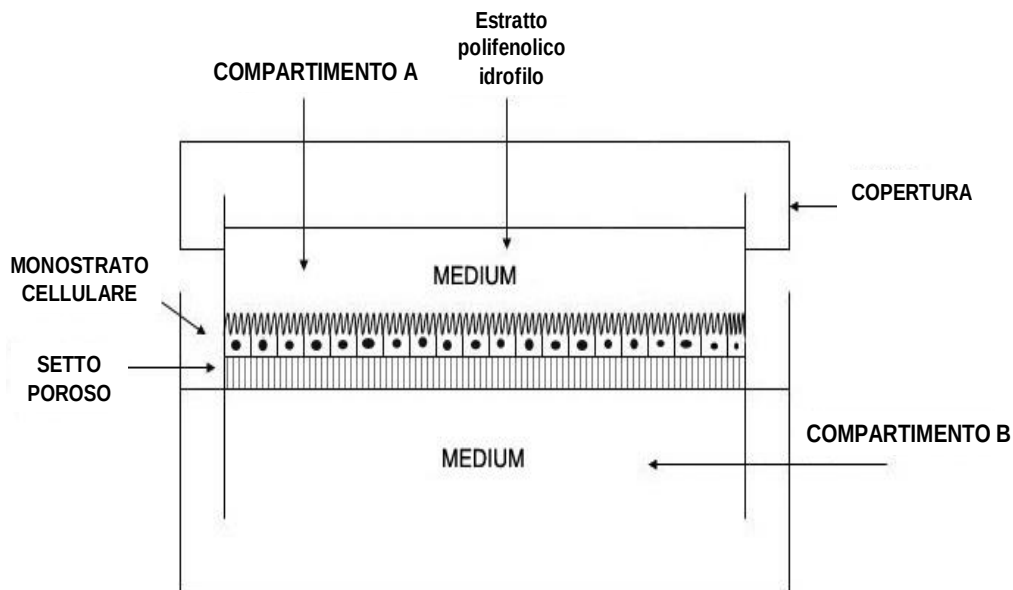


Figura 6. Visione schematica del sistema colture-cellulare Caco2 (multiwell)

3.1.8 Per la descrizione della metodica di analisi statistica utilizzata si rimanda alla descrizione riportata nella sezione 2.1.8.

3.2.0 Risultati

3.2.1 Molecole bioattive

La nostra ricerca è stata condotta per valutare l'influenza di specifiche tecniche agronomiche per migliorare il contenuto di molecole bioattive e così incrementare il valore nutrizionale del pomodoro. La scelta di un'appropriata tecnica agronomica e di fattori pre- e post-raccolta sembra essere cruciale nella caratterizzazione del valore nutrizionale e del contenuto antiossidante di pomodori freschi. In questo studio noi abbiamo monitorato il contenuto di antiossidanti nei pomodori coltivati secondo un sistema biologico e convenzionale durante due anni di coltivazione.

Tabella 17. Confronto tra il primo e il secondo anno di coltivazione del pomodoro. Valore medio (mg/Kg) and sd dei composti bioattivi antiossidanti.

Molecole Bioattive	Biologico			Convenzionale		
	I anno	II anno	P value	I anno	II anno	P value
Vitamina C	177.3 ± 14.1 ^a	353.0 ± 10.0 ^b	P<0.001	202.9 ± 14.9 ^a	280.0 ± 9.90 ^b	P<0.001
Licopene	21.3 ± 4.5	12.2 ± 3.0	P<0.001	24.0 ± 5.0	17.7 ± 5.0	P<0.001
B-carotene	6.1 ± 0.9 ^c	2.5 ± 1.1	P<0.001	4.7 ± 1.2 ^c	1.88 ± 1.1	P<0.001
Acido Clorogenico	2.82 ± 0.92	4.04 ± 0.57	P<0.007	3.52 ± 0.74	4.25 ± 0.22	n.s.
Acido Cumarico	3.35 ± 0.48 ^d	1.39 ± 0.21	P<0.001	2.79 ± 0.42 ^d	1.70 ± 0.47	P<0.001
Acido Caffeico	3.29 ± 0.33	5.03 ± 0.17	P<0.001	3.61 ± 0.71	4.85 ± 0.98	P<0.01
Naringenina	41.52 ± 17.71	59.4 ± 7.95 ^e	P<0.005	34.56 ± 11.16	40.2 ± 9.23 ^e	n.s.
Rutina	36.66 ± 17.72	45.9 ± 5.84 ^f	n.s.	37.06 ± 6.68	23.2 ± 7.73 ^f	n.s.
Quercetina	17.92 ± 10.95 ^g	17.8 ± 1.48 ^h	n.s.	33.90 ± 6.31 ^g	8.72 ± 2.18 ^h	P<0.001

^a Convenzionale versus Biologico P<0.05

^b Biologico versus Convenzionale P < 0.001

^c Biologico versus Convenzionale P<0.05

^d Biologico versus Convenzionale P<0.05

^e Biologico versus Convenzionale P<0.05

^f Biologico versus Convenzionale P<0.05

^g Convenzionale versus Biologico P<0.001

^h Biologico versus Convenzionale P<0.05

In tabella 17 è mostrato il contenuto di licopene e β -carotene (mg/kg), vitamina C (mg/Kg), acidi idrossicinnamici (acido clorogenico, acido cumarico e acido caffeico) (mg/kg), flavonoidi (quercetina, rutina, naringenina) (mg/kg) distribuiti secondo anno e pratiche di coltivazione. Il contenuto di vitamina C, nel primo anno di coltivazione, era significativamente più alto nel pomodoro convenzionale rispetto al pomodoro biologico (convenzionale 202.9±14.9 mg/Kg vs biologico 177.3±14.1 mg/Kg, P<0.05), mentre un trend inverso è stato riportato per il secondo anno di coltivazione (biologico 353.0 ± 10.0 mg/kg versus 280.0 ± 9.90 convenzionale, P<0.001). Inoltre, durante il secondo anno di coltivazione un incremento del contenuto di vitamina C è stato osservato sia nei pomodori

biologici (II anno vs I anno $P < 0.001$) sia nei pomodori convenzionali (II anno vs I anno $P < 0.001$).

Questi risultati hanno suggerito che sia il metodo di coltivazione che l'anno di coltivazione possono influenzare il contenuto di vitamina C come riportato dai dati in lettura. Diversi autori hanno mostrato che la composizione del terreno, in particolare la distribuzione di minerali, è uno dei fattori cruciali che potrebbe influenzare il profilo di composti bioattivi (Coelho et al., 2005; Dudjak et al., 2004). Watkins & Pritts (2001) hanno dimostrato come le pratiche agronomiche e l'apporto di nutrienti e di acqua ed i metodi di raccolta potrebbe influenzare la qualità del pomodoro prima e dopo la raccolta.

Diversi autori hanno dimostrato come le condizioni climatiche (luce, temperatura media) hanno una forte influenza sui livelli di vitamina C (Lee et al., 2000). Zushi & Matsuzoe (1998) hanno studiato l'effetto di un minore apporto di acqua in 5 cultivars di pomodoro: in alcune cultivars il contenuto di vitamina C aumentava, mentre in altre cultivars non risultava modificato.

Per ottenere cibi di alta qualità è necessaria la comprensione del legame tra condizioni ambientali, pratiche agronomiche, composizione e qualità degli alimenti.

Stea et al. 2005 hanno dimostrato come il contenuto polifenolico sia correlato alla salinità e al grado di maturazione (Stea et al., 2005). All'interno degli acidi idrossicinnamici, il contenuto di acido clorogenico, caffeico e cumarico non risultavano differenti tra pomodori biologici e convenzionali, eccetto che per le concentrazioni di acido cumarico nel primo anno di coltivazione, trovate più alte nel prodotto biologico che in quello convenzionale (biologico 3.35 ± 0.48 mg/kg vs convenzionale 2.79 ± 0.42 mg/kg, $P < 0.05$). Caris-Veyrat et al. (2004), paragonando il contenuto di antiossidanti tra pomodori coltivati secondo regime biologico e convenzionale hanno mostrato come i pomodori biologici presentavano un contenuto di vitamina C, carotenoidi e polifenoli (eccetto per l'acido clorogenico) più alto che in quelli convenzionali.

Considerando come discriminante l'anno di coltivazione nella valutazione dei nostri risultati, il contenuto di acido caffeico e acido clorogenico risultava più alto

nel secondo anno di coltivazione sia nel prodotto biologico (acido caffeico II anno vs I anno, $P<0.001$; acido clorogenico II anno vs I anno, $P<0.007$) che in quello convenzionale (acido caffeico II anno vs I anno $P<0.01$; acido clorogenico II anno vs I anno, $P\sim n.s.$), mentre l'acido cumarico presentava un trend inverso (biologico: I anno vs II anno $P<0.001$; convenzionale I anno vs II anno, $P<0.001$). Nel primo anno di coltivazione, il contenuto di quercetina è stato trovato maggiore nel prodotto convenzionale rispetto a quello biologico (convenzionale 33.90 ± 6.31 mg/kg vs biologico 17.92 ± 10.95 mg/kg, $P<0.001$), mentre nel secondo anno di coltivazione si osservava un trend inverso (biologico 17.8 ± 1.48 vs convenzionale 8.72 ± 2.18 , $P<0.05$). Uno studio di Mitchell et al. 2007 ha mostrato come il livello medio monitorato lungo 10 anni di coltivazione di quercetina e kampferolo era più alto nel prodotto biologico rispettivamente del 79% e del 97% rispetto al pomodoro convenzionale.

Inoltre nel secondo anno di coltivazione il contenuto di naringenina e rutina risultavano essere più alte nel prodotto biologico (biologico 59.4 ± 7.95 mg/kg vs convenzionale 40.2 ± 9.23 mg/Kg, $P<0.001$; biologico 45.9 ± 5.84 vs convenzionale 23.2 ± 7.73 mg/Kg, $P<0.05$).

Seguendo la distribuzione dei flavonoidi, nei pomodori convenzionali durante il secondo anno di coltivazione si osserva una diminuzione della concentrazione di quercetina (I anno vs II anno, $P<0.001$), mentre il contenuto di naringerina è stato trovato più alto nel primo anno di coltivazione nel prodotto biologico (II anno vs I anno $P<0.005$).

Per il licopene e il β -carotene non è stata rilevata nessuna differenza tra pomodoro biologico e convenzionale (eccetto per il β -carotene nel primo anno di coltivazione), mentre i valori più alti si osservavano per entrambe le pratiche agronomiche nel primo anno di coltivazione.

3.2.2 Potere Antiossidante

Dopo aver valutato il contenuto dei singoli antiossidanti, noi abbiamo studiato l'azione sinergica delle molecole bioattive nella matrice alimentare attraverso la valutazione della capacità antiossidante totale.

Tabella 18. Confronto tra il primo e il secondo anno di coltivazione. Valore medio e sd della Capacità Antiossidante Totale misurata tramite TEAC (mmol Trolox/ Kg) e FRAP (mmol Fe²⁺/Kg)

Parametri Antiossidanti	Biologico			Convenzionale		
	I anno	II anno	P value	I anno	II anno	P value
TEAC	3.52 ± 0.39 ^a	3.17 ± 0.17 ^b	n.s.	4.85 ± 0.60 ^a	2.64 ± 0.09 ^b	P<0.001
FRAP	4.06 ± 0.29	4.17 ± 0.53	n.s.	3.15 ± 1.40	3.47 ± 0.28	n.s.

^a Convenzionale versus Biologico P<0.001

^b Biologico versus Convenzionale P < 0.05

La tabella 18 mostra i valori della Capacità Antiossidante Totale secondo l'anno di coltivazione e le pratiche agronomiche. Nel primo anno di coltivazione i valori TEAC (mmol Trolox/ Kg) erano più alti nel pomodoro convenzionale che in quello biologico, rispettivamente 4.85 ± 0.60 mmol Trolox/ Kg vs 3.52 ± 0.39 mmol Trolox/ Kg ($P<0.001$), mentre nel secondo anno si osservava un trend inverso per i valori TEAC (biologico 3.17 ± 0.17 mmol Trolox/ Kg vs convenzionale 2.64 ± 0.09 mmol Trolox/ Kg, $P < 0.05$). Inoltre i valori TEAC non erano significativamente differenti tra i due anni di coltivazione nei pomodori biologici, mentre nel prodotto convenzionale valori più alti erano osservati nel primo anno rispetto al secondo anno di coltivazione ($P<0.001$). Per i valori FRAP nessuna differenza significativa era rilevata tra pomodori biologici e convenzionali e tra il primo ed il secondo anno di coltivazione per entrambe le pratiche agronomiche. George et al. (2004) hanno studiato il contenuto di bio-antiossidanti e l'attività antiossidante di 12 genotipi di pomodoro: sono stati rilevati valori significativi di attività antiossidante.

3.2.3 Funzionalità del pomodoro

La “funzionalità” del pomodoro nella protezione della salute umana è stata studiata attraverso l'effetto protettivo svolto dalle molecole bioattive presenti nell'estratto di pomodoro su linee cellulari di adenocarcinoma del colon Caco-2. L'analisi istologica del monolayer di Caco-2 “in toto” ha evidenziato

microscopicamente il tipo del danno e la sua compartimentalizzazione a livello citologico. La figura 6a mostra l'attività antiossidante/pro-ossidante ottenuta usando modelli in vitro ed espressa come TEER (Ohm/cm²) attraverso il tempo in campioni di pomodoro biologico e convenzionale rispettivamente con l'aggiunta di differenti concentrazioni di estratti polifenolici di pomodoro. I valori TEER non differiscono significativamente tra pomodoro biologico e convenzionale, ma in entrambi i campioni, noi abbiamo osservato una diminuzione della permeabilità delle giunzioni strette alla concentrazione polifenolica. I risultati TEER mostrano che i campioni biologici e convenzionali hanno lo stesso andamento, e il sistema cellulare è abile a resistere fino alla concentrazione di 17 μ M dell'estratto polifenolico di pomodoro.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che i composti ossidanti entrano all'interno della cellula, e così essi potrebbero portare avanti la loro azione antiossidante. Inoltre i nostri risultati hanno mostrato che queste molecole bioattive a concentrazioni > 17 μ M potrebbero avere un effetto pro-ossidante come riportato dall'analisi istopatologica (figura 6a-6b). In particolare, basse concentrazioni (2, 4, 6 e 8 μ M) non mostrano significativa alterazione morfologica del monostrato epiteliale comportandosi quindi come antiossidanti; invece aumentando le concentrazioni (10 μ M and 17 μ M) dell'estratto polifenolico del pomodoro è evidente un'azione pro-ossidante che porta ad apoptosi e a degenerazione ialina e a tutti danni irreversibili. La presenza di atipia citologica e strutturale di tipo anaplastico conferma che l'epitelio in cultura è fatto di cellule indifferenziate e di forme aberranti poliploidi dovute alla mancanza di divisione citoplasmatica, aspetto di una cellula neoplastica. I principali polifenoli negli estratti testati erano quercetina (33.90 $\pm$ 6.31 mg/kg nell'estratto convenzionale; 17.92 $\pm$ 10.9 mg/kg nell'estratto biologico), acido clorogenico (3.52 $\pm$ 0.74 mg/kg nell'estratto convenzionale; 2.82 $\pm$ 0.92 mg/kg nell'estratto biologico) e acido caffeico (3.61 $\pm$ 0.71 mg/kg nell'estratto convenzionale; 3.29 $\pm$ 0.33 mg/kg nell'estratto biologico). Anche se sono state trovate tra estratti biologici e convenzionali per diversi composti target differenze significative, nessuna differenza nell'effetto

biologico era osservata usando un modello cellulare. Ulteriori ricerche sono richieste per spiegare il meccanismo di azione intrinseco.

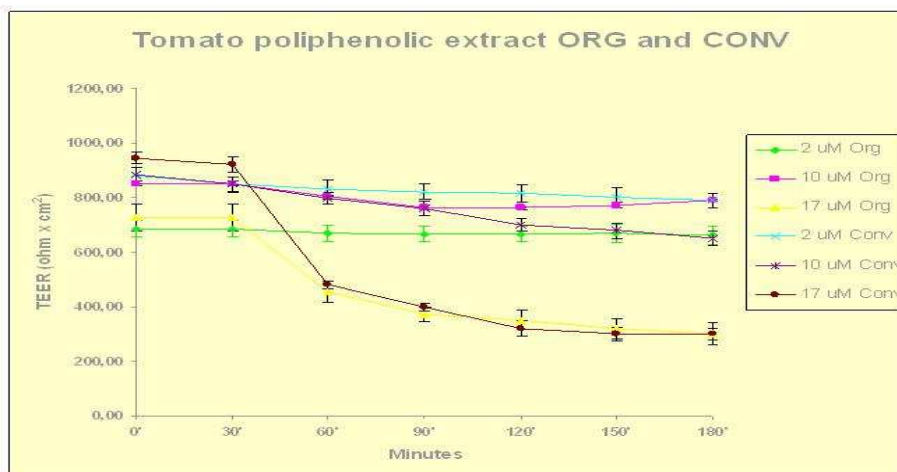


Figure 7A. Attività antiossidante/pro-ossidante ottenuta usando modelli in vitro ed espresso come TEER (Ohm/cm²) attraverso il tempo in campioni di pomodoro biologico e convenzionale rispettivamente con l'aggiunta di differenti concentrazioni di estratti polifenolici di pomodoro.

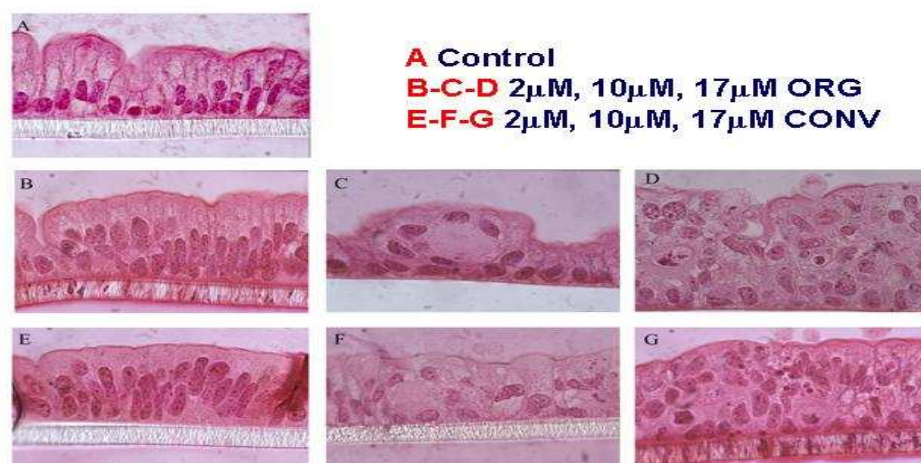


Figure 7B. Analisi istologica di un monostrato di cellule *CaCO₂* trattate con concentrazioni crescenti di estratto polifenolico di pomodoro coltivato secondo pratiche agronomiche biologiche (B-C-D) e convenzionali (E-F-G). Per entrambi gli estratti ad una concentrazione di 10 μM, si presentava un iniziale effetto (pro)-ossidante.

3.3.0 Conclusioni

In conclusione i nostri risultati hanno mostrato come il contenuto di molecole bioattive nel pomodoro sia influenzata dalle pratiche agronomiche, anno di coltivazione, fattori ambientali e pedoclimatici, mentre non si osserva nessuna differenza nell'effetto biologico osservato in modelli cellulari di estratti di pomodoro biologici e convenzionali.

D'altra parte, dai risultati su modelli cellulari si evidenzia l'attività antiossidante e la permeabilità cellulare delle molecole bioattive del pomodoro; anche se a concentrazioni più alte di 17 μ M dell'estratto polifenolico, i componenti bioattivi presentano un'effetto pro-ossidante come rivelano le analisi istologiche.

E' chiaro quindi come la relazione tra il contenuto di molecole bioattive, l'attività antiossidante totale e la valutazione del danno cellulare sia un elemento chiave per valutare i potenziali effetti benefici derivati dal consumo di pomodoro e prodotti a base di pomodoro.

4.0.0 Linea di Ricerca 3

4.0.1 Introduzione

Le caratteristiche nutrizionali dei prodotti alimentari sono influenzate dai fattori pre-raccolta, dai trattamenti post-raccolta e dai processi tecnologici che influenzano il contenuto di molecole bioattive. Dopo la raccolta, il frutto fresco è soggetto a perdite di nutrienti dovute alle modalità di conservazione. La refrigerazione è la procedura più comune per aumentare la shelf life, inoltre le condizioni di trasporto e le temperature di conservazione sono aspetti importanti in grado di influenzare la stabilità alimentare, condizionando il contenuto dei diversi prodotti in molecole bioattive e di conseguenza le loro proprietà antiossidanti.

La distribuzione del sistema alimentare sta cambiando. Nel passato i prodotti, durante il trasporto dall'area di coltivazione al market, erano sottoposti a variazione del contenuto di molecole bioattive e delle proprietà organolettiche. Per questa ragione, c'è un forte sviluppo del sistema di distribuzione diretto dei prodotti e di un sistema tendente alla riduzione dei passaggi nella catena distributiva chiamata "short weaving factory". Questi prodotti sono chiamati prodotti a Km 0. Questo sistema presenta numerosi vantaggi:

- a) riduzione del prezzo per il consumatore;
- b) aumenti dei profitti per il coltivatore;
- c) mantenimento di zone/aree di coltivazione intorno alla città;
- d) valorizzazione di prodotti locali;
- e) preservazione dei prodotti di nicchia, dell'ambiente e della biodiversità.

4.0.2 Obiettivi

Obiettivo di tale studio è stato quello di valutare l'effetto della conservazione su una cultivar di fragole tipico, scelto dopo uno screening di differenti cultivars di fragole.

4.1.0 Materiale e Metodi

4.1.1 Campionamento

Sono stati analizzati differenti ecotipi agricoli di fragole: fragole “Aprica” (Lombardia, Nord Italia), fragole “Favetta di Terracina” (Lazio, Centro Italia), fragole “Mara des Bois” (Calabria, Sud Italia), fragole commerciali (importate dalla Spagna e disponibili sul mercato).

Per ogni prodotto selezionato, la caratterizzazione biochimica ha incluso l’analisi delle molecole più rappresentative nelle fragole come polifenoli, carotenoidi e vitamina C.

4.1.2 Quantificazione dei carotenoidi

Per la descrizione delle metodologie per la determinazione dei carotenoidi si rimanda alla descrizione riportata nella sezione 2.1.2.

4.1.3 Quantificazione dei polifenoli

Per la descrizione delle metodologie per la determinazione dei polifenoli si rimanda alla descrizione riportata nella sezione 2.1.3.

4.1.4 Quantificazione della vitamina C

Per la descrizione delle metodologie per la determinazione della vitamina C si rimanda alla descrizione riportata nella sezione 2.1.4.

4.1.5 Misura del potere Antiossidante Totale TRAP Total radical-trapping antioxidant potential

L’analisi TRAP è stata effettuata su estratti ottenuti secondo la metodica riportata nella sezione 2.1.5. Il metodo (Ghiselli *et al.* 2000) misura il decadimento di una molecola fluorescente, la R-ficoeritrina (R-PE), estratta dalle alghe rosse, in seguito a reazione con un flusso di radicali perossilici prodotti dalla decomposizione termica di un azocomposto, il 2,2-azobis-(2-amidinopropano)

diidroclore (ABAP). Qualsiasi sostanza antiossidante che ostacoli il flusso di radicali perossilici sulla R-PE provocherà un ritardo nel suo decadimento (Fase di Inibizione, FI) proporzionale alla sua concentrazione ed alla sua attività antiossidante. Il ritardo nel decadimento sarà convertito in molarità tramite standardizzazione con un analogo idrosolubile della vitamina E, il Trolox (T), capace di intrappolare due moli di radicali perossili per ogni mole di sostanza testata.

4.1.6 Misura del potere riducente totale FRAP Ferric Reducing Antioxidant Power

Per la descrizione delle metodologie per la determinazione del potere riducente totale si rimanda alla descrizione riportata nella sezione 2.1.5.

4.1.7 Analisi Statistica

Per la descrizione della metodica di analisi statistica utilizzata si rimanda alla descrizione riportata nella sezione 2.1.8.

4.2.0 Risultati e Discussione

4.2.1 Screening tra le varie cultivar di fragole

La “Favetta di Terracina” mostra un contenuto dei singoli antiossidanti più alto rispetto a quello riscontrato nelle fragole “Mara de Bois”, “Aprica” e in quelle commerciali. Le fragole “Aprica” mostrano dei valori significativamente più alti di TRAP e FRAP essendo un ecotipo selvatico (tabella 19).

Tabella 19. Capacità Antiossidante Totale e composti bioattivi in differenti ecotipi di fragole.

Prodotto	FRAP (mmol/kg)	TRAP (mmol/kg)	Ac. cumarico (mg/100gr)	Quercetina (mg/100gr)	Kampferolo (mg/100gr)	Vitamina C (mg/100gr)
Mara des Bois	17.78±0.43 ^a	9.87±0.28 ^d	1.24±0.20 ^g	3.10±0.04 ^m	1.56±0.59 ^o	49.8±3.5
Aprica	62.85±3.23 ^{a,b,c}	16.31±1.20 ^{d,e,f}	0.80±0.30 ^h	2.46±0.45 ⁿ	3.38±0.97 ^{o,p,q}	52±3.1
Favetta	18.80±0.70 ^b	10.02±0.68 ^e	7.10±1.70 ^{g,h,i}	5.0±0.30 ^{l,m,n}	1.60±0.440 ^p	55.7±2.5 ^r
Commerciale	19.74±0.68 ^c	10.34±0.15 ^f	1.87±0.84 ⁱ	2.06±0.87 ^l	1.14±0.01 ^q	44.2±2.8 ^r

a,b,c,d,e,f,g,h,i,l
P<0.001m,o,p,q
P<0.05n,r
P<0.01

4.2.2 Valutazione dell'effetto della conservazione domestica

E' stata scelta la "Favetta di Terracina" come modello per la valutazione dell'effetto della conservazione sul contenuto di molecole bioattive per gli alti valori di antiossidanti e per la sua caratteristica di essere un prodotto a Km 0 .

La cultivar di fragola (*Fragaria x ananassa* Duch) "Favetta di Terracina" è originata dalla cv Francese Favette sviluppato in Gironda, ed è ampiamente coltivato nella provincia di Latina vicino Roma. Le piante di "Favetta" sono vigorose, hanno un habitat che consente una crescita globosa in grado di produrre circa cinque infiorescenze a corona. La cv Favetta produce un interessante piccolo frutto rosso. Questa cultivar è caratterizzata da alta qualità della frutta, soprattutto nel sapore. Il frutto è di forma globosa e di un colore rosso luminoso e deciso. Le piante sono state mantenute esenti da piante infestanti e l'acqua garantita attraverso un sistema di irrigazione a gocciolamento programmato.

I valori della capacità antiossidante totale e il contenuto di alcuni polifenoli, vitamina C e di alfa-carotene contenuti nelle fragole "Favetta di Terracina" fresche e conservate sono elencati nella tabella 20. E' stato valutato l'effetto della conservazione (in frigorifero a 4° per 4 giorni) sul contenuto di molecole bioattive presenti nelle fragole.

Tabella 20. Livelli dei composti bioattivi contenuti nelle fragole “Favetta di Terracina” fresche e conservate.

Prodotto	Fresco	Conservato	P
α -carotene ($\mu\text{g}/100\text{gr}$)	6.86 ± 1.83	12.51 ± 2.58	$P < 0.05$
Vitamina C ($\text{mg}/100\text{gr}$)	39.9 ± 7.73	42.43 ± 10.01	n.s.
Acido cumarico ($\text{mg}/100\text{gr}$)	1.48 ± 0.31	1.46 ± 0.51	n.s.
Quercetina ($\text{mg}/100\text{gr}$)	3.47 ± 1.52	6.60 ± 3.82	$P < 0.05$
Kampferolo ($\text{mg}/100\text{gr}$)	1.86 ± 0.57	3.15 ± 1.21	$P < 0.05$
Cianidina 3-glucoside ($\mu\text{g}/100\text{gr}$)	0.29 ± 0.07	0.28 ± 0.02	n.s.
Pelargonidina 3-glucoside ($\mu\text{g}/100\text{gr}$)	12.45 ± 1.40	9.29 ± 0.32	$P < 0.05$
Pelargonidina malonil-gluc ($\mu\text{g}/100\text{gr}$)	1.19 ± 0.32	0.94 ± 0.12	n.s.
Pelargonidina acetil-gluc ($\mu\text{g}/100\text{gr}$)	0.69 ± 0.16	0.48 ± 0.10	n.s.

Analisa della varianza: Anova Repeated measures $P < 0.05$

Per tutti i parametri analizzati nei vari lotti sperimentali non si osservano differenze significative. La valutazione dell'effetto della conservazione domestica ha evidenziato che il contenuto di alfa-carotene, quercetina e kampferolo era significativamente superiore nelle fragole conservate rispetto a quelle fresche. Al contrario per le antocianine si osservano livelli più bassi per le fragole conservate ma la significatività statistica si rileva soltanto nei livelli di pelargonidina 3-glucoside. Questi risultati sono in accordo con i dati riportati in letteratura sui composti bioattivi presenti in bacche e frutti di bosco (Tulipani *et al.*, 2008; Aaby *et al.*, 2007).

4.3.0 Conclusioni

I nostri risultati mostrano come la conservazione domestica influenza in maniera diversa non solo classi di composti chimici differenti, ma anche composti strutturalmente differenti appartenenti alla stessa classe chimica.

5.0.0 Linea di Ricerca 4

5.0.1 Introduzione

Tale studio, nasce dalla considerazione che i prodotti agro-alimentari tradizionali italiani, siano unici e non riproducibili e presentino caratteristiche peculiari riconducibili esclusivamente alla loro provenienza e al tipo di coltivazione applicata.

Il territorio, infatti, esercita la sua influenza sui prodotti non solo per i fattori naturali, come il tipo di terreno e il clima, che lo caratterizzano, ma anche le tecniche agricole tramandate dalla tradizione artigiana.

Le strutture di produzione e di trasformazione dei prodotti alimentari tipici devono incoraggiare, nell'esercizio delle loro attività, la conservazione del patrimonio biologico, genetico e culturale, lo sviluppo delle conoscenze tradizionali locali, la gestione delle aree rurali e dei paesaggi.

5.0.2 Obiettivi

L'obiettivo è stato quello di valutare la capacità nutrizionale e salutistica di alcuni prodotti tipici attraverso lo studio della composizione chimica e/o specifiche caratterizzazioni biochimiche, e di confrontare i risultati ottenuti nelle diverse aree geografiche, con le medesime coltivazioni commerciali.

5.1.0 Materiale e Metodi

5.1.1 Campionamento

Alcuni ecotipi agricoli italiani sono stati selezionati da differenti regioni italiane: ciliegie di “Aprica” in Lombardia; patate di “Rotzo” e lamponi del “Cansiglio” in Veneto; patate “Val Belbo” e pera “madernassa” in Piemonte; mele “limoncelle” e carote rosse del “Fucino” in Abruzzo ed infine cicoria selvatica in Calabria (tabella 21).

Tabella 21. Classificazione dei prodotti tipici selezionati per il prog.

Regione	Prodotto	Analisi effettuate
Lombardia	Ciliegie di Aprica	• FRAP; TRAP • Dosaggio della Vitamina C
Veneto	Patate di Rotzo	• FRAP; TRAP
	Lamponi del Cansiglio	• FRAP; TRAP • Dosaggio della Vitamina C
Piemonte	Patate Val Belbo (Biologiche ed Integrate)	• FRAP; TRAP
	Pera Madernassa	• FRAP; TRAP • Quantificazione delle molecole polifenoliche
Abruzzo	Mele limoncelle	• FRAP; TRAP • Quantificazione delle molecole polifenoliche
	Carote rosse del Fucino	• FRAP; TRAP • Dosaggio dei carotenoidi
Calabria	Cicoria di Pascolo	• FRAP; TRAP • Quantificazione delle molecole polifenoliche

Al fine di studiare alcuni di questi prodotti così come sono abitualmente consumati, abbiamo analizzato cicoria, patate e carote sia crudi che cotti.

Inoltre abbiamo analizzato le patate coltivate secondo due tipi di pratiche agronomiche, organica ed integrata, nella stessa regione.

La tabella 21 riporta le analisi effettuate sui prodotti selezionati. Le stesse caratterizzazioni biochimiche sono state eseguite sui medesimi prodotti di provenienza commerciale. Un campione rappresentativo di ogni trattamento è stato omogenizzato in un Waring blender per 1 min. Sono stati preparati due replicati per ogni campione. Le aliquote dei campioni sono state conservate a -80 °C fino a che le analisi dei polifenoli, carotenoidi e della vitamina C sono state condotte.

5.1.2 Quantificazione dei carotenoidi

Per la descrizione delle metodologie per la determinazione dei carotenoidi si rimanda alla descrizione riportata nella sezione 2.1.2.

5.1.3 Quantificazione dei polifenoli

Per la descrizione delle metodologie per la determinazione dei polifenoli si rimanda alla descrizione riportata nella sezione 2.1.3.

5.1.4 Quantificazione della vitamina C

Per la descrizione delle metodologie per la determinazione della vitamina C si rimanda alla descrizione riportata nella sezione 2.1.4.

5.1.5 Misura del potere Antiossidante Totale TRAP Total radical-trapping antioxidant potential

Per la descrizione delle metodologie per la determinazione del TRAP si rimanda alla descrizione riportata nella sezione 4.1.5.

5.1.6 Misura del potere riducente totale FRAP Ferric Reducing Antioxidant Power

Per la descrizione delle metodologie per la determinazione del potere riducente totale si rimanda alla descrizione riportata nella sezione 2.1.5.

5.1.7 Analisi Statistica

Per la descrizione della metodica di analisi statistica utilizzata si rimanda alla descrizione riportata nella sezione 2.1.8.

5.2.0 Risultati

5.2.1 Lombardia

Dalla tabella 22 emerge, come i valori del potenziale antiossidante espresso come valore di FRAP (mmol/kg) e del TRAP (mmol/kg) ottenuti per le ciliegie di Aprica siano significativamente più alti ($P < 0.001$) di quelli ottenuti nelle ciliegie commerciali (Jacob et al. 2003). La quantificazione della vitamina C (mg/100g)

segue lo stesso andamento, essendo risultata pari a 22.92 ± 0.76 (mg/100g) nelle ciliegie tipiche e 6.44 ± 0.62 (mg/100g) in quelle commerciali ($P < 0.001$).

Tabella 22. Confronto tra i valori FRAP e TRAP, dosaggio della Vitamina C nelle ciliegie di Aprica e nelle ciliegie commerciali.

Provenienza del prodotto	Tipologia di mercato	FRAP (mmol/kg)	TRAP (mmol/kg)	Vitamina C (mg/100g)
Ciliegie di Aprica Valtellina	Consumo di zona	18.55 ± 1.91^a	16.49 ± 1.07^b	22.92 ± 0.76^c
Ciliegie comprate in un mercato rionale di Roma	Commerciale	6.25 ± 0.07^a	6.80 ± 0.049^b	6.44 ± 0.62^c

^{a,b,c} prodotto tipico vs prodotto commerciale, $P < 0.001$

5.2.2 Veneto

Di seguito si riportano le tabelle relative alla caratterizzazione dei prodotti tipici della regione Veneto, rispetto a quella dei medesimi prodotti di provenienza commerciale.

Tabella 23. Confronto tra i valori del potenziale antiossidante totale delle patate di Rotzo e delle patate commerciali, sia sul prodotto crudo che cotto.

Provenienza del prodotto	Tipologia di mercato	Tipologia del Materiale analizzato	FRAP (mmol/Kg)	TRAP (mmol/Kg)
Patate di Rotzo	Consumo di zona	crudo	3.05 ± 0.636^a	2.68 ± 0.0071^b
Patate comprate in un mercato rionale di Roma	Commerciale	crudo	3.55 ± 0.071	2.20 ± 0.042^{bc}
Patate di Rotzo	Consumo di zona	cotto	4.30 ± 0.141^a	2.69 ± 0.113
Patate comprate in un mercato rionale di Roma	Commerciale	cotto	4.30 ± 0.141	2.73 ± 0.099^c

^a Patate Rotzo: cotto vs crudo $P < 0.05$

^b Patate Rotzo vs prodotto commerciale (prodotto crudo) $P < 0.001$

^c Prodotto commerciale: cotto vs crudo $P < 0.001$

Dalla tabella 23, non emergono differenze significative nei valori FRAP tra le patate di Rotzo e le patate commerciali, mentre si registra una differenza significativa nei valori TRAP tra i prodotti crudi di due provenienze diverse.

Dopo cottura si nota un incremento della capacità antiossidante totale (Jarvis et al. 1992).

Tabella 24. Confronto tra i valori FRAP e TRAP e dosaggio della Vitamina C tra i lamponi del Cansiglio e i lamponi commerciali.

Provenienza del prodotto	Tipologia di mercato	FRAP (mmol/kg)	TRAP (mmol/kg)	Vitamina C (mg/100g)
Lamponi del Cansiglio (Bl)	Consumo di zona	57.70±6.2 ^a	23.72±1.12 ^b	22.21±1.34 ^c
Lamponi Azienda Santorsola	Commerciale	11.50±0.99 ^a	11.93±1.31 ^b	19.31±0.5 ^c

^{a,b} Lamponi del Cansiglio vs prodotto commerciale, P<0.001

^c Lamponi del Cansiglio vs prodotto commerciale, P<0.05

Nella tabella 24 si riportano i valori del FRAP e del TRAP riscontrati per i lamponi del Cansiglio rispettivamente pari a 57.70±6.2 (mmol/kg) e 23.72±1.12 (mmol/kg) e per quelli commerciali con valori di FRAP pari a 11.50±0.99 (mmol/kg) e TRAP 11.93±1.31 (mmol/kg). Valori che evidenziano livelli di potenziale antiossidante, rispettivamente di circa cinque volte e del doppio più alti nei lamponi tipici rispetto al prodotto commerciale (P<0.001).

Anche la quantità di vitamina C misurata nei lamponi del Cansiglio 22.21±1.34 (mg/100g) risulta essere significativamente maggiore (P<0.05) rispetto a quella misurata nel corrispettivo prodotto commerciale 19.31±0.57 (mg/100g) (Liu et al. 2002; Kalt et al. 1999).

5.2.3 Piemonte

Di seguito si riportano le tabelle relative alla caratterizzazione del potenziale antiossidante dei prodotti provenienti dal Piemonte rispetto a quella dei medesimi prodotti di provenienza commerciale.

Tabella 25. Confronto tra i valori FRAP e TRAP delle pere Madernassa e delle pere commerciali (con e senza buccia).

Provenienza del prodotto	Tipologia di mercato	Modalità di consumo	FRAP (mmol/kg)	TRAP (mmol/kg)
Pere Madernassa	Consumo di zona	Con buccia	2.90±0.28^{ab}	n.d.
Pere commerciali	Commerciale	Con buccia	4.15±0.071^{ac}	n.d.
Pere Madernassa	Consumo di zona	Senza buccia	1.35±0.071^{bd}	n.d.
Pere commerciali	Commerciale	Senza buccia	1.50±0.0^{cd}	n.d.

^a Pera commerciale vs pera Madernassa (con buccia), P<0.01

^{b,c} Pera con buccia vs senza buccia (prodotto tipico e commerciale), P<0.001

^d Pera commerciale vs pera Madernassa (senza buccia) P<0.05

Dalla tabella 25 emerge, in accordo con i dati trovati in letteratura, come i valori FRAP tra prodotto con buccia e prodotto senza buccia siano significativamente differenti (P<0.001), evidenziando un contenuto delle molecole antiossidanti maggiore nella buccia sia nelle pere Madernassa che nelle pere commerciali (Leontowicz et al. 2003).

Notiamo, inoltre, come i valori ottenuti per le pere commerciali siano significativamente più alti rispetto ai valori ottenuti per i prodotti tipici.

Tabella 26. Confronto tra i valori FRAP e TRAP delle patate biologiche e delle patate integrate della Val Belbo (prodotto crudo e prodotto cotto)

Provenienza del Prodotto	Pratica Agronomica	Tipologia di Mercato	FRAP (mmol/Kg)	TRAP (mmol/Kg)
Patate Val Belbo (prodotto crudo)	Biologico	Consumo di zona	2.6±0.00^{a,c}	2.10±0.035^f
Patate Val Belbo (prodotto crudo)	Integrato	Consumo di zona	2.6±0.141^{b,d}	2.33±0.247
Patate comprate in un mercato rionale di Roma (prodotto crudo)		Commerciale	3.55±0.071^{a,b,e}	2.20±0.042^g
Patate ValBelbo (prodotto cotto)	Biologico	Consumo di zona	3.95±0.212^c	2.32 ±0.071^{f,h,i}
Patate ValBalbo (prodotto cotto)	Integrato	Consumo di zona	4.40±0.71^d	2.80±0.191^h
Patate comprate in un mercato rionale di Roma (prodotto cotto)		Commerciale	4.30±0.141^e	2.73±0.099^{g,i}

^{a,b} patate commerciali vs Val Belbo (prodotto crudo), p<0.001

^{c,d,e,g} prodotto cotto vs crudo, p<0.001

^f prodotto cotto vs crudo, p<0.01

^h prodotto biologico vs prodotto integrato, p<0.01

ⁱ prodotto commerciale vs biologico, Val Belbo (prodotto cotto), p<0.01

Per tutte le tipologie di campioni analizzati, dai risultati della tabella 26, si evidenzia che la cottura sembra incrementare la capacità antiossidante totale. In particolare l'incremento significativo ($P<0.001$) osservato per valori FRAP dopo la cottura potrebbe essere dovuto alla liberazione degli zuccheri in seguito la gelificazione e la conseguente depolimerizzazione dell'amido, provocato dalla cottura (Jarvis et al. 1992).

Il prodotto commerciale risulta significativamente più alto del prodotto tipico Val Belbo Biologico ($P<0.001$) nel valore FRAP per il prodotto crudo e significativamente più alto ($P<0.01$) del prodotto tipico Val Belbo sia biologico che integrato nel valore TRAP per il prodotto cotto.

Inoltre, per le patate del Val Belbo sono stati analizzati sia i prodotti coltivati in regime biologico che in regime integrato. Si registra una differenza significativa ($P<0.01$) nel valore TRAP per il prodotto cotto.

5.2.4 Abruzzo

Nella tabella 27 riscontriamo un andamento analogo a quello trovato per le pere (tabella 25), anche qui rileviamo un decremento significativo dei valori del FRAP, tra il prodotto con buccia rispetto a quelli senza buccia. Inoltre i valori di FRAP nella mele Limoncelle sono significativamente più alti rispetto a quelli ottenuti per le mele commerciali.

Tabella 27. Confronto tra i valori FRAP e TRAP delle mele limoncelle e delle mele commerciali (con e senza buccia).

Provenienza del prodotto	Tipologia di mercato	Modalità di consumo	FRAP (mmol/Kg)	TRAP (mmol/Kg)
Mele limoncelle	Consumo di zona	Con buccia	7.65±0.49^{a,c}	n.d.
Mele commerciali	Commerciale	Con buccia	3.00±0.00^{a,d}	n.d.
Mele limoncelle	Consumo di zona	Senza buccia	4.15±0.071^{b,c}	n.d.
Mele commerciali	Commerciale	Senza buccia	2.90±0.00^{b,d}	n.d.

^{a,b} Mele limoncelle vs mele commerciali, $P<0.001$

^c Mele limoncelle: prodotto con buccia vs prodotto senza buccia, $P<0.001$

^d Mele commerciali: prodotto con buccia vs prodotto senza buccia, $P<0.01$

Tabella 28. Confronto tra i valori di TRAP e FRAP delle carote della Piana del Fucino e delle carote commerciali (analisi sul prodotto crudo e cotto).

Provenienza del prodotto	Tipologia di mercato	Modalità di consumo	FRAP (mmol/kg)	TRAP (mmol/Kg)
Carote Piana del Fucino	Consumo di zona	Prodotto crudo	0.932±0.12	1.88±0.0071^{a,c}
Carote Maccarese	Commerciale	Prodotto crudo	0.791±0.05	1.42±0.028^{a,d}
Carota Piana del Fucino	Consumo di zona	Prodotto cotto	0.804±0.024	1.51±0.028^{b,c}
Carote Maccarese	Commerciale	Prodotto cotto	0.7915±0.047	1.30±0.06^{b,d}

^{a,b} prodotto tipico vs prodotto commerciale, P<0.001

^c prodotto tipico, crudo vs cotto P<0.001

^d prodotto commerciale, crudo vs cotto P<0.05

I valori di TRAP ottenuti per le carote del Fucino sono significativamente più alti (P<0.001) rispetto a quelli ottenuti per i prodotti commerciali. Dopo la bollitura, per entrambi i prodotti si ha una diminuzione dei valori TRAP (Alasavar et al. 2001).

Tabella 29. Confronto tra i valori di α -carotene e β -carotene delle carote della Piana del Fucino e delle carote commerciali (analisi sul prodotto crudo e cotto).

Provenienza del prodotto	Tipologia di mercato	Modalità di consumo	α -carotene (µg/100g)	β -carotene (µg/100g)
Carote Piana del Fucino	Consumo di zona	Prodotto crudo	4788.4 ±928.2^a	11682.9±1000^{d,f}
Carote Maccarese	Commerciale	Prodotto crudo	6091.5 ±743.3^b	8181.1±100.8^{e,f}
Carota Piana del Fucino	Consumo di zona	Prodotto cotto	3063.1±356.4^{a,c}	8108.7±750.7^{d,g}
Carote Maccarese	Commerciale	Prodotto cotto	4502.2±334.1^{bc}	5938.5±304.9^{e,g}

^{a,b} FRAP: prodotto crudo vs prodotto cotto, P<0.05

^c prodotto cotto: prodotto commerciale vs prodotto tipico P<0.01

^d prodotto tipico (TRAP): prodotto crudo vs cotto P<0.01

^e prodotto commerciale (TRAP): prodotto crudo vs cotto P<0.001

^f prodotto tipico vs commerciale, P<0.01

^g prodotto tipico vs commerciale, P<0.001

Dalla tabella 29, si evidenzia per i livelli di α -carotene e di β -carotene un decremento significativo in seguito a bollitura.

5.2.5 Calabria

Nella tabella 30, si evidenziano valori di FRAP e di TRAP per la cicoria di pascolo calabrese, rispettivamente pari a 20.36 ± 0.08 mmol/kg e 26.71 ± 1.04 mmol/kg, significativamente più alti ($P < 0.001$) rispetto ai valori ottenuti per la cicoria commerciale pari a 8.04 ± 0.033 (mmol/kg) e 10.60 ± 0.06 (mmol/kg) riscontrati per FRAP e TRAP rispettivamente (Llorach *et al.*, 2002).

Tabella 30. Confronto tra i valori FRAP e TRAP della cicoria di pascolo e della cicoria commerciale (prodotto cotto). Dosaggio dell'acido clorogenico.

Provenienza del prodotto	Tipologia del prodotto	FRAP(mmol/kg)	TRAP(mmol/kg)	Ac. Clorogenico (mg/100g)
Cicoria di Pascolo Calabria	Consumo di zona	20.36 ± 0.08^a	26.71 ± 1.04^b	24.10 ± 2.31^c
Cicoria Commerciale	Commerciale	8.04 ± 0.033^a	10.60 ± 0.06^b	3.74 ± 0.40^c

^{a,b,c} $p < 0.001$

5.3.0 Discussione e conclusioni

La ricerca è stata finalizzata alla valorizzazione della biodiversità italiana nel settore agro-alimentare, con particolare riferimento alle varietà di ortaggi e frutta al fine di valorizzare e promuovere il consumo delle varietà minori la cui scomparsa porterebbe ad una ulteriore riduzione di biodiversità. A tale scopo, si mirerebbe a recuperare l'interesse dei consumatori e dei produttori verso produzioni e prodotti tradizionali dell'agro-alimentare italiano che un tempo venivano coltivati e/o allevati in alcune regioni e che oggi rischiano di scomparire perchè sostituiti da prodotti ottenuti a partire da cultivar o da allevamenti spesso di importazione o anche nazionali, ma comunque di recente costituzione e di minor pregio, aventi un valore qualitativo spesso inferiore rispetto a quello della varietà/specie di origine. I nostri risultati evidenziano come i valori del potenziale antiossidante per alcuni prodotti tipici (ciliegie di Aprica) siano nettamente più alti rispetto ai prodotti commerciali.

Il contenuto dei singoli antiossidanti sembra indicare un “miglior potenziale salutistico” di questi alimenti rispetto ai corrispettivi commerciali. La cicoria

rappresenta un importante fonte di micronutrienti, grazie infatti alla sua resistenza al freddo, cresce durante tutto l'anno. Da sottolineare, come la cicoria selvatica abbia un contenuto maggiore in molecole bioattive rispetto a quella commerciale facendo supporre un potere salutistico maggiore.

In conclusione i prodotti tipici potrebbero avere, grazie alle loro proprietà antiossidanti, effetti salutistici migliori rispetto ai prodotti commerciali.

6.0.0 Conclusioni generali

Si inizia a parlare oggi di *un nuovo modo di fare agricoltura*: il sistema e la produzione agricola sono strettamente connessi alle esigenze del consumatore, alla ricerca di prodotti di qualità, che rispettino i target di sicurezza alimentare. Nell'ambito della linea di Ricerca 1 e 2 abbiamo investigato le differenze nelle proprietà antiossidanti in funzione dei fattori agronomici

I risultati hanno messo in evidenza l'importanza di fattori quali cultivar, pratiche agronomiche, condizioni climatiche e/o grado di maturazione dei frutti, la scelta dell'epoca di raccolta, tempi e condizioni di conservazione. L'ampia variabilità dei livelli di antiossidanti registrata nel corso della sperimentazione agricola nei prodotti ortofrutticoli studiati mostra la stretta correlazione tra il contenuto di molecole bioattive e l'ambiente.

In particolare le nostre prove sperimentali hanno messo in evidenza come la scelta di un'appropriata pratica agronomica rappresenti uno strumento chiave per ottenere prodotti ortofrutticoli "nutrizionalmente" migliori, massimizzando il contenuto di molecole bioattive e gli effetti benefici. Dalle prove sulle colture cellulari emerge il potenziale salutisco e la possibile "funzionalità" di alcuni alimenti e la possibilità dell'uso di estratti "concentrati in molecole antiossidanti" di origine alimentare nella prevenzione di malattie degenerative.

Come mostrano i risultati della linea di Ricerca 3 e 4 i prodotti tradizionali e locali rappresentino dei target di qualità alimentare.

In questo contesto è diventato indispensabile proteggere il nostro patrimonio alimentare puntando sulla specificità e sulla qualità alimentare, tenendo presente che le componenti che concorrono a definire un prodotto sono molteplici e complesse: la qualità dei prodotti ortofrutticoli si ottiene in campo ma deve essere conservata e "migliorata" durante la raccolta e il post-raccolta.

La preservazione degli ecosistemi e la tutela ambientale potrebbero quindi contribuire alla riqualificazione di ecotipi agricoli tradizionali e a dare "valore aggiunto" al prodotto di mercato.

La valorizzazione e la promozione dei prodotti dovrebbe essere basata sull'asserzione che la peculiarità di un prodotto sia strettamente connessa alle condizioni agronomiche e ai processi di produzione. Il territorio sta diventando un importante “fattore strategico di produzione e di mercato”: la promozione dei prodotti dovrebbe essere indirizzata verso un sistema di produzione sostenibile, che rispetti l'ambiente e i principi di tracciabilità/rintracciabilità.

In questo contesto dalla coalizione tra la chimica degli alimenti, la nutrizione e le scienze ambientali sta emergendo una nuova scienza, l'ecologia nutrizionale, atta a garantire un sistema di produzione sostenibile a partire dalla reintroduzione e dalla valorizzazione di specie locali coltivate in passato e ora trascurate, tutelando le scelte del consumatore.

7.0.0 Bibliografia

1. Kapsak WR, Schmidt D, Childs NM, Meunier J, White C. Consumer perceptions of graded, graphic and text label presentations for qualified health claims. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 48(3):248-56, 2008.
2. Sharpless K.A., Arce-Osuna M., Thoma J.B., Gill M.L.. Value assignment of retinyl palmitate, tocopherol and carotenoid concentrations in standard reference material 2383 (Baby food composite). *Journal of AOAC International*, 82, 288-296, 1999.
3. Maiani G., Pappalardo G., Ferro-Luzzi A., Raguzzini A., Azzini E., Guadalaxara A., Trifero M., Frommel T., Mobarhan S. Accumulation of beta-carotene in normal colorectal mucosa and colonic neoplastic lesions in humans. *Nutrition Cancer*, 24, 23-31, 1995.
4. Hertog M.G.L., Hollman C.H., Vanema D.P. Optimization of a qualitative HPLC determination of a potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1591-1598, 1992.
5. Serafini M., Bugianesi R., Salucci M., Azzini E., Raguzzini A., Maiani G. Effect of acute ingestion of fresh and stored lettuce (*Lactuca sativa*) on plasma total antioxidant capacity and antioxidant levels in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 88, 615-623, 2002.
6. Margolis S.A. & Schapira R. Liquid chromatographic measurement of L-ascorbic acid e D-ascorbic acid in biological samples. *Journal of Cromatography B*, 690, 25-33, 1997.

7. Benzie I.F.F. & Strain J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76, 1996.
8. Mosmann T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol.*, 65, 55-63, 1983.
9. Youdim K.A., Martin A., Joseph J.A. Incorporation of the elderberry antocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free Radic. Biol Med.*, 29(1), 51-60, 2000.
10. Heimler D., Isolani L., Vignolini P., Tombelli S., Romani A. Polyphenol content and antioxidative activity in some species of freshly consumed salads. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1724-29, 2007.
11. Arabbi P.R., Genovese M.I., Lajolo F.M. Flavonoids in Vegetable Foods Commonly Consumed in Brazil and Estimated Ingestion by the Brazilian Population. *J. Agric. Food Chem.* 52, 1124-1131, 2004.
12. Martínez-Sánchez A., Llorach R., Gil M.I., Ferreres F. Identification of New Flavonoid Glycosides and Flavonoid Profiles To Characterize Rocket Leafy Salads (*Eruca vesicaria* and *Diplotaxis tenuifolia*). *J. Agric. Food Chem.* 55 (4), 1356 -1363 , 2007.
13. Bennett R.N., Rosa E.A., Mellon F.A., Kroon P.A. Ontogenic profiling of glucosinolates, flavonoids, and other secondary metabolites in *Eruca sativa* (salad rocket), *Diplotaxis eruroides* (wall rocket), *Diplotaxis tenuifolia* (wild rocket), and *Bunias orientalis* (Turkish rocket). *J. Agric. Food Chem.* 54(11), 4005-4015, 2006.

14. Weckerle B., Michel K., Balázs B., Schreier P., Tóth G. Quercetin 3,3',4'-tri-O-beta-D-glucopyranosides from leaves of *Eruca sativa* (Mill.). *Phytochemistry*. 57(4), 547-551, 2001.
15. Pellegrini N., Serafini M., Colombi B., Del Rio D., Salvatore S., Bianchi M., Brighenti F. Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. *J. Nutr.* 133, 2812–2819, 2003.
16. Nicolle C., Carnat A., Fraisse D., Lamaison J.L., Rock E., Michel H., Amouroux P., Remesy C. Characterisation and variation of antioxidant micronutrients in lettuce (*Lactuca sativa* folium). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84(15), 2061 – 2069. Crop & Food Research Confidential Report No. 1473 Nutritional attributes of salad vegetables L J Hedges & C E Lister August 2005.
17. Miller N.J., Rice-Evans C., Davies M.J., Gopinathan V., Milner V. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science (Lond)*, 84, 407-412, 1993.
18. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237, 1999.
19. Grasset E., Pinto M., Dussaulx E., Zweibaum A. and Desjeux J. F.. Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: electrical parameters. *Am. Physiol. Cell Physiol.*, 247, C260-C267, 1984.

20. Coelho A.F.S., Gomes É.P., Sousa A., Glória, M.B.A. Effect of irrigation level on yield and bioactive amine content of American lettuce. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85(6), 1026-1032, 2005.
21. Dudjak J., Lachman J., Miholová D., Kolihová D., Pivec, V. Effect of cadmium on polyphenol content in young barley plants (*Hordeum vulgare* L.). *Plant, Soil and Environment*, 50 (11), 471–477, 2004.
22. Watkins, C.B. & Pritts, M.P. The influence of cultivars on postharvest performance of fruits and vegetables. (2001). *Proceedings of the Fourth International Conference on Postharvest Science. Acta Horticultura*., 1(553), 59-63.
23. Lee S.K. & Kader A.A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*, 20, 207–220, 2000.
24. Zushi, K. & Matsuzoe, N. Effect of soil water deficit on vitamin C, sugar, organic acid, amino acid and carotene contents of large-fruited tomatoes. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 67(6), 927-933, 1998
25. Stea A., Leo L., Serio F., Zacheo, G. Nutrient solutions can influence the (poly)phenolic composition of tomato fruits? *Proceedings of the XLIX Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress Potenza, Italy – 12/15 September 2005*.

26. Caris-Veyrat C., Amoit M. J., Tyssandier V., Grasselly D., Buret M., Mikolajczak M., Guillard J., Bouteloup-Demange C., Borel P. Influence of organic versus conventional practice on the antioxidant microconstituent content of tomatoes and derived purees, consequences on antioxidant plasma status in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6503–6509, 2004.
27. Mitchell A.E., Hong Y.J., Koh E., Barrett D.M., Bryant D.E., Denison R.F., Kaffka S. Ten-year comparison of the influence of organic and conventional crop management practices on the content of flavonoids in tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(15), 6154-6159, 2007.
28. George B., Kaur C., Khurdiya D.S., Kapoor H.C. Antioxidants in tomato (*Lycopersicon esculentum*) as a function of genotype. *Food Chemistry*, 84, 45-51, 2004.
29. Ghiselli A., Serafini M., Maiani G., Azzini E., Ferro-Luzzi A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radic Biol Med.* 18(1):29-36, 1995.
30. Tulipani S, Mezzetti B, Capocasa F, Bompadre S, Beekwilder J, de Vos CH, Capanoglu E, Bovy A, Battino M. Antioxidants, phenolic compounds, and nutritional quality of different strawberry genotypes. *J Agric Food Chem.* Feb 13;56(3):696-704, 2008.
31. Aaby K, Wrolstad RE, Ekeberg D, Skrede G. Polyphenol composition and antioxidant activity in strawberry purees; impact of achene level and storage. *J Agric Food Chem.* Jun 27;55(13):5156-66, 2007.

32. Jacob R.A., Spinozzi G.M., Simon V.A., Kelley D.S., Prior R.L., Hess-Pierce B. and Kader A.A. Consumption of cherries lowers plasma urate in healthy women. *J Nutr* 133:1826-1829, 2003.
33. Jarvis MC, Mackenzie E and Duncan HJ, The textural analysis of cooked potato. Swelling pressure of starch during gelatinisation. *Potato Research*, **35**, 93–102, 1992.
34. Liu M., Li X.Q., Weber C., Lee C.Y., Brown J., Liu R.H. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2926-2930, 2002.
35. Kalt W., Forney C.F., Martin A., Prior R.L. Antioxidant capacity, vitamin C phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 4638-4644, 1999.
36. Leontowicz M, Gorinstein S, Leontowicz H, Krzeminski R, Lojek A, Katrich E, Milan i, Martin-Belloso O, Soliva-Fortuny R, Haruenkit R and Trakhtenberg S, Apple and pear peel and pulp and their influence on plasma lipids and antioxidant potentials in rats fed cholesterol-containing diets. *J Agric Food Chem* **51** (19), 5780 -5785, 2003.
37. Ju Z. and Bramlage W.J. Phenolics and lipid-soluble antioxidants in fruit cuticle of apples and their antioxidant activities in model systems. *Post. Biol. Techn.* **16**, 107–118 , 1999.
38. Alasalvar C, Grigor JM, Zhang D, Quantick PC and Shahidi F, Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. *J Agric Food Chem.*, **49**, 1410–1416, 2001.

39. Llorach R, Tomas-Barberan FA and Ferreres F, Lettuce and chicory byproducts as a source of antioxidant phenolic extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 5109-5116, 2004.