



Consorzio di Ricerca sul Rischio Biologico
in Agricoltura - Centro Regionale per la
Sicurezza dei Prodotti Agroalimentari

Tracciabilità e sicurezza degli alimenti: un valore aggiunto alle produzioni agricole del territorio siciliano

Progetto finanziato dall'Assessorato Regionale dell'Agricoltura, dello Sviluppo Rurale e della
Pesca Mediterranea – Regione Siciliana

Prefazione.....	5
INTRODUZIONE.....	6
ASPETTI NUTRIZIONALI E SALUTISTICI	7
ASPETTI GENETICI.....	9
SICUREZZA ALIMENTARE	11
Contaminazioni chimiche	11
Contaminazioni biologiche.....	12
CAMPIONAMENTO, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE.....	14
MATERIALI E METODI.....	18
Metodi in vitro per lo studio chimico fisico degli antiossidanti	18
METODO ABTS.....	18
METODO DPPH.....	19
METODO FOLIN CIOCALTEAU	19
Metodi per la caratterizzazione molecolare e l'identificazione varietale.....	20
Determinazione di residui di prodotti fitosanitari	21
Determinazione di Aflatossine	23
Determinazione di Ocratossina A.....	24
ANALISI DEI RESIDUI DI PRODOTTI FITOSANITARI.....	25
LE UVE.....	27
IL VINO.....	34
LA FRAGOLA.....	40
IL MELONE	45
LA NOCCIOLA.....	49
L'ARANCIA.....	54
IL LIMONE	58
IL CARCIOFO	62
IL POMODORO	67
LA CAROTA NOVELLA DI ISPICA	71
CONCLUSIONI.....	74
BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA.....	75

Prefazione

Molto spesso sentiamo parlare di alimentazione mediterranea e qualche volta dei prodotti agricoli del nostro territorio come di qualcosa di unico dalla qualità superiore ai corrispondenti prodotti di altri paesi dell'area mediterranea o di altri continenti.

Questi benefici non sono attribuibili ai “nostri prodotti” in quanto tali, ma soltanto la ricerca scientifica, sempre a sostegno delle attività produttive, può supportare le qualità intrinseche di un prodotto agricolo o di un suo derivato.

Così, questo lavoro scientifico di ricerca applicata, sicuramente non esaustivo ma condotto a 360°, valorizzando le qualità intrinseche dei prodotti esaminati su dati compositivi, fattori di sicurezza alimentare, approfondimenti di tracciabilità supportata da applicazioni di tecniche di biologia molecolare, presenta aspetti di assoluta originalità. Interessante è l'aver esaminato nelle indagini l'uva ed il vino, le arance, le fragole, il pomodoro, le nocciole, i limoni, le carote, il carciofo, il melone che non a caso presentano degli aspetti compositivi legati alla presenza di antiossidanti, potenzialità di azioni complementari ed effetti sinergici sulla salute, che già gli antichi, nostri avi, quasi conoscevano poiché abbinavano ad esempio le fragole al vino senza sapere che così introducevano nella dieta tutte e sei le famiglie degli antociani, o ancora, bevendo come unica bevanda alcolica il vino durante i pasti, aumentavano la loro longevità senza sapere dell'esistenza dei polifenoli dei vini e dei loro effetti salutistici.

Il progetto “Tracciabilità e Sicurezza degli Alimenti: un valore aggiunto alle produzioni agricole del Territorio Siciliano” nasce con l'intento di focalizzare l'interesse su una filiera di notevole importanza per il sistema produttivo siciliano che è quella viti-vinicola, ed alcuni prodotti agricoli di qualità maggiormente coltivati nella regione siciliana.

Ogni prodotto sottoposto ad analisi è stato studiato attraverso una serie di attività che prevedono l'applicazione di tecniche analitiche e strumentazioni all'avanguardia presenti nel Laboratorio del Co.Ri.Bi.A., con lo scopo di caratterizzare, tipizzare, valutare e tracciare i prodotti in esame. La realizzazione dell'obiettivo del progetto, ha seguito un percorso che passa attraverso lo sviluppo e validazione di ulteriori metodiche analitiche alternative e complementari, in grado, operando sia a livello fenotipico che genotipico, di dare indicazioni sui diversi aspetti di una produzione agraria (filiera) o di un prodotto agro-alimentare, quali sicurezza e qualità, genuinità e valore nutrizionale.

Giacomo Dugo
Presidente del consorzio Co.Ri.Bi.A.

INTRODUZIONE

Il Progetto “Tracciabilità e Sicurezza degli Alimenti: un valore aggiunto alle produzioni agricole del Territorio Siciliano” si inserisce nell’ambito degli indirizzi della politica agroalimentare siciliana, che mira anche ad individuare elevati standard qualitativi delle produzioni siciliane.

Il progetto, al fine di contribuire allo sviluppo economico del comparto agroalimentare siciliano, si è posto l’obiettivo di evidenziare e valorizzare elementi di singolarità ed esclusività delle produzioni agricole siciliane e di mettere a punto uno strumento in grado di difendere i prodotti già riconosciuti da marchi di qualità da possibili contraffazioni.

La ricerca ha riguardato diversi prodotti di notevole importanza per il sistema produttivo siciliano, ed è stata focalizzata sia sugli aspetti salutistici, che su altri elementi in grado di consentire la tracciabilità dei prodotti.

Il progetto è stato messo a punto, sia per rispondere alla sempre maggiore domanda di sicurezza da parte del consumatore, che per venire incontro alla esigenze dei produttori agricoli di valorizzare i propri prodotti con un efficace sistema di tracciabilità che ne tuteli l’origine. La sicurezza alimentare e la tracciabilità degli alimenti, infatti, rappresentano strumenti essenziali, a tutela degli interessi dei cittadini-consumatori, per garantire che i mercati commercializzino alimenti sicuri, salubri e di qualità.

Lo studio e le ricerche, oggetto del presente lavoro, se pur in maniera ed in ambito limitato, costituiscono un esempio di come le produzioni agricole possono vantaggiosamente avvalersi di un sistema di tracciabilità dei prodotti, per garantire e valorizzare le peculiari caratteristiche di salubrità, contribuendo, in definitiva, allo sviluppo economico del comparto agroalimentare siciliano.

Rosaria Barresi

Dirigente Generale Dipartimento Regionale dell’Agricoltura dell’Assessorato Regionale
dell’Agricoltura, dello Sviluppo Rurale e della Pesca Mediterranea

ASPETTI NUTRIZIONALI E SALUTISTICI

Le modificazioni dello stile di vita nell'ambito delle società industrializzate hanno messo in evidenza nuove e pressanti esigenze. L'alimento non è infatti più visto solo come mezzo di sostentamento o come immagine edonistica, e d'altra parte l'alimentazione è la base su cui costruire la salute. Se l'eccesso o l'errata somministrazione di cibi può essere fonte di patologie e malesseri, così un'accurata scelta degli stessi può assumere connotazioni preventive ed anche curative, come evidenziato nei cibi funzionali. Con l'aumentato interesse per questi alimenti salutistici, cresce anche il riconoscimento scientifico per molecole di origine vegetale (per esempio composti polifenolici), che sembrano avere un ruolo più spiccato nella prevenzione di patologie come arteriosclerosi, artrite, cataratta e diabete, in parte legate allo stile di vita. Per questo motivo molti prodotti vegetali, ricchi di sostanze ad azione antiossidante, stanno ricevendo attenzione da parte di tecnologi, nutrizionisti, medici e ricercatori.

Tra i composti bioattivi i polifenoli rivestono un ruolo importante poiché, a differenza della maggior parte dei carotenoidi e delle vitamine, non sono sintetizzate chimicamente e quindi devono essere estratte dalle fonti vegetali. Catechine e antociani, prodotti dal metabolismo secondario delle piante, possiedono un ampio spettro di azione che li rende in diverse occasioni agenti antinfiammatori, antiallergenici, antimicrobici, vasodilatatori, antitrombotici, cardioprotettivi e antiossidanti. Le catechine sono flavanoli presenti in molti alimenti quali vino, tè, cioccolato, frutta ed ortaggi. Il loro impiego anche come integratori nell'alimentazione umana ed animale è in rapida crescita, in particolare la loro aggiunta ai mangimi si basa sul presupposto che gli animali fungono da vettori dei composti funzionali che trasferiscono ai tessuti e da questi a carne, uova e latte.

Il corpo umano, per affrontare le specie reattive all'ossigeno (ROS), è provvisto di un sistema di difesa che è costituito da molecole, presenti in basse concentrazioni, dette antiossidanti, che sono in grado di neutralizzare i radicali liberi, donando loro un elettrone e bloccando la perossidazione lipidica.

Nei cibi, gli antiossidanti hanno fondamentalmente quest'ultima funzione. Nei sistemi biologici, la definizione di antiossidante è stata estesa a qualsiasi sostanza che, presente a basse concentrazioni rispetto a quelle di un substrato ossidabile, ritarda significativamente o previene l'ossidazione di quel substrato.

I polifenoli di origine vegetale sono sicuramente la classe di antiossidanti naturali più complessa e differenziata, ogni tipo di pianta sintetizza composti fenolici in quantità e tipo diverso. Sono composti ubiquitari e fondamentali per la fisiologia della pianta, contribuiscono

alla resistenza nei confronti di microrganismi ed insetti, alla pigmentazione ed alle caratteristiche organolettiche. I polifenoli comprendono diverse classi di composti, in grado di inibirne la formazione dei radicali liberi e bloccarne l'azione. Hanno differenti attività biologiche, tra cui le più importanti sono l'attività antiossidante, gli effetti protettivi sui capillari sanguigni e gli effetti inibitori nelle patologie tumorali. Il quantitativo dei polifenoli nelle specie di interesse agrario può essere influenzato da alcuni fattori come la varietà, le condizioni climatiche, le tecniche colturali, l'epoca di raccolta e le condizioni di conservazione. Nel caso dei composti fenolici sono importanti anche i metodi di preparazione degli alimenti. Un altro metabolita importante per la salute è il resveratrolo libero o glicosilato insieme al piceatannolo e allo pterostilbene. La sostanza si comporta come fitoalessina naturale sintetizzata in risposta sia ad attacchi fungini, sia all'esposizione dei raggi ultravioletti e dell'ozono. Il resveratrolo è presente in molte altre specie vegetali, come i mirtilli e le nocciole. Dal punto di vista nutrizionale è importante che gli antiossidanti polifenolici vengano assunti quotidianamente nella dieta in quanto essi vengono metabolizzati velocemente dal nostro organismo, e per tale ragione l'apporto giornaliero dovrebbe essere pari a circa 1 grammo. Il quantitativo di polifenoli totali può essere determinato attraverso la riduzione del reattivo di Folin-Ciocalteu ad opera dei fenoli. Tutti i campioni fenolici vengono dosati con questo saggio e la preparazione del campione è indispensabile per evitare le numerose interferenze. Per avere una stima dei polifenoli che non sia solo quantitativa ma anche qualitativa è possibile adottare ulteriori tecniche. La più versatile è la cromatografia liquida ad alta prestazione, in fase inversa o normale a seconda della classe di composti. La disponibilità di rilevatori quali gli spettrometri di massa con interfaccia elettrospray, particolarmente adatta a questa classe di composti, accoppiabili a rilevatori UV-VIS a fotodiodi, può semplificare il lavoro di riconoscimento dei singoli polifenoli, permettendo di acquisire simultaneamente importanti informazioni strutturali assieme allo spettro UV-VIS. La diversità nella struttura chimica è responsabile dell'azione antiossidante, antinfiammatoria, antibatterica, antimutagena ed anticancerogena di un flavonoide rispetto ad un altro. Molti sono i flavonoidi che assumiamo quotidianamente attraverso l'alimentazione a base di ortaggi e frutta; ad esempio la quercetina e l'apigenina, abbondante nella fragola e nella buccia degli agrumi e il glicoside trans-resveratrolo e galangina nel carciofo.

ASPETTI GENETICI

La definizione del profilo genetico delle cultivar permette la corretta identificazione varietale, il riordino del germoplasma esistente attraverso la definizione dei casi di omonimia e sinonimia, la costruzione di banche per il riconoscimento varietale. L'applicazione delle metodiche molecolari alle produzioni agricole e ai processi di trasformazione dei prodotti agro-alimentari risultano un mezzo ottimale per verificare e mantenere la corretta identità del materiale vegetale per la certificazione genetica, fornendo risultati rapidi e sicuri per molte specie da frutto, controllando la rispondenza varietale lungo la filiera di produzione.

I marcatori utilizzati nella ricerca sono prevalentemente di tipo microsatellite (o Simple Sequence Repeat - SSR), sono tra i più utili nell'analisi genetica in quanto sono dotati di elevato polimorfismo, hanno un'ampia distribuzione nel genoma, sono codominanti, facili da analizzare e permettono un'alta ripetibilità delle analisi; hanno inoltre il vantaggio di fornire risultati oggettivi non influenzati dai fattori ambientali.

L'impiego di tecnologie di analisi molecolare ha dimostrato di poter stabilire il livello di variabilità intervarietale e di caratterizzare le cultivar esaminate.

La tecnica del "fingerprinting", consente di monitorare la variabilità genetica presente a livello del DNA attraverso l'utilizzo di uno o più marcatori che caratterizzano il genoma e distinguono genotipi diversi anche se molto simili. Esso rappresenta un sistema efficace di identificazione varietale in quanto supera i limiti della discriminazione basata su descrittori fenologici quali l'influenza di fattori esterni che possono alterare il fenotipo e i lunghi tempi necessari per i rilievi.

Con questa tecnica il polimorfismo viene messo in evidenza amplificando le sequenze dei microsatelliti usando, come oligonucleotidi di innesco, *primers* marcati con coloranti fluorescenti e complementari alle regioni che fiancheggiano le STR.

I prodotti, risultanti dall'amplificazione sono poi separati per elettroforesi capillare ed analizzati, in analizzatori genetici automatici, per determinare le varianti alleliche presenti nei *loci* presi in considerazione.

Nell'elettroforesi capillare i frammenti di DNA amplificati vengono iniettati in un sottile tubo capillare riempito con un polimero di corsa e vengono separati per migrazione indotta dall'applicazione di un campo elettrico. I vari frammenti vengono poi rilevati, man mano che attraversano il capillare, da un sistema che sfrutta la fluorescenza dei *primers*. Questo procedimento consente ai diversi frammenti di essere amplificati e di correre poi simultaneamente, una procedura nota come *multiplex*. Nella porzione terminale del capillare, i

frammenti di DNA sono colpiti da un raggio laser che eccita le molecole fluorescenti con cui sono stati marcati i *primers*. Ciascuno dei fluorocromi, colpiti ed eccitati dal laser, emette una diversa lunghezza d'onda. Le emissioni fluorescenti sono separate in base alla lunghezza d'onda nella camera CCD (*Charge Coupled Device*). Un *software*, poi, converte il *pattern* di emissioni in una serie di picchi colorati (elettroferogramma). Tale conversione permette di leggere i risultati ottenuti.

I picchi allelici sono identificati da un numero e si differenziano in base ai pesi molecolari. L'attribuzione dei pesi molecolari e quindi la grandezza degli alleli, che dipende dal numero di ripetizioni, viene eseguita dal *software* utilizzando come riferimento una scala allelica che contempla tutte le varianti alleliche di riferimento dei vari loci esaminati. Tale scala consiste in uno standard di frammenti di DNA a dimensioni nota, interno al campione, marcato con un fluorocromo (ROX).

Per la caratterizzazione dal punto di vista genetico, è stata scelta come metodica di elezione quella che effettua l'analisi di marcatori molecolari per l'identificazione di alcune varietà di *Vitis vinifera*, con lo scopo di ottenere i profili genetici identificativi (fingerprinting).

SICUREZZA ALIMENTARE

Contaminazioni chimiche

I prodotti fitosanitari sono le sostanze attive o i preparati contenenti una o più sostanze attive utilizzate per la lotta contro i parassiti delle piante e nel controllo delle infestanti nella pratica agronomica. Il controllo dei residui di prodotti fitosanitari negli alimenti rappresenta una delle priorità sanitarie più rilevanti nell'ambito della sicurezza alimentare, ed ha la finalità di garantire un livello elevato di protezione del consumatore e prevenire i rischi per la salute pubblica.

Nell'UE è possibile utilizzare prodotti fitosanitari soltanto se previamente è stato scientificamente stabilito che:

1. non hanno effetti nocivi sui consumatori, gli agricoltori e la popolazione residente;
2. non provocano conseguenze inaccettabili per l'ambiente;
3. hanno un adeguato livello di efficacia.

La quantità di residui riscontrata negli alimenti deve essere sicura per i consumatori ed essere la più bassa possibile. Il regolamento comunitario CE396/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio del 23 febbraio 2005, e suoi successivi aggiornamenti, è entrato in piena applicazione il 1 settembre 2008. Esso armonizza i *limiti massimi di residui* (LMR) in tutti i Paesi dell'Unione europea e disciplina il processo di fissazione degli LMR dei prodotti fitosanitari in prodotti di origine vegetale e animale destinati al consumo umano.

Ogni valore di LMR proposto è stato sottoposto a valutazione del rischio cronico e acuto e tutti i valori di LMR che non hanno mostrato evidenza di rischi per la salute umana sono stati inseriti nell'allegato III.

I valori di LMR che hanno evidenziato problemi di rischio sono stati rivalutati per verificare la possibilità di ottenere un valore tale da essere considerato sicuro per il consumatore, il cosiddetto *valore soglia*, derivante dal modello EFSA, basato sulla tossicità della sostanza. Il valore soglia rappresenta quel valore di residuo che permette di escludere rischi per il consumatore. Nei casi in cui non sono stati fissati valori di residuo sicuri per il consumatore, si utilizza come valore di LMR il limite di determinazione analitica.

Per il monitoraggio dei residui di antiparassitari, è necessario sviluppare metodi di analisi che abbiano bassi limiti di quantificazione (LOQ), oltre che elevata efficienza e rapidità, in modo da consentirne la determinazione in tempo reale.

Contemporaneamente, non solo aumenta di continuo il numero di sostanze da determinare (centinaia), ma è molto ampio l'intervallo di combinazioni matrice - fitofarmaco per le quali sono richiesti metodi analitici affidabili.

In letteratura sono descritte numerose tecniche per estrarre i fitofarmaci dalle differenti matrici e metodi analitici per determinarne la concentrazione.

In questo tipo di determinazioni, la preparazione del campione riveste un ruolo sempre più importante, soprattutto per quanto riguarda la possibilità di contenere il consumo di solventi e reagenti e di utilizzare un metodo che fornisca i risultati in tempi brevi, requisiti particolarmente importanti per quei laboratori che eseguono di routine un elevato numero di determinazioni. Da questo punto di vista, un metodo di estrazione innovativo, che consente di superare molti inconvenienti, è rappresentato da quello che va sotto l'acronimo QuEChERS, (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe = veloce, facile, economico, efficace, robusto e sicuro).

Il metodo QuEChERS (norma europea UNI EN 15662:2009, Alimenti di origine vegetale, Determinazione dei residui dei pesticidi utilizzando GC-MS e/o LC-MS/MS dopo estrazione/separazione con acetonitrile e purificazione mediante SPE dispersiva - Metodo QuEChERS) è un metodo multiresiduale per il controllo ufficiale dei residui di fitofarmaci negli alimenti. Il suo principale vantaggio è quello di essere in grado di estrarre fitofarmaci appartenenti anche a classi diverse da differenti matrici. L'unico limite, è costituito dal fatto che richiede strumentazioni costose come LC-MS/MS oppure GC-MS/MS per l'identificazione e la quantificazione degli analiti.

Contaminazioni biologiche

Le contaminazioni degli alimenti da micotossine, metaboliti secondari prodotti da alcuni funghi, sono state segnalate e studiate ormai da lungo tempo, come elementi di rischio per la salute dell'uomo e degli animali. Dai diversi studi effettuati ne è emersa la presenza in svariate matrici alimentari utilizzate nell'abituale dieta umana e animale. La gravità e la complessità del problema implica la necessità di azioni volte a minimizzare, fino ad annullare la presenza di tali sostanze mettendo in risalto i pregi delle produzioni e identificandone caratteristiche che ne definiscono la qualità e il valore salutistico. La tematica dei rischi associati alla presenza di micotossine negli alimenti ha progressivamente assunto per le Organizzazioni Internazionali, l'Unione Europea e gli Enti Nazionali, importanza crescente, dimostrata dalle numerose normative e linee guida che, sempre più frequentemente, vengono emanate nel

settore della sicurezza alimentare. Il fine dell'attività legata all'analisi delle micotossine, oggetto di studio del Co.Ri.Bi.A., è quello di valutare la salubrità degli alimenti, la sicurezza per la salvaguardia del benessere e la salute dei consumatori.

Considerata la pericolosità e la loro larga incidenza in una vasta gamma di alimenti correntemente consumati dalla popolazione, diventa sempre più centrale effettuare un controllo considerando la filiera produttiva e i rischi di contaminazione legati ai passaggi intermedi tra produttore e consumatore finale.

Le derrate alimentari più frequentemente contaminate da aflatossine, sia durante la coltivazione che durante il raccolto e l'immagazzinamento, sono: i cereali, la soia, i legumi, il cotone, la frutta secca e le spezie; spesso queste sostanze non danno traccia visiva della loro presenza, comunque probabile quando le derrate alimentari appaiono palesemente ammuffite. Le aflatossine vengono sintetizzate prevalentemente da due specie di *Aspergillus*, l'*A. flavus* (da cui il nome) e l'*A. parasiticus*. Il primo sintetizza aflatossine di tipo B (B₁ e B₂), il secondo produce aflatossine sia di tipo B che di tipo G (G₁ e G₂); oltre a queste, sono state individuate altre tipologie di aflatossine (all'incirca una ventina in tutto, classificate in base alla fluorescenza), ma vengono considerate rilevanti - per diffusione e tossicità - solamente le quattro elencate e l'aflatossina M₁, sostanza derivante dal metabolismo della B₁ in animali alimentati con mangimi contaminati. La presenza in un alimento di *Aspergillus* comunque, non è necessariamente sinonimo di contaminazione da aflatossine; queste vengono infatti prodotte solo se le condizioni di umidità e temperatura sono favorevoli. Ad incrementare la pericolosità delle aflatossine è la loro trasformazione in derivati altrettanto pericolosi; quando il foraggio contaminato da aflatossina B₁ (classificata secondo la IARC come sostanza cancerogena per l'uomo) viene assunto dagli animali, quest'ultima viene idrossilata a livello epatico e trasformata in aflatossina M₁ (classificata secondo la IARC come sostanza possibilmente cancerogena per l'uomo). Inoltre la loro termostabilità non permette una completa eliminazione dai prodotti alimentari. La tossicità scaturisce molto probabilmente dalla capacità di legarsi agli acidi nucleici e di interferire con la sintesi proteica; oltre che a livello epatico (organo bersaglio principale) queste sostanze agiscono negativamente sul sistema immunitario e favoriscono la comparsa di tumori anche in sedi extraepatiche (cistifellea, colon, ghiandole salivari, polmoni, rene, retto, stomaco, tessuto sottocutaneo e osseo). Infine, ricordiamo come le aflatossine possiedono un'elevata attività fetotossica e teratogena (sono lesive e mutageniche per il feto). Il regolamento (CE) n. 1831/2003 definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari tra i quali le aflatossine nella frutta secca. Il metodo utilizzato per le analisi delle aflatossine ha rispettato la norma ISO

17025. L'obiettivo è quello di garantire la qualità e la sicurezza alimentare attraverso la certificazione e la tracciabilità delle produzioni agro-alimentari, rivolgendo l'attenzione all'individuazione dei caratteri peculiari delle produzioni tipiche siciliane per accrescere il loro valore aggiunto.

CAMPIONAMENTO, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

Il campionamento rappresenta, sull'intero processo del controllo analitico, un momento di elevata criticità, in quanto:

- a) condiziona i risultati di tutte le operazioni successive;
- b) incide in misura notevole sull'attendibilità totale del risultato dell'analisi;
- c) può essere fonte di contestazioni dei risultati analitici qualora il campionamento non sia correttamente eseguito ed i campioni non siano stati correttamente identificati, sigillati, spediti e conservati.

L'osservanza delle corrette modalità di campionamento è finalizzata a ridurre i fattori di criticità; a tal proposito sono state identificate le seguenti cause che avrebbero potuto determinare una mancata rappresentatività del campione rispetto alla partita/lotto dalla quale è stato prelevato, che sono dovute principalmente:

- alla disomogeneità ed alle caratteristiche chimico-fisiche della massa;
- alla possibilità di inquinamenti e contaminazioni nel corso del campionamento;
- alla possibilità di modificazione o alterazione di alcuni parametri analitici del campione durante il prelievo, il trasporto o la conservazione del medesimo.

Per tali motivi il campionamento è stato eseguito con la massima accuratezza dai responsabili incaricati i quali hanno dovuto:

- eseguire il campionamento secondo modalità definite nelle istruzioni operative;
- porre attenzione nella identificazione della partita/lotto oggetto di campionamento (evitando di mescolare e confondere lotti diversi);
- utilizzare strumentazione adatta allo scopo e perfettamente pulita;
- tenere presente le determinazioni analitiche che devono essere effettuate e gli eventuali suggerimenti da fornire al laboratorio di prova al quale il campione è destinato;
- adottare modalità di conservazione che garantiscano l'adeguata integrità del campione;

- consegnare il campione al laboratorio di analisi nel più breve tempo possibile e comunque non oltre le 72 ore.

Le istruzioni operative (IO), secondo il Sistema Qualità adottato dal laboratorio, indicano che la strumentazione utilizzata per il prelievo, trasporto e conservazione del campione deve essere realizzata con materiali chimicamente inerti, tali da non contaminare i prodotti campionati. In particolare gli strumenti che entrano in contatto con il prodotto campionato devono essere ergonomici, facilmente pulibili, nonché resistenti alle sollecitazioni conseguenti all'uso.

Gli strumenti ed il materiale di cui l'ispettore dovrà essere dotato al momento del prelievo sono ad esempio:

- guanti di lattice monouso per la manipolazione delle matrici da campionare;
- sacchetti di plastica da congelatore, capacità 4 litri;
- contenitori in vetro o altro materiale idoneo per sostanze liquide (es. latte);
- contenitori alveolari per le uova;
- materiale per sigillare e identificare i campioni (es. spago fino per la chiusura dei sacchetti; piombini o altro materiale idoneo per sigillare i campioni; cartellini per etichettare i campioni);
- taglierino o coltello da innesto per il prelevamento di parti verdi;
- secchio di plastica oppure sacchi di plastica tipo rifiuti per la raccolta del campione in campo;
- telo di plastica dimensioni 3 metri x 2 metri, quale base per la formazione del campione finale e delle relative aliquote;
- contenitori termici per il trasporto dei campioni;
- sacchetti auto sigillanti.

Ogni operazione di raccolta, manipolazione, divisione, taglio, omogeneizzazione, formazione del campione finale ed aliquote, ecc., deve essere effettuata con strumenti monouso o, in alternativa, perfettamente puliti, in maniera idonea, prima dell'uso. Le predette operazioni devono avvenire sopra un telo di plastica pulito che eviti al materiale di venire inquinato con sostanze che possono portare contaminazioni ambientali indirette.

Fasi del processo del campionamento

Il processo di campionamento è stato svolto secondo le fasi di seguito schematizzate:

- Scelta e identificazione della partita
- Verifica della omogeneità della massa
- Prelievo dei campioni elementari e eventuale omogeneizzazione

- Riduzione del campione globale per formare il campione finale costituito dalle aliquote
- Etichettatura
- Verbalizzazione
- Conservazione e consegna in laboratorio

La scelta della partita da cui prelevare i campioni elementari non deve essere casuale ma deve avvenire sulla base di un'analisi del rischio connessa alla finalità del campionamento stesso, quindi alla successiva esecuzione della prova di laboratorio.

Della partita da campionare è necessario individuare l'entità (peso, volume, numero di confezioni, ecc), controllare l'appartenenza allo stesso lotto, verificare le condizioni di omogeneità della massa. Qualora il lotto non risulti omogeneo si procede, se possibile, al rimescolamento e all'omogeneizzazione della massa. In via alternativa è necessario adottare le modalità di prelevamento più opportune per i prodotti non omogenei oppure, e sempre se possibile, ridurre la partita in lotti più piccoli e omogenei.

Prelievo del campione elementare e formazione del campione globale/finale ed aliquote

La modalità di campionamento è strettamente legata al luogo (in magazzino, in fase di produzione, in campo) e al tipo di campione da prelevare (terreno agrario, prodotti di origine vegetale o animale, ecc).

Se il campione globale relativo ad una partita di prodotto sfuso risultasse troppo grande, il campione finale dovrà essere ricavato suddividendolo in quarti e scartandone i due di questi diametralmente opposti, mescolando e dividendo il quantitativo rimasto, sino al raggiungimento della quantità richiesta.

Etichettatura

Ogni recipiente contenente l'aliquota del campione globale deve essere sigillato in maniera da evitare contraffazioni al medesimo e dotato di etichetta che consenta di collegare il campione al verbale di campionamento.

Verbalizzazione

Le operazioni effettuate ai fini del campionamento di materiale da sottoporre ai controlli di cui al presente documento devono essere puntualmente riportate in un verbale di campionamento secondo gli schemi stabiliti internamente al laboratorio.

In particolare per ogni matrice campionata sono stati compilati degli appositi moduli:

- Foglio di campionamento.
- Foglio di accettazione campione.
- Foglio di consegna campione.

Nell'ambito del progetto la scelta delle matrici ha tenuto conto dei diversi distretti produttivi del territorio siciliano evidenziando per ognuno di essi le produzioni più rappresentative.

Sono state campionate le seguenti matrici:

1. Uve e vini (*Vitis vinifera*) Nero d'avola e Perricone.
2. Fragola (*Fragaria vesca*) varietà Albion, Elsenore, Fortuna, San Andreas.
3. Melone (*Cucumis Melo*) varietà Elios, Purceddu d'Alcamo (foglie) e Cartucciaro (foglie e polpa).
4. Nocciolo (*Corylus avellana*) "Nostrale di Sicilia" o "Racinante" e "Tonda gentile delle Langhe".
5. Arancia (*Citrus Sinensis*) varietà Sanguinello e Tarocco Nucellare, Tarocco Comune e Tarocco Gallo (foglie e polpa).
6. Limone (*Cytrus limon*) varietà Monachello (foglie e polpa).
7. Pomodoro (*Solanum lycopersicum* o *Lycopersicum esculentum*) varietà Pizzutello di Paceco, ciliegino Genio e Scirè (foglie e polpa).
8. Carciofo (*Cynara scolymus*) varietà Spinoso di Menfi e Romanesco.
9. Carota di Ispica (*Daucus carota*) varietà Chabor.

MATERIALI E METODI

Metodi in vitro per lo studio chimico fisico degli antiossidanti

- *METODO ABTS*

Il metodo ABTS utilizza una misura di tipo spettrofotometrico per determinare la capacità antiossidante di un campione. Tramite uno spettrofotometro UV-Vis viene misurata l'assorbanza di una soluzione contenente il radicale ABTS^{•+}, generato per ossidazione dell'ABST (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-solfonato), una sostanza incolore che nella forma radicalica si colora assorbendo a lunghezze d'onda caratteristiche nel range del visibile. L'aggiunta alla soluzione di ABTS^{•+} di molecole antiossidanti, che possono agire tramite cessione sia di idrogeno che di un elettrone, determina la riduzione del radicale alla forma incolore, con conseguente decolorazione della miscela di reazione. Tale decolorazione, proporzionale alla quantità di antiossidante presente, può essere misurata come diminuzione dell'assorbanza in un certo tempo ad una specifica lunghezza d'onda (734 nm). Il potere antiossidante viene espresso per confronto con i valori di assorbanza misurati per quantità note di una molecola antiossidante scelta come standard di riferimento, che di solito è Trolox (in tal caso si parla di attività antiossidante TEAC Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). I risultati sono generalmente espressi come equivalenti di Trolox (acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico), ossia come concentrazione di una soluzione di Trolox (mM) con una capacità antiossidante equivalente a quella trovata per una soluzione 1 mM della sostanza in esame. Il saggio per la misura del potere antiossidante, basata sull'impiego dell'ABTS, ha il vantaggio di essere semplice ed applicabile per analisi di routine. Inoltre, permette la misurazione di sostanze antiossidanti sia idrofile che lipofile in

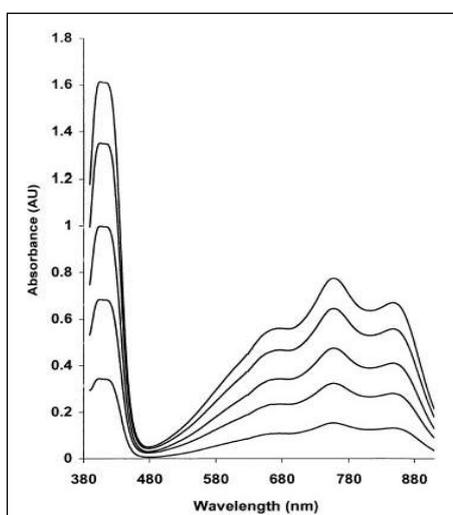


Figura 1: Spettro UV del radicale ABTS.

un ampio range di pH. Tuttavia, bisogna tener presente che il radicale impiegato (ABTS^{•+}) non è fisiologico e non è presente nei sistemi biologici e che spesso si evidenziano problemi di ripetibilità della misurazione dovuti alle cinetiche di reazione dei diversi antiossidanti coinvolti.

- **METODO DPPH**

Questo saggio si basa sulla riduzione del radicale 2,2-difenil-1-picrilidrazile (DPPH[•]) da parte della sostanza antiossidante in esame. Il radicale 1,1-difenil-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]) è stabile grazie alla capacità di delocalizzare l'elettrone spaiato su tutta la molecola; in questo modo non si ha dimerizzazione, come invece accade nel caso di altri radicali liberi. La reazione può essere studiata spettrofotometricamente, misurando la scomparsa del picco tipico del DPPH[•] a 515-528 nm. Il radicale in soluzione dà una colorazione viola, caratterizzata da assorbimento in soluzione metanolica a 517 nm. In presenza di antiossidanti capaci di donare un atomo di idrogeno al radicale, la soluzione decolora; quindi la misura della caduta dell'assorbanza a 517 nm è espressione della capacità antiossidante di un campione. I risultati vengono espressi come equivalenti di Trolox (standard sintetico, analogo idrofilo della vitamina E).

- **METODO FOLIN-CIOCALTEAU**

È il metodo ufficiale per la determinazione del contenuto totale di polifenoli (TPC) nei vini, nella Comunità Europea. Questo metodo si basa sull'ossidazione chimica dei composti fenolici da parte di una miscela ossidante, chiamata reattivo di Folin, costituita da acido fosfotungstico (H₃PW₁₂O₄₀) e fosfomolibdico (H₃PMo₁₂O₄₀) che, riducendosi, forma una miscela di ossidi (W₈O₂₃ e Mo₈O₂₃) colorata di azzurro. L'analisi è condotta mediante determinazione spettrofotometrica. Il metodo viene ampiamente utilizzato, in quanto è semplice e riproducibile; i reagenti sono disponibili commercialmente e la misura dell'assorbanza ad alta lunghezza d'onda minimizza le interferenze della matrice alimentare. Le limitazioni di questo metodo sono i tempi lunghi richiesti per poter effettuare l'analisi (circa 2 ore); inoltre, dovendo essere effettuato in fase acquosa, non è applicabile ad antiossidanti lipofili.

Metodi per la caratterizzazione molecolare e l'identificazione varietale

L'identificazione varietale è stata eseguita attraverso l'applicazione di metodiche di biologia molecolare partendo da DNA estratto da foglie provenienti da ciascun campione. Le analisi molecolari hanno previsto l'applicazione della PCR end point per l'analisi dei loci microsatelliti. L'estrazione del DNA genomico, sia per quanto riguarda la vite che per tutte le altre matrici campionate, è stata eseguita su foglie applicando il protocollo descritto da Doyle e Doyle (1990) che prevede l'utilizzo della soluzione CTAB (esa-decil trimetilammonibromuro), indicata in modo specifico per il materiale di natura vegetale, al quale sono state apportate parziali modifiche. In particolare è stato utilizzato il CTAB buffer al 2% (CTAB 2%, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1% PVP 40.000, 2% mercaptoethanol). Tale metodica prevede fasi di separazione chimico-fisica grazie all'uso di differenti solventi. Inoltre, sono state condotte e messe a punto in parallelo prove di estrazione dalla polpa e buccia da tutte le altre matrici, utilizzando un estrattore semiautomatico e il suo kit. E' stata valutata la quantità e la qualità del DNA estratto, quest'ultima intesa in rapporto alla presenza di contaminanti (es. proteine). Entrambi i parametri sono stati analizzati mediante lettura allo spettrofotometro (260/280nm): con il valore di assorbanza a 260nm (A_{260nm}) si ha una indicazione della quantità di DNA presente nel campione; il valore di assorbanza a 280nm (A_{280nm}) dà invece un'indicazione della quantità di proteine (e contaminanti fenolici). Il rapporto A_{260}/A_{280} stima la purezza degli acidi nucleici. In questo modo si è potuto standardizzare la quantità del DNA estratto e lavorare, nelle fasi successive, con concentrazioni di 15 ng/ μ l. E' stato inoltre conservato a -20° fino alle successive analisi. Il DNA nucleico ottenuto è stato anche visualizzato dopo corsa elettroforetica su gel di agarosio, alla concentrazione dello 0.8% con etidio bromuro, utilizzando come tampone il TBE (TRIS BORATO EDTA). Da entrambe le metodiche e dalle diverse parti dei campioni sono state ottenute ottime concentrazioni di DNA privo di impurezze.

Il DNA estratto è stato amplificato tramite PCR con le coppie di primers per i loci microsatelliti scelti, i cui forward sono stati marcati con fluorocromi. Il ciclo di amplificazione è stato opportunamente scelto in relazione alle temperature di melting di ciascuna coppia di primer e messo a punto in un termociclatore. Dopo elettroforesi di ciascun amplificato, su gel di agarosio all' 1,5%, le bande fluorescenti sono state visualizzate al trans illuminatore; l'immagine acquisita tramite software. I campioni di DNA amplificati sono stati successivamente analizzati mediante elettroforesi capillare e la determinazione della taglia

allelica, espressa in numero di paia di basi, è stata effettuata tramite il software, dell'analizzatore genetico 16 capillari, con detector a fluorescenza per le marcature FAM e NED.

Determinazione di residui di prodotti fitosanitari

I campioni di frutta, privati del nocciolo ma non della buccia, sono stati omogeneizzati per triturazione in un comune frullatore, allo scopo di garantire l'omogeneità del campione di prova. Porzioni pesate del campione omogeneizzato sono state trasferite in provetta da centrifuga, addizionate di aliquote misurate di acetonitrile e agitate manualmente per circa 1 minuto. Alla sospensione così ottenuta, è stata aggiunta una miscela di solfato di magnesio, cloruro di sodio, citrato e mono idrogeno citrato di sodio, per garantire la completa disidratazione, la promozione del salting-out e del processo estrattivo a pH controllato. La miscela è stata agitata vigorosamente e centrifugata per 5 minuti ad una velocità di 3000 rpm. Il surnatante organico è stato trasferito in una diversa provetta contenente una fase solida dispersiva (D-SPE) a base di ammino adsorbenti (PSA), per rimuovere alcuni interferenti di natura acida, e solfato di magnesio anidro per la rimozione dell'eventuale acqua residua. Il preparato è stato agitato vigorosamente per un minuto e centrifugato per 5 minuti ad una velocità di 3000 rpm. Cinque millilitri di estratto purificato sono stati trasferiti, evitando di prelevare particelle di adsorbente, in una provetta con tappo a vite, e l'estratto è stato acidificato per aggiunta di una piccola quantità di una soluzione di acido formico al 5 % in acetonitrile per stabilizzare alcuni pesticidi labili in ambiente basico. L'estratto finale è stato direttamente utilizzato per l'analisi mediante LC-MS/MS. In una prima fase, è stato necessario, per ciascun analita, effettuare l'ottimizzazione di una serie di parametri strumentali, in modo da ritrovare le migliori condizioni di acquisizione del segnale originato dalla molecola d'interesse. Per fare questo, lo standard della sostanza in esame, alla concentrazione di 1 ppm, è stato introdotto nel rivelatore mediante infusione. La tecnica di ionizzazione è l'elettrospray (ESI), sulla base delle caratteristiche strutturali delle molecole. La procedura di ottimizzazione prevede una regolazione interattiva di vari parametri legati al processo di desolvatazione e ionizzazione dell'analita prescelto ed in maggior misura inerenti i flussi di gas di nebulizzazione (nebulizer) e in controcorrente (sheat gas), il potenziale di ionizzazione applicato tra capillare e orifizio (capillary potential) e i potenziali necessari per la corretta

focalizzazione del fascetto ionico e il suo convogliamento verso il primo quadrupolo (tube lens). L'obiettivo è quello di massimizzare l'intensità del segnale relativo allo ione molecolare dell'analita prescelto. Una volta che l'abbondanza dello ione quasi molecolare $[M+H]^+$ è stata ottimizzata, si procede alla sua frammentazione, in modo da stabilire i suoi ioni prodotto caratteristici e le condizioni strumentali più adeguate per poterli osservare. In questo caso, i parametri su cui si agisce prevalentemente sono i potenziali applicati allo ione e la pressione del gas di collisione stesso. Si procede quindi alla realizzazione di uno spettro MS/MS che potrà poi servire da guida per la determinazione degli ioni frammento più abbondanti. Si procede infine, sempre attraverso un processo iterativo, alla determinazione dei valori di energia di collisione per i quali risulta massima l'intensità dei segnali per le transizioni selezionate come riportato nel grafico relativo ai valori di energia di collisione del Dimetomorf. Sono state pesate aliquote della polpa della matrice di interesse rappresentativa del campione omogeneizzato, ciascuna del peso di circa 10 g (bilancia tecnica) e trasferite in provette da 50 ml. Ciascuna porzione, sottoposta ad additivazione opportuna e aggiunta di Standard interno a 20 ppm ($V_{\text{prelevato}} = 200 \mu\text{l}$), con concentrazione finale di 100 ppb, è stata sottoposta in parallelo alla procedura di estrazione già descritta. E' stata costruita una retta per ciascun fitofarmaco oggetto di analisi e per tutte le matrici. La retta è stata costruita su 6 livelli di concentrazione e ogni matrice ad un determinato livello di concentrazione è stato estratto per tre volte. Quindi la costruzione di una retta richiede l'estrazione di 18 aliquote dello stessa matrice. Gli estratti finali in acetonitrile, opportunamente acidificati, sono stati iniettati nello strumento. Lo standard interno è una sostanza nota, non contenuta nel campione originale, che ha proprietà chimico-fisiche quanto più simili possibile all'analita stesso. Questo composto viene addizionato, in concentrazione costante, a tutte le soluzioni. Il suo impiego è necessario nelle determinazioni quantitative perché, assumendo che un errore compiuto sull'analita si compia anche sullo standard interno, consente di eliminare le imprecisioni dovute alla preparazione del campione o alle fluttuazioni di volume durante l'iniezione strumentale. La molecola scelta e consigliata è il trifenil fosfato (alla concentrazione di 20,20 mg/L) in quanto mostra un comportamento chimico e cromatografico molto simile a quello degli analiti.

Determinazione di Aflatossine

Il metodo prevede che il campione venga omogeneizzato con acqua distillata in rapporto 1:1 (Es. 1 Kg di nocciole con 1 L di acqua) per una migliore distribuzione delle aflatossine nel campione. La porzione del campione analizzata viene trattata con un solvente di estrazione (metanolo). Il campione estratto viene centrifugato e filtrato, diluito con tampone fosfato (PBS) e passato attraverso colonnina di immunoaffinità (IAC) contenente anticorpi specifici per le aflatossine B1, B2, G1 e G2. Le aflatossine sono eluite dalla colonna di immunoaffinità con metanolo e acqua, portate in un volume di 1 ml ed infine quantificate attraverso cromatografia liquida ad alte prestazioni in fase inversa (RP-HPLC) con derivatizzazione fotochimica post-colonna e rivelatore a fluorescenza. I parametri di validazione sono stati calcolati mediante Horwitz, trattandosi di un metodo interno. La curva di calibrazione è stata costruita su cinque punti. Le aflatossine si separano in corsa cromatografica isocratica, in HPLC in fase inversa (RP-HPLC) a temperatura controllata con colonna RP-C18 e appropriata fase mobile preparata in automatico dalla pompa quaternaria. Le aflatossine B1 e G1 non sono fluorescenti per cui necessitano di derivatizzazione post-colonna, che avviene in maniera fotochimica, irradiandole con luce alla lunghezza d'onda di 254 nm, che rompendo un doppio legame rende le due aflatossine fluorescenti. La velocità di flusso rimane costante a 1 ml/min con una colonna di diametro di 4.6 mm. La corsa cromatografica dura 10 minuti, le aflatossine eluiscono nel seguente ordine: G2, G1, B2 e B1.

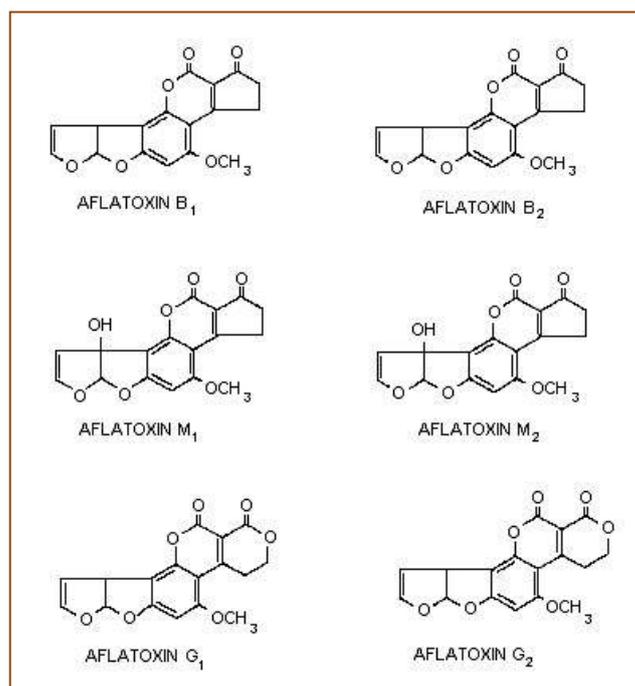


Figura 2: Strutture chimiche di aflatossine.

Determinazione di Ocratossina A

Le analisi effettuate presso il laboratorio del Co.Ri.Bi.A. sono state condotte seguendo il metodo ufficiale **“Ocratossina A nel vino - OIV MA-E-AS-315-10 OCHRAT”**. La metodica prevede la costruzione di una curva di calibrazione formata da 6 punti usando degli standard preparati a partire da una soluzione standard madre di 50 µg/ml di OTA e diluiti in fase mobile. La procedura prevede la diluizione del campione di vino in una soluzione di diluizione (PBS a pH 7,4) previa filtrazione per eliminare eventuali contaminanti residui che potrebbero falsare l'indagine sul contenuto di ocratossina A. Successivamente si esegue l'analisi suddivisa in: fase di purificazione dell'ocratossina A, fase di iniezione in HPLC e fase di rilevazione spettrofluorimetrica. La fase di purificazione è stata effettuata mediante colonnine di immunoaffinità. La quantificazione è stata effettuata mediante iniezione in HPLC usando una colonna C18, termostata a 40°C, e come eluente una miscela acetonitrile/acqua/acido acetico in rapporto 50:49:1 in volumi. La fase di rilevazione è stata eseguita mediante rivelatore fluorimetrico a lunghezza d'onda 333 nm (eccitazione) e 460 nm (emissione). Il principio su cui si basa lo spettrofluorimetro è quello di eccitare la molecola (OTA) tramite radiazione UV, attraverso l'utilizzo di una sorgente monocromatica. La molecola viene così eccitata, e ritorna allo stato fondamentale generando il fenomeno noto come fluorescenza. La radiazione emessa viene infine registrata da uno strumento, il quale permette di produrre uno spettro di emissione di fluorescenza caratteristico della molecola.

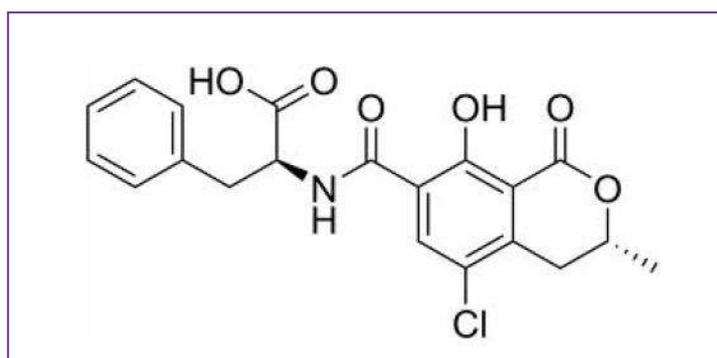


Figura 3: Struttura chimica dell'Ocratossina A.

ANALISI DEI RESIDUI DI PRODOTTI FITOSANITARI

Nella tabella 13 si riportano i valori delle masse di ciascun fitofarmaco e i frammenti determinati, oltre che maggiori dettagli sul tempo di ritenzione specifico per ogni fitofarmaco, azione pesticida e famiglia chimica di appartenenza.

Principio attivo	Frammento parent	RT (min)	Ione selettivo	Azione principio attivo	Famiglia chimica
Azoxystrobin	404.12	6.22	329.1 - 371.86 - 343.72		
Fenpyroximate	422.53	9.05	366.46 - 134.49	FUNGICIDA- INSETTICIDA	PIRAZOLO
Dimethomorph	387.89	5.5	165.15 - 300.95 - 139.04		MORFOLIN-DERIVATI
Pyridaben	365.28	9.58	147.02 - 308.58	FUNGICIDA	OSSIACETAMMIDI
Propiconazole	342.11	6.94	204.77 - 186.99	INSETTICIDA	PIRIDAZONE-DERIVATI
Thiacloprid	253.42	3.02	125.88 - 90.39 - 98.65	INSETTICIDA	TIADAZOLI
Cyprodinil	226.33	6.48	210.37 - 92.84 - 77.37	FUNGICIDA	ANELINO-PIRIMIDINE
Buprofezin	306.01	8.49	201.00 - 57.56 - 105.72	INSETTICIDA	TIDIAZINE
Fludioxonil	(-)247.21	6.05	180.07 - 150.74 - 126.17	ACARICIDA	PIRROLIN-DERIVATI
Fenazaquin	307.11	9.49	160.81 - 146.88 - 57.56		GINAZOLINE
Tebufenozide	353.24	6.85	297.06 - 203.30 - 132.94	INSETTICIDA	DIBENZOIDRAZINE
Tebufenpyrad	333.92	8.13	144.99 - 171.38	ACARICIDA	PIRAZOLO
Tetraconazole	372.14	6.31	70.72 - 159 - 184.80	FUNGICIDA	TRIAZOLI
Fenhexamid	302.09	6.21	97.18 - 142.62	FUNGICIDA	IDROSSIANILIDI
Tebuconazole	307.87	6.38	125.32 - 150.94 - 70.27		TRIAZOLI
Flufenoxuron	(-)487.00	8.47	304.25 - 329.29 - 156.34		
Imidacloprid	255.81	2.11	84.56 - 209.24 - 175.09	INSETTICIDA	NEO-NICOTINOIDI
Indoxacarb	528	7.67	149.73 - 249.32	FUNGICIDA	DIAZINA
Myclobutanil	288.84	6.09	151.08 - 124.69 - 69.74 - 164.18		TRIAZOLI
Metalaxyl	279.96	4.70	192.08 - 219.69 - 247.74	FUNGICIDA	FENILAMMIDI
Mepanipyrim	224.09	6.66	130.81 - 106.21 - 77.30	FUNGICIDA	ANILINO-PIRIMIDINA

Tabella 13: Fitofarmaci indagati sulle matrici ortofruitticole.

In ottemperanza a quanto previsto dalla decisione 657/2002/CE, si è scelto di monitorare le transizioni comprendenti lo ione precursore e almeno 2 o 3 ioni prodotto per ciascun fitofarmaco per il riconoscimento inequivocabile dell'analita. Una volta ottimizzato il metodo di ionizzazione e determinate le più opportune transizioni da monitorare, la scelta della tecnica LC-MS evidenzia a questo punto tutta la sua efficacia, in quanto, oltre che idonea alla determinazione della concentrazione dell'analita, ne può contemporaneamente confermare la presenza. Si consideri tuttavia che le transizioni determinate devono presentare un rapporto relativo di abbondanze che rientri nei limiti previsti dalla legge e riportati in tabella 14.

Intensità relativa (% del picco base)	GC-MS, LC-MS, LC-MSⁿ
> 50%	± 20%
> 20% - 50%	± 25%
> 10% - 20%	± 30%
≤ 10%	± 50%

Tabella 14: Tolleranze massime consentite per intensità relative degli ioni per tecniche di spettrometria di massa.

Il software riporta un parametro definito come “diff %” cioè la differenza tra il valore della concentrazione del fitofarmaco aggiunto all'inizio dell'estrazione e il valore di concentrazione del fitofarmaco che è stato analizzato in quella matrice e cioè la quantità di analita che si è riusciti a recuperare che risulta essere per quasi tutti i fitofarmaci tra il 70 e il 120 % e il valore di RSD % cioè il valore dello scarto tipo che consente di effettuare confronti tra dispersioni di dati di tipo diverso, indipendentemente dalle loro quantità assolute.

Le analisi effettuate sulle matrici di Carciofo, Limone, Arancia, Pomodoro e Fragola hanno mostrato valori di residui fitosanitari al di sotto del LOD (Limite di Quantificazione), ovvero della concentrazione al di sotto della quale l'analita non è determinabile con un livello di precisione, di ripetibilità e di esattezza accettabile.

LE UVE



Le piante d'uva appartengono al genere *Vitis* L. della famiglia delle Vitaceae. La quasi totalità delle viti coltivate appartiene alla specie *Vitis vinifera* L., originaria del Mediterraneo e del vicino Oriente. La pianta è un arbusto rampicante con portamento generalmente determinato dal sistema di allevamento. Il portamento naturale è irregolare, con ramificazione rada ma molto sviluppata in lunghezza, anche diversi metri. Le forme spontanee della sottospecie *sylvestris* sono rampicanti e i pochi rami si confondono con la vegetazione delle piante circostanti; le forme inselvaticite della sottospecie *vinifera* mostrano un fusto più o meno sviluppato con rami procombenti o rampicanti secondo le condizioni, più o meno densamente ramificati. Il fusto è più o meno contorto e irregolare. La vigoria del fusto e dei rami è strettamente condizionata dal portainnesto. Il frutto è l'acino, una bacca con pochi semi (vinaccioli) portato da un corto pedicello; l'insieme degli acini costituisce un racemo, quello che comunemente viene chiamato grappolo d'uva.

L'uva è dotata di effetto rinfrescante, attenua la sete, stimola la funzionalità renale, epatica, in particolare la secrezione biliare, ed infine quella intestinale. Il consumo dell'uva ha come risultato quello di depurare l'organismo (stimolazione dell'attività epatorenale e della peristalsi intestinale) apportando al contempo una valida azione tonificante che prepara l'organismo a superare il cambio di stagione. Ricca di proprietà nutritive e benefiche, l'uva è uno dei frutti più energetici, vivamente consigliata per i bambini e per gli anziani, data la rapida assimilazione degli zuccheri in essa contenuti. Per le analisi, condotte dal Co.Ri.Bi.A., sono state scelte due varietà a bacca nera: Nero d'Avola e Perricone.

Aspetti nutrizionali e salutistici

L'uva è un frutto che contiene poche proteine, fibre, calcio, ferro, magnesio, fosforo ed una buona concentrazione di potassio. Contiene anche minime quantità di sodio, carotenoidi, vitamine A, B, C ed acido folico. Estremamente digeribile, possiede numerose proprietà terapeutiche: innanzitutto svolge un'azione lassativa e diuretica (soprattutto l'uva bianca per il minore contenuto di tannini). E' pertanto utile per combattere dispepsia, emorroidi, calcolosi urinaria e delle vie biliari. Come intuibile dalla cospicua quantità di zuccheri, il consumo d'uva è sconsigliato ai diabetici. Il succo d'uva è ricchissimo di antiossidanti ed è indicato nelle diete disintossicanti e depurative. L'uva possiede anche proprietà antinfiammatorie, antivirali e vasoprotettrici. Il succo d'uva ha proprietà rinfrescanti, rimineralizzanti e vitaminizzanti.

Valori nutrizionali per 100 g	
Calorie 69 kcal	
Acqua 80,5 g	Glucidi 18 g
Lipidi 0,16 g	Fibra alimentare 0,9 g
Proteine 0,7 g	Zuccheri 15,5 g
Calcio 10 mg	Acido ascorbico (vit. C) 10,8 mg
Sodio 2 mg	Retinolo (vit. A) 66 IU
Potassio 191 mg	Tiamina (Vit. B1) 0,069 mg
Ferro 0,36 mg	Riboflavina (Vit. B2) 0,07 mg
Magnesio 7 mg	Niacina (Vit. B3) 0,188 mg
Fosforo 20 mg	Acido Pantotenico (Vit. B5) 0,05 mg
Zinco 0,07 mg	Piridossina (Vit. B6) 0,086 mg
Rame 0,127 mg	Folati 2 mcg
Fluoro 7,8 mg	Alpha-tocoferolo (Vit. E) 0,19 mg
Manganese 0,071 mg	Beta-Carotene 39 mcg
Selenio 0,1 mg	Luteina + zeaxantina 72 mcg

Tabella 1: Valori nutrizionali dell'Uva (INRAN).

L'uva è tra i frutti più ricchi di composti fenolici. E' possibile classificare i composti polifenolici in due grandi gruppi: i polifenoli non-flavonoidi (acido benzoico, acido cinnamico e gli stilbeni) e i flavonoidi (antociani, flavan-3-oli e flavonoli). I polifenoli agiscono da molecole antiossidanti, proteggendo l'organismo dall'insorgenza di malattie cardiovascolari; prevengono le LDL dall'ossidazione, agendo da "scavengers" dei radicali liberi, soprattutto perossidici, rompendone la catena di formazione e legandosi ad essi per neutralizzarli. Il profilo del contenuto dei polifenoli totali, dei flavonoidi e degli antociani nelle uve (*Vitis vinifera*) varietà Nero d'Avola e Perricone, analizzato presso il laboratorio del Co.Ri.Bi.A., risulta particolarmente ricco e caratteristico. Il grado di maturazione dell'uva influenza notevolmente le quantità delle diverse frazioni fenoliche presenti nelle uve. Il massimo della concentrazione dei polifenoli totali si ritrova, infatti, nelle fasi tardive di raccolta nelle due varietà analizzate, definita maturità fenolica (grafici 1,2,3).

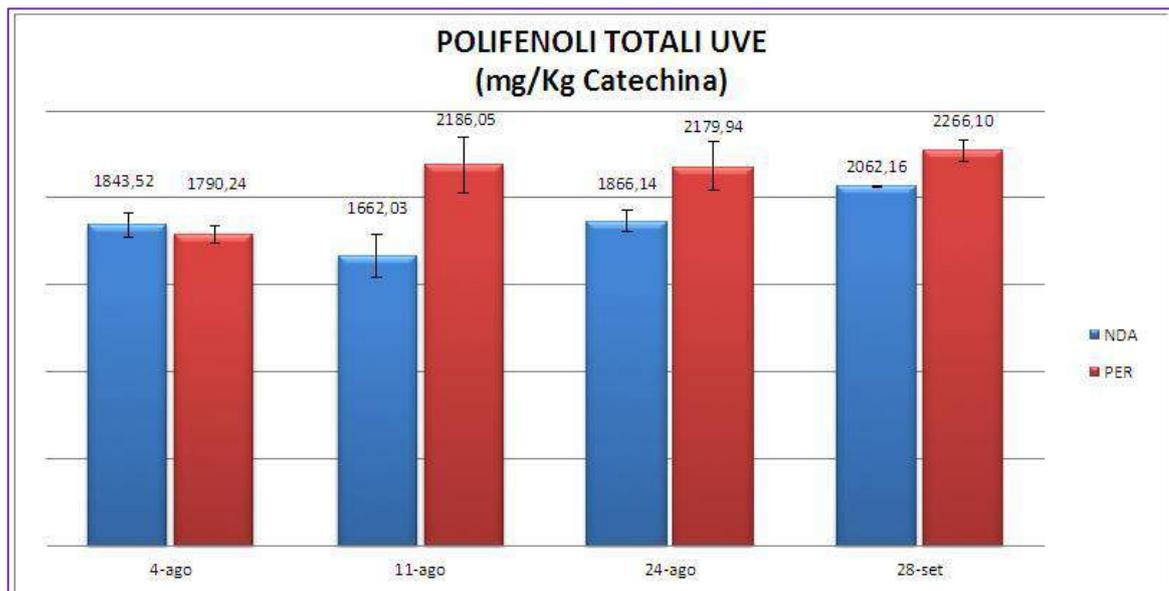


Grafico 1: Polifenoli totali nelle Uve.

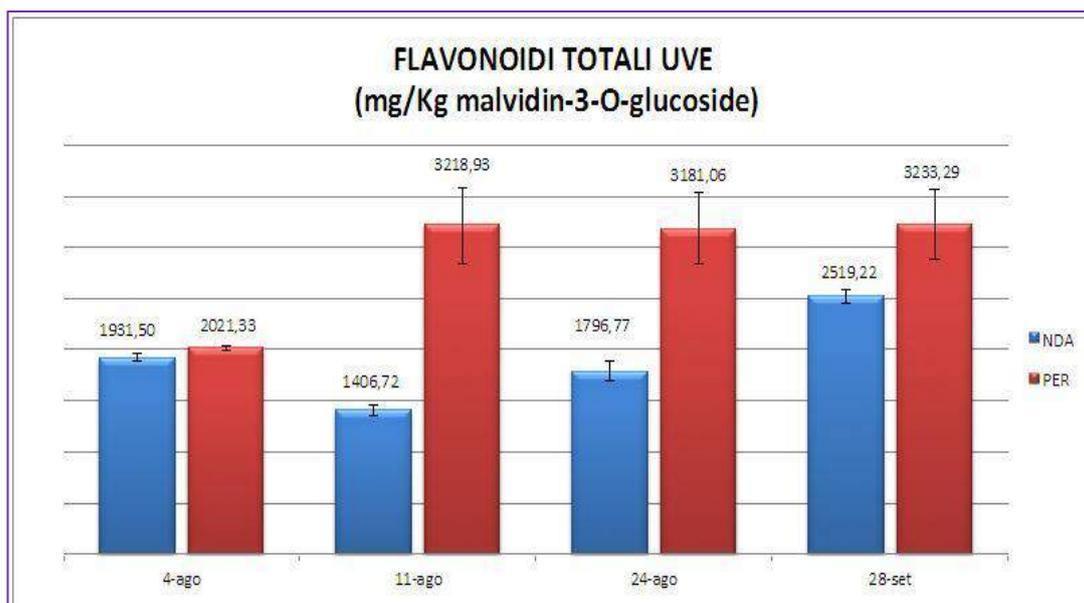


Grafico 2: Flavonoidi totali nelle Uve.

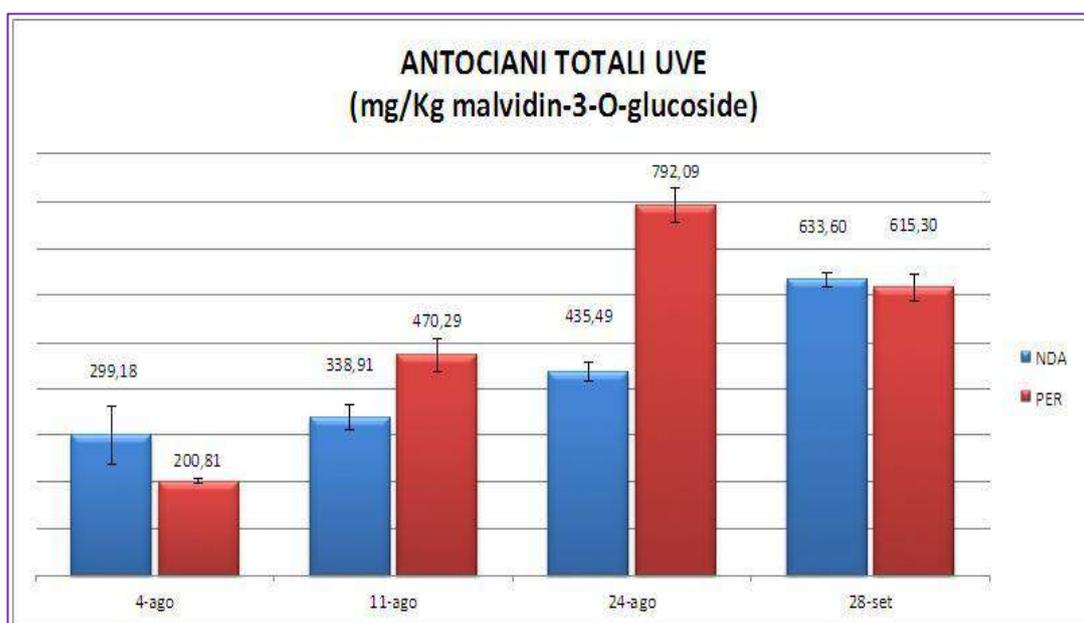


Grafico 3: Antociani totali nelle Uve.

Aspetti genetici

L'identificazione varietale dei vitigni è stata eseguita attraverso l'applicazione di metodiche di biologia molecolare partendo da DNA estratto da foglie provenienti da ciascun campione. Le analisi molecolari hanno previsto l'applicazione della PCR end point per l'analisi di sei loci microsatellitari scelti. Tali SSR sono depositati in Genbank e sono stati individuati a livello internazionale per la caratterizzazione dei vitigni e descritti nel progetto EU GenRes 081 (www.genres.de/vitis/vtis.htm: European Network for Grapevine Genetic Resources Conservation and Characterization). Il set minimo scelto costituito da 6 loci microsatelliti è dato da: VVS2 - VVMD5 - VVMD7 - VVMD27 - VrZAG62 - VrZAG79.

I campioni di DNA amplificati sono stati successivamente analizzati mediante elettroforesi capillare e la determinazione della taglia allelica, espressa in paia di basi, è stata effettuata tramite il software dell'analizzatore genetico a 16 capillari, con detector a fluorescenza per le marcature FAM e NED. Il profilo genetico ottenuto dall'analisi di sei loci microsatelliti per le varietà analizzate è stato confrontato con quello del materiale standard di riferimento.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che per le due varietà i profili sono assolutamente unici ed identificativi (Riquadro 1).

VARIETA' UVE	S2	D7	D5	D27	ZAG62	ZAG79
<i>NERO D'AVOLA</i>	140 - 149	236 -246	224 - 238	178	184 - 200	248
<i>PERRICONE</i>	129 - 131	236	226 - 234	182	187 - 194	240 - 244

Riquadro 1: Profilo allelico delle Uve Nero D'Avola e Perricone.

Determinazione molecolare di *A. carbonarius*

Sugli acini di uva campionati e sui mosti, relativamente alle varietà Nero d'Avola e Perricone, è stato effettuata la ricerca di *A. carbonarius* tramite:

- ISOLAMENTO di *A. carbonarius* su due terreni solidi agarizzati : MEA (Malt Extract Agar) e MEA-B (Malt Extract Boscalid Agar)
- ESTRAZIONE DEL DNA
- PCR qualitativa per la ricerca del micete *A. carbonarius*

L'isolamento del micete, sia da grappoli che da mosto, è stata eseguita utilizzando terreni solidi agarizzati semiselettivi, quali il MEA (Malt Extract Agar) e il MEA-B (Malt Extract Boscalid Agar). Entrambi i terreni, infatti, contengono antibiotici per inibire la crescita batterica contaminante; il MEAB inoltre contiene anche il Boscalid (5mg/L), un antifungino, che svolge la funzione di inibitore selettivo nei confronti della maggior parte delle altre specie appartenenti al genere *Aspergillus* ma verso cui l'*A. carbonarius* risulta essere resistente. Le letture delle piastre, poste in incubazione a 25°C, è stata effettuata dopo circa 3 giorni. Le due foto riportate mostrano la crescita del micete isolato su piastra MEAB (Fig. 4), la singola colonia è stata risospesa in brodo e seminata in tubo contenente lo stesso terreno al fine di ottenere una coltura pura (Fig.5).



Figura 4: Colonie di *A. carbonarius* su piastra.

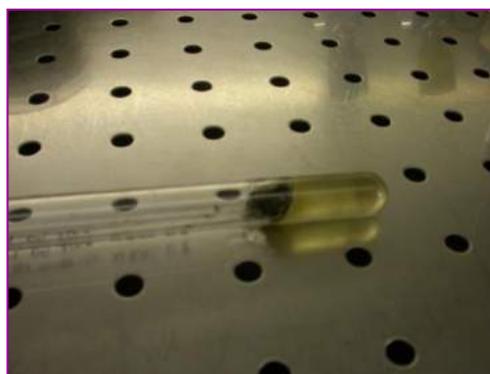


Figura 5: Isolamento del micete.

Le indagini molecolari hanno previsto una prima fase di estrazione del DNA sia dai campioni di mosto sia dalle piastre dove sono cresciute le colonie sospette e la successiva applicazione della tecnica di amplificazione genica (PCR). Dopo avere estratto il DNA si è proceduto con l'amplificazione. Il target scelto è un frammento interno al dominio AT del gene PKS che codifica per l'enzima polichetido sintetasi di *A. carbonarius*. E' stata quindi messa a punto una PCR tradizionale (End Point PCR), tramite termociclatore, utilizzando una coppia di primer

(OTA-F/OTA-R), depositati in Genbank, che generano un prodotto di amplificazione di 141bp (Fig. 6) identificativo solo della specie *carbonarius*. Gli amplificati sono stati separati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio alla concentrazione dell'1,5%, visualizzati al transillumintore e la foto è stata acquisita mediante apposito software. E' stato considerato positivo il campione in cui il prodotto di amplificazione è lungo 141bp. Come controllo positivo interno, è stato usato un ceppo di riferimento di *A. carbonarius* (NRRL67).

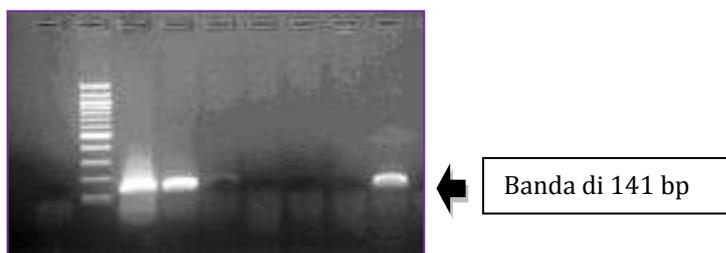


Figura 6: : PCR di *A. carbonarius* su mosto.

L'isolamento, su terreno MEA, di miceti provenienti dagli altri campioni, evidenzia come sia sicuramente presente una flora funginea contaminante, ma non appartenente alla specie *A. carbonarius* come dimostra la negatività della PCR specie-specifica. L'analisi molecolare è stata eseguita sia da DNA estratto da fungo in colture in vitro che su DNA estratto da bacche d'uva. Solo un campione di mosto è risultato positivo alla PCR, tuttavia dallo stesso campione non vi è stato alcun isolamento su terreno del micete. I risultati, ottenuti dalle analisi condotte dal Co.Ri.Bi.A., dimostrano come la PCR specie-specifica, risulti una tecnica che, per la sua elevata sensibilità e specificità, permette di rilevare anche piccole tracce del micete anche quando non è possibile isolarlo su piastra perché inattivo. Inoltre per la sua velocità di esecuzione permette una rapida rilevazione di *A. carbonarius* fornendo indicazioni utili sulla gestione del vigneto.

IL VINO



NERO D'AVOLA

Il vitigno del Nero d'Avola può essere considerato l'espressione di una specifica varietà di vite, autoctona della Sicilia. Il nome del vitigno potrebbe derivare da un'erronea traduzione del dialetto siciliano "calaurisi", una parola composta risultante dalla combinazione delle parole *calea* - ovvero *uva* - e *aulisi* - cioè *di Avola*, paesino rivierasco della provincia di Siracusa. Alla fine dell'1800 i vini rossi e corposi ottenuti dalle uve Nero d'Avola coltivate nel territorio siracusano e, in particolare, del paese di Pachino, erano molto apprezzati e richiesti dagli stessi importatori francesi, che li usavano per arricchire di colore e di corpo i loro vini locali. Per secoli il Nero d'Avola è stato usato come vino da taglio, per correggere le caratteristiche carenti di altri vini siciliani. Oggi l'uva Nero d'Avola è diffusa nelle vigne di tutta la Sicilia. Il territorio d'origine, costituito dalle località di Eoro, Pachino e Noto, nella provincia di Siracusa, ne detiene la maggiore estensione. E' notevole la differenza di carattere che si può riscontrare fra i vini Nero d'Avola prodotti nella parte occidentale della Sicilia e quelli delle zone più orientali. Al giorno d'oggi questo vino rosso, corposo e robusto, può essere considerato a buon diritto il principe dei vitigni siciliani.

Con una coltivazione estesa su una superficie di oltre 12 mila ettari è il vitigno più diffuso nella regione. Nel mondo si è affermato come vitigno a bacca rossa di grandi qualità, capace di dare vini pregiati, di grande corpo e spessore. L'uva Nero d'Avola si coltiva prevalentemente ad alberello o a spalliera. La vite rende uve ad alta concentrazione di zuccheri che permettono al vino di superare i 15 gradi alcolici. Vinificato in purezza è uno dei più grandi vini rossi italiani: ha buona struttura, un carattere possente, caldo, intenso e armonico. Si presta bene all'affinamento in legni pregiati.

PERRICONE

Vitigno tipico della Sicilia occidentale dove si coltiva da tempo immemorabile. Coltivato in misura limitata nelle province di Palermo e di Trapani, è presente anche in provincia di Agrigento e di Messina. Pianta vigorosa, foglia media, da cuneiforme a pentagonale, trilobata o pentalobata; grappolo cilindrico o piramidale, semplice o alato, mediamente compatto, acini medi, sferoidali, buccia pruinosa, spessa e coriacea di colore blu scuro tendente al nero. Vinificato in purezza da un vino rosso rubino più o meno carico, ha odore vinoso, mediamente corposo, abbastanza tannico, armonico. I vitigni autoctoni, qual è il Perricone, in grado di esprimere interessanti note varietali, rappresentano un enorme patrimonio ampelologico di biodiversità da diffondere, essendo un importante elemento di distinzione in un enologia sempre più omologata. I vitigni d'antica coltivazione, possono, se particolarmente curati in vigna e vinificati senza stravolgere le loro caratteristiche, essere protagonisti in un mercato che in futuro richiederà sempre più e con forza la loro positiva originalità. I vini ottenuti da questi vitigni rivelano ottimi contenuti in antociani, flavonoidi e polifenoli totali, confermando le loro qualità antiossidanti e salutistiche. Dalle analisi condotte dal Co.Ri.Bi.A., effettuate sui vini, si può osservare come il contenuto dei polifenoli totali sia maggiore nel vino Perricone ($2705,20 \pm 144,60$ mg/L) rispetto al vino Nero d'Avola ($1906,30 \pm 49,02$) (grafico 4). Inoltre si osserva una maggiore concentrazione di antociani totali (grafico 5) nel vino Nero d'Avola ($369,89 \pm 21,515$ mg/L), probabilmente, ciò è dovuto alla struttura della buccia delle due cultivar in oggetto e nello stesso tempo dalla differente capacità che i singoli antociani hanno di passare dalla buccia al vino, anche per effetto dell'alcool che si sviluppa in fermentazione. L'elevata concentrazione di FT nelle uve Perricone viene mantenuta anche dopo la vinificazione, ritrovando, pertanto, un valore pari a $3193 \pm 145,66$ mg/L nel vino Perricone, mentre nel vino Nero d'Avola il contenuto di FT risulta inferiore (grafico 6).

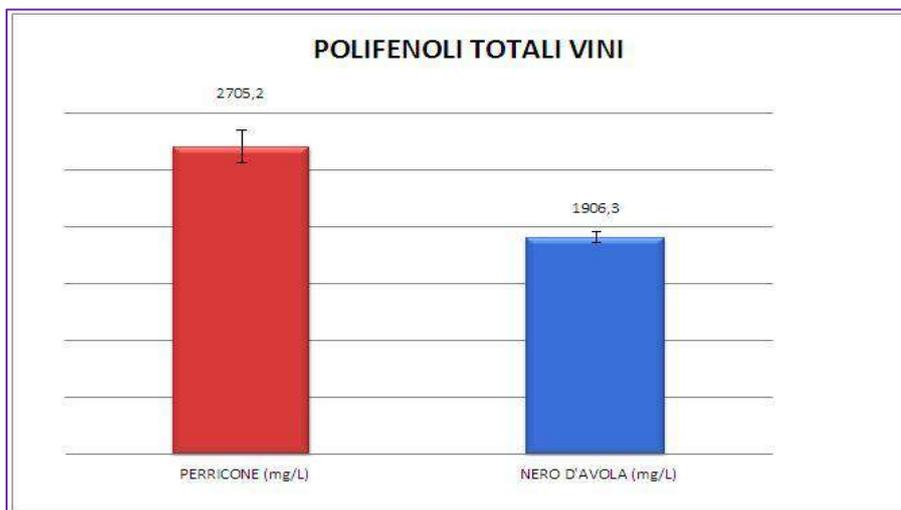


Grafico 4: Polifenoli totali nei vini.

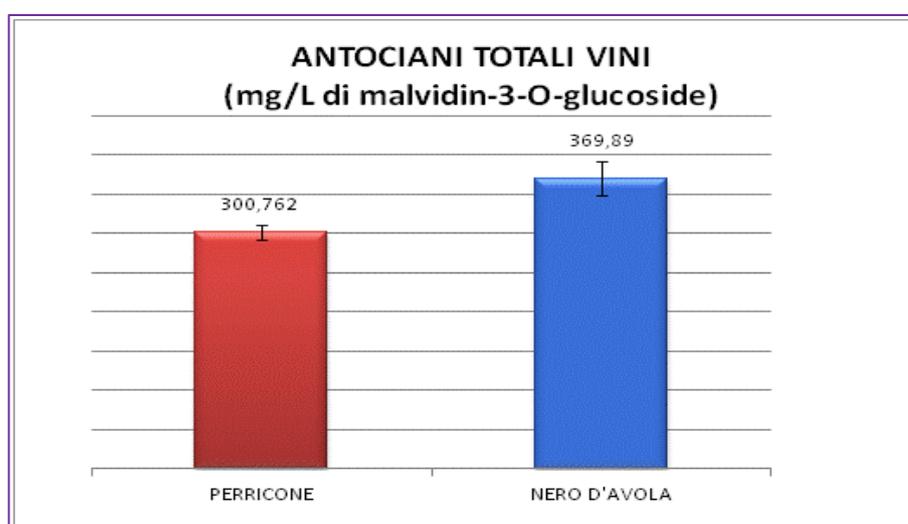


Grafico 5: Antociani totali nei vini.

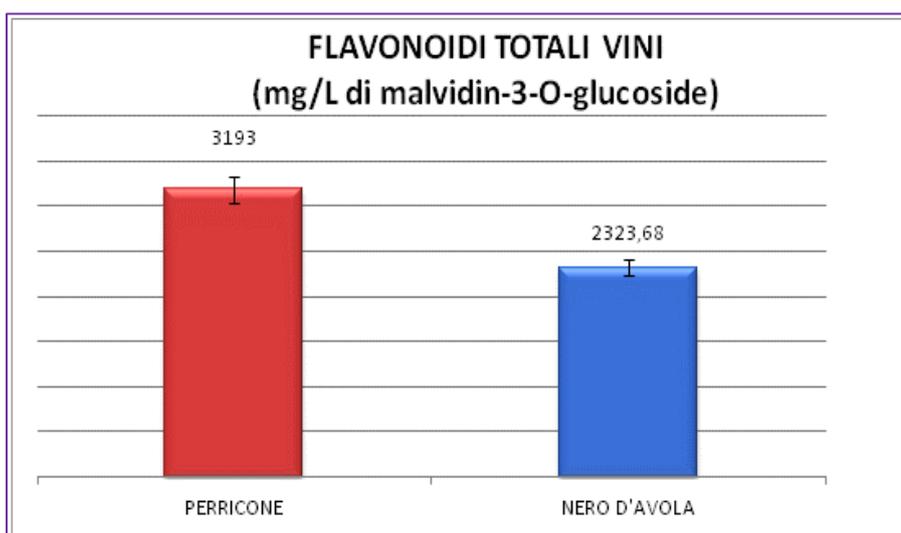


Grafico 6: Flavonoidi totali nei vini.

I risultati, relativi al profilo antocianico, sono riportati nella Tabella 2. Il profilo della cultivar rappresenta il contenuto percentuale di ciascuna antocianina, profilo che identifica la cultivar stessa. Come si vede nella cultivar Perricone, dall'invasatura alla raccolta, l'antociano più abbondante è la Malvidina (antociano trisostituito) ma una percentuale considerevole è costituita dagli antociani di sostituiti in particolare la Peonidina che nelle uve raggiunge percentuali di circa il 20% e della Cianidina. Se si osserva il profilo del vino corrispondente, il contenuto di Peonidina si riduce percentualmente, in quanto antociano più facilmente ossidabile (antociano disostituito). Nel profilo delle uve di Perricone il rapporto tra gli antociani acetati e p-cumarati è sempre inferiore a 1. Per quanto riguarda il Nero d'Avola, invece, una percentuale maggiore hanno gli antociani trisostituiti primo fra tutti la Malvidina e a seguire la Petunidina e la Delfinidina, antociani che si ritrovano, seppur in differenti percentuali nelle uve (tabella 2).

	1A PER	2A PER	3A PER	4A PER	VINO PER	1A NDA	2A NDA	3A NDA	4A NDA	VINO NDA
%										
Delfinidina	4,793	2,213	2,536	1,948	2,575	3,875	3,283	4,115	7,484	2,484
Cianidina	2,832	1,111	1,377	2,901	0,511	1,4	0,488	0,675	2,61	0,092
Petunidina	11,075	8,93	5,789	7,217	4,347	9,077	7,363	7,045	7,342	5,447
Peonidina	8,763	8,511	8,954	17,094	3,73	6,128	3,679	3,728	8,593	1,156
Malvidina	49,168	63,744	54,717	58,452	52,223	50,588	52,424	47,413	43,245	59,308
Acetati	10,56	3,79	11,56	3,18	22,04	15,44	14,4	18,94	14,65	19,32
Cinnamati	12,8	11,69	15,06	9,2	14,57	13,48	18,36	18,08	16,07	12,19

Tabella 2: Analisi in HPLC del profilo antocianico in uve e vini Nero d' Avola e Perricone.

Determinazione di OCRATOSSINA A mediante HPLC

L'ocratossina A (OTA) è classificata nel gruppo 2B come “possibile agente cancerogeno per l'uomo” dalla Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro. Tra le ocratossine (A, B e C) l'OTA è quella principale che si riscontra sia in matrici vegetali (cereali, legumi, caffè e vino) sia in quelle animali (latte e derivati). I principali patogeni responsabili della formazione di ocratossina A sono *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger*. Entrambi crescono a temperature temperate-calde e in condizioni di bassa umidità. I fattori predisponenti al loro sviluppo sono molteplici, quali area geografica (le zone viticole più vicine al mare e con altitudine inferiore ai 200 metri sono da considerare quelle maggiormente a rischio); condizioni meteorologiche stagionali; varietà dell'uva; sistema di allevamento; fasi fenologiche e tecniche colturali; micro e macro lesioni causate da *Botrytis cinerea*, *Lobesia botrana* e grandine. L'organo bersaglio della tossicità dell'OTA è il rene; l'esposizione cronica causa nell'uomo la nefropatia endemica dei balcani, una malattia caratterizzata da degenerazione dei tubuli prossimali, atrofia dell'epitelio tubulare e da fibrosi interstiziale.

L'attività tossica è dovuta alla capacità di questa micotossina di inibire la sintesi proteica, soprattutto nelle cellule renali. Sperimentazioni condotte con diversi modelli animali (roditori, suini, scimmia) hanno dimostrato che in relazione alla dose e alla specie animale, l'OTA può causare effetti immunotossici ed epatotossici. Gli studi di cancerogenesi hanno indicato che questa micotossina provoca l'aumento dell'incidenza di adenomi e carcinomi renali nel ratto e nel topo, e di tumori epatici nel topo, di conseguenza la IARC (International Agency of Research of Cancer) ha inserito l'OTA tra le sostanze del gruppo 2B, possibili cancerogeni per l'uomo. Gli studi in vivo, condotti su diversi animali (roditori, pulcini, scimmie) hanno dimostrato che l'OTA può indurre effetti teratogeni e fetotossici.

Il Regolamento (CE) N. 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari, include i limiti massimi ammissibili per il contenuto di OTA nel vino, nel succo, nettare e mosto d'uva, fissati in 2 ppb. Le analisi sono state condotte presso il laboratorio del Consorzio seguendo il metodo ufficiale “**Ocratossina A nel vino - OIV MA-E-AS-315-10 OCHRAT**”. I campioni di mosto hanno mostrato un contenuto in OTA molto inferiore ai limiti di legge (2 ng/ml) con un valore massimo di $0,57 \pm 0,08$ ng/ml. Sono stati analizzati successivamente campioni di vino delle medesime varietà “Perricone” e “Nero d'Avola” i quali hanno evidenziato un contenuto in ocratossina ulteriormente inferiore ai limiti di legge con valori massimi di $0,40 \pm 0,04$ ng/ml per il Perricone e $0,04$ ng/ml per il Nero d'Avola (tabella 3).

VARIETA'	LOCALITA'	OTA (ng/ml)
Mosto Perricone	S. G. Jato	0.08 ± 0.04
Mosto Nero d'Avola	S. G. Jato	0.57 ± 0.08
Mosto Nero d'Avola	Marsala	0.15 ± 0.04
Vino Perricone	S. G. Jato	0.40 ± 0.04
Vino Nero d'Avola	S. G. Jato	0.04 ± 0.02

Tabella 3: Analisi OTA in mosti e vini.

LA FRAGOLA



Fragaria vesca è una pianta perenne di origine europea (zone alpine), asiatica e americana, appartenente alla Famiglia delle Rosaceae, sottofamiglia Rosoideae, genere *Fragaria*. Spontanea nei sottoboschi italiani, è coltivata per i suoi frutti: piccole fragole dal profumo molto intenso. Le foglie sono riunite alla base in piccoli ciuffi, trifoglie e dentellate. I piccoli fiori bianchi da 4 a 6 petali fioriscono in tutto il periodo da aprile a luglio, talvolta le piante rifioriscono nuovamente in autunno. Il frutto è in realtà un falso-frutto, che sorregge i frutti propriamente detti (achenii) che sono i semi di cui è cosparsa la superficie. Ha origini molto antiche. Dati archeologici suggeriscono che le tribù primitive si cibavano già di fragole. Veniva chiamata “*fragrans*” dai Romani, in omaggio al suo intenso profumo. Sulle tavole dell'antica Roma questo frutto compariva per le feste in onore di Adone. La leggenda narra che, quando Adone morì, Venere pianse copiose lacrime, che, una volta a terra, si trasformarono in piccoli cuori rossi: le fragole. Fino al XVII secolo, in Europa venivano coltivate piante di specie selvatiche autoctone e altre introdotte dall'America del Nord. Fu un ufficiale francese, che importò dal Cile le piante madri utilizzate come base per la costituzione dell'ibrido *Fragaria x ananassa*, a cui appartengono tutte le cultivar attualmente diffuse.

In Sicilia le aree di maggiore concentrazione fragolicola sono poste nelle provincia di Marsala e Trapani con una superficie complessiva che si attesta intorno ai 300Ha. Sono state campionate 5 foglie/5 piante per ciascuna varietà (Albion, Elsensore, Fortuna, San Andreas); frutto circa gr 100 per varietà. Si è proceduto con il campionamento di due varietà coltivate sia nella zona di MALETTO (CT) che nella zona di MARSALA (TP) presso due aziende produttrici.

Aspetti nutrizionali e salutistici

Le fragole sono caratterizzate da un basso potere calorico e da un ricco contenuto in vitamine e sali minerali. Molto buono è il contenuto in vitamina C e composti antiossidanti. I sali minerali più rappresentati sono il potassio, il calcio, il fosforo ed il magnesio. Buono, infine il contenuto di fibre (tabella 4). Grazie alla presenza di sostanze antiossidanti, le fragole aiutano a combattere i tanto temuti "radicali liberi" e rallentano il naturale processo di invecchiamento delle cellule del nostro organismo. Inoltre svolgono un'azione rigeneratrice nei confronti delle cellule sanguigne, sono diuretiche e soprattutto hanno proprietà disintossicanti e depurative dell'organismo.

Valori nutrizionali per 100 g	
Calorie 33 kcal	
Acqua 90,5 g	Glucidi 8 g
Lipidi 0,3 g	Fibra alimentare 2 g
Proteine 0,7 g	Zuccheri 4,9 g
Calcio 16 mg	Acido ascorbico (vit. C) 58,8 mg
Sodio 1 mg	Retinolo (vit. A) 12 IU
Potassio 153 mg	Tiamina (Vit. B1) 0,024 mg
Ferro 0,4mg	Riboflavina (Vit. B2) 0,022 mg
Magnesio 13 mg	Niacina (Vit. B3) 0,386 mg
Fosforo 24 mg	Acido Pantotenico (Vit. B5) 0,125 mg
Zinco 0,14 mg	Piridossina (Vit. B6) 0,047 mg
Rame 0,048 mg	Folati 24 mcg
Fluoro 4,4 mg	Alpha-tocoferolo (Vit. E) 0,29 mg
Manganese 0,386 mg	Beta-Carotene 7 mcg
Selenio 0,4 mg	Luteina + zeaxantina 26 mcg

Tabella 4: Valori nutrizionali delle Fragole (INRAN).

La comunità scientifica internazionale si occupa da anni di tentare di approfondire le conoscenze sulle potenzialità salutistiche delle fragole: studi recenti sulla natura molecolare dei composti antiossidanti delle fragole hanno consentito di scoprire che esse contengono, tra gli altri, polifenoli e flavonoidi come catechina, quercetina, campferolo e antocianine, ma anche acido ellagico e resveratrolo, antiossidante abbondante anche nel vino rosso. Le elevate quantità di tali antiossidanti fanno sì che le fragole siano state inserite tra i cibi che “mantengono giovani” nella speciale classifica stilata dall’USDA (il Dipartimento dell’Agricoltura statunitense). Le analisi sono state condotte su quattro varietà di *Fragaria vesca*: Fortuna, S. Andreas, Elsenore e Albion.

Il contenuto in polifenoli nella fragola è fortemente variabile ed è influenzato dal genotipo, da fattori ambientali, dal sistema di coltivazione nonché dai metodi di conservazione post-raccolta. Le analisi condotte presso il laboratorio del Co.Ri.Bi.A. su campioni di *Fragaria vesca* evidenziano valori molto elevati nel contenuto in polifenoli totali, per le varietà S. Andreas e Fortuna (valori compresi tra 147 e 155 mg/L GAE), i valori non risultano altrettanto alti per le varietà Albion ed Elsenore (rispettivamente 65,85 e 93,4 mg/L GAE) ma ciò è comprensibile se si tiene in considerazione che le piante campionate erano leggermente disidratate e alla fine del periodo di maturazione. Anche l’attività antiossidante misurata con il metodo ABTS e DPPH è risultata essere più elevata, rispettivamente, nelle varietà Fortuna, S. Andreas, Elsenore e Albion in linea con il contenuto totale di polifenoli (grafico 7).

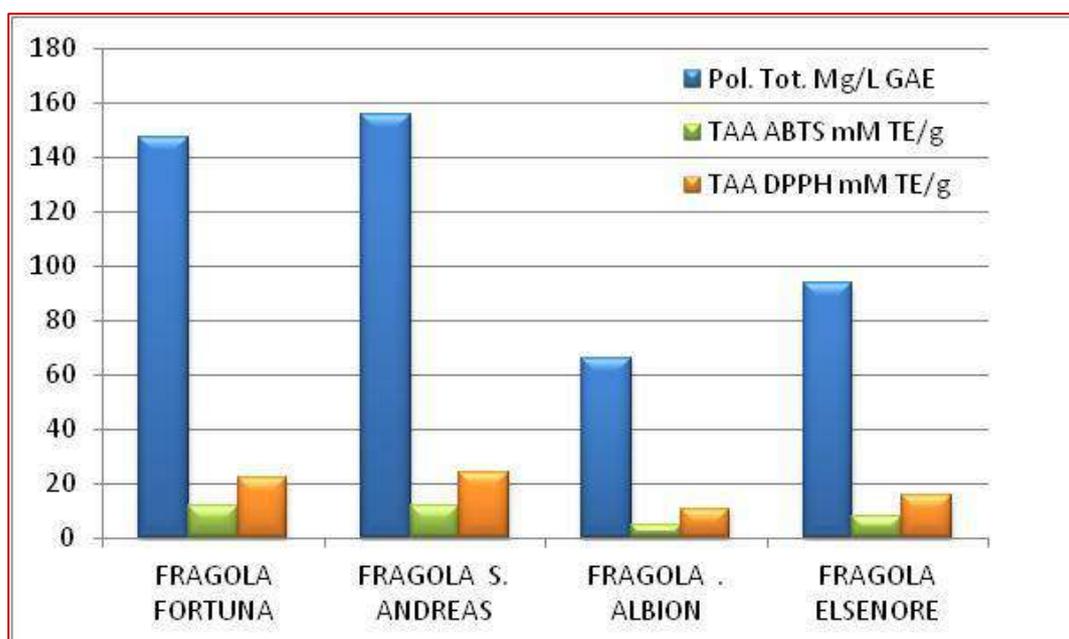


Grafico 7: Contenuto in polifenoli totali e attività antiossidante (TAA) nelle varietà di Fragola.

L'analisi in HPLC mostra una notevole concentrazione di stilbeni e polifenoli, come del resto è confermato in bibliografia, sottolineando così le eccellenti capacità antiossidanti di questi frutti. Tra questi prevalgono l'astringina (Fragola Fortuna met 100% 103,36 ng/ul, Fragola Fortuna met 80% 92,48ng/ul, Fragola S.Andreas 93,14ng/ul, Fragola Spagnola 44,99ng/ul) l'acido caffeico (Fragola Fortuna met 100% 24,64ng/ul, Fragola Fortuna met 80% 37,52ng/ul, Fragola S.Andrea 51,85 ng/ul, Fragola Spagnola 18,09ng/ul) e la galangina (Fragola Fortuna met 100% 44,19ng/ul, Fragola Fortuna met 80% 40,15ng/ul, Fragola S.Andrea 32,24ng/ul, Fragola Spagnola 10,73ng/ul), notevole inoltre è la concentrazione di quercetina e kampferolo nelle varietà Fortuna e S. Andrea dovuta probabilmente a differenti composizioni del suolo o metodi di coltura (grafico 8).

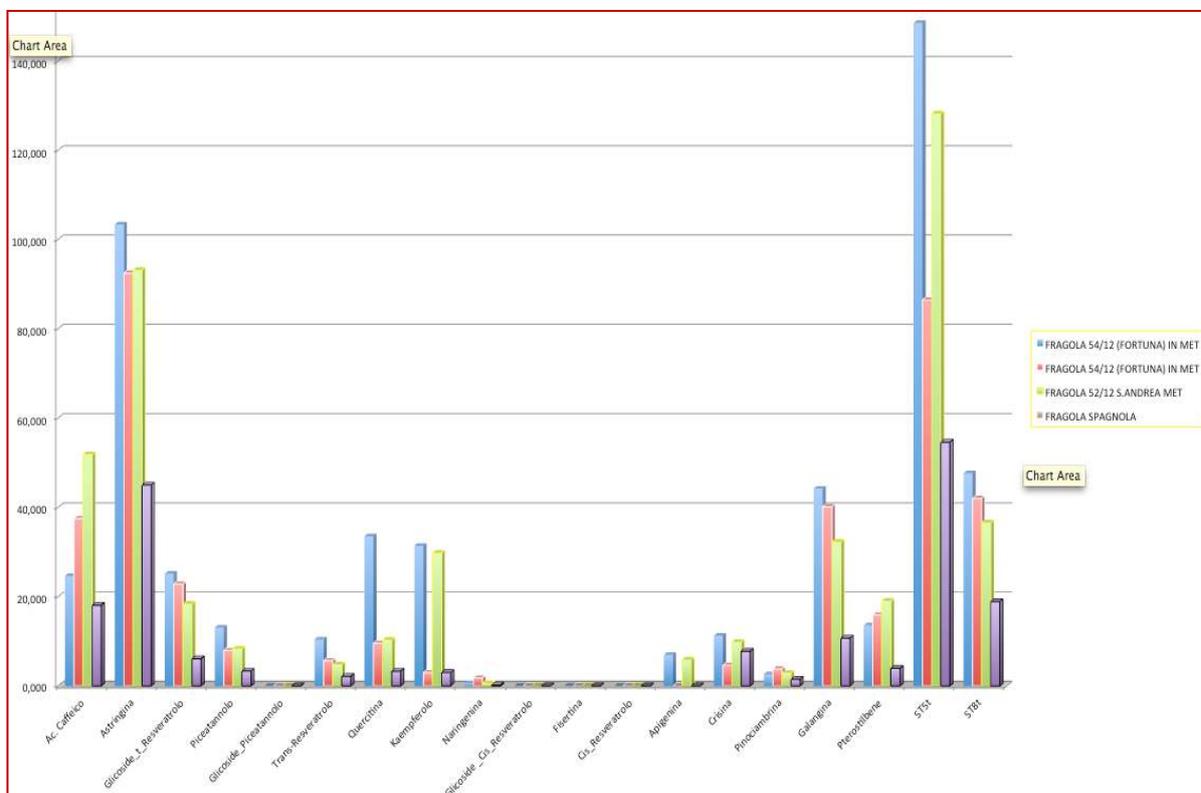


Grafico 8: Contenuto di polifenoli da analisi in HPLC nelle varietà di Fragola.

Aspetti genetici

L'impiego di tecnologie di biologia molecolare ha permesso di stabilire i livelli di variabilità genetica intervarietale. La tecnica del "fingerprinting", attraverso l'utilizzo di marcatori molecolari SSR (micro satelliti o simple sequence repeat) consente di identificare il profilo genetico delle cultivar superando i limiti dei descrittori fenologici e morfologici. Per la scelta dei microsatelliti più idonei in grado di discriminare le due varietà di fragola, "Albion" e "Elsenore", "Fortuna" e "Sant'Andrea" sono state estrapolate 10 coppie di primers, che potrebbero essere discriminanti, in particolare per i loci: UFF01D03 - UFF01H05 - UFF02C07 - UFF02F07 - UFF02G01 - UFF02H04 - UFF03B05 - UFF03D11 - UFF04G04 - UFFa 08C11. I forwards di ciascun primer sono stati marcati con fluorocromo FAM. I microsatelliti maggiormente discriminanti delle varietà oggetto di indagine sono risultati i tre riportati nel riquadro 2; le analisi necessitano, tuttavia di ulteriori conferme.

VARIETA'	UFF01H05	UFF02C07	UFF02F07
<i>Elsenore</i>	237 : 238 : 242 : 270	145 : 155	166 : 171
<i>Albion</i>	237 : 238 : 240 : 244 : 248 : 251 : 270	155	162 : 166
<i>S. Andrea</i>	238 : 240 : 251 : 270	49 : 85 : 153 : 167	162 : 166
<i>Fortuna</i>	238 : 245 : 251 : 270	51 : 145 : 154	166

Riquadro 2: Profili allelici delle varietà di Fragola.

IL MELONE



Il melone (*Cucumis melo*) è una pianta rampicante della famiglia delle Cucurbitaceae. Il termine melone indica sia il frutto che la pianta stessa, a seconda dei contesti in cui viene utilizzato. È largamente coltivata per i suoi frutti commestibili, dolci e profumati. Nel V secolo a.C. il popolo egizio iniziò ad esportarlo nel bacino del Mediterraneo e arrivò in Italia in età cristiana, come documentato da Plinio (I secolo d.C.) nel suo libro *Naturalis Historia* che lo uniformò al cetriolo a forma di mela cotogna, *meloepaes*. Durante l'Impero Romano il melone si diffuse rapidamente (utilizzato però come verdura, servito in insalata). Durante il Rinascimento, gli orticoltori laziali lo coltivavano per i Papi, nella loro residenza estiva di Cantalupo, vicino a Roma dal quale deriva il nome Cantalupo a questo melone che conosciamo così bene, rotondo a polpa aranciata e molto saporita. Le foglie della pianta di melone sono lobate, reniformi ed arrotondate, mentre le radici appaiono molto sviluppate sia in profondità che in superficie. Il melone frutto è un peponide dalla polpa arancione - gialla carnosa, succosa e dolcissima: il frutto è chiaramente distinguibile per le dimensioni imponenti e per il peso piuttosto importante (da 0,4 a 4 kg). Il melone è costituito da una buccia (epicarpo) piuttosto dura e massiccia, un mesocarpo (polpa) polposo e succoso, Il colore della polpa può variare dal bianco, al giallo, all'arancio, a seconda della varietà del frutto mentre all'interno si trovano i semi, numerosissimi incastonati in una massa alquanto spugnosa, fibrosa e molliccia. Il 60% della produzione mondiale proviene dall'Asia. In Europa i maggiori produttori sono Spagna, Romania, Francia e Italia (soprattutto nel mantovano e a Pachino in Sicilia).

Aspetti nutrizionali e salutistici

Il melone rientra tra i frutti più dolci e nel contempo dissetanti in assoluto: talvolta, la componente zuccherina supera il 13%, (al di sotto del 10-11% di zuccheri, il melone viene talvolta definito di scarsa qualità). La quantità di acqua in esso contenuta supera spesso il 90%. Malgrado l'ingente quantità zuccherina, il melone è un alimento amico delle diete povere di calorie, grazie al ridotto apporto calorico: 100 grammi di alimento apportano, infatti, solamente 34 kcal. E' ricchissimo di vitamine e di sali minerali: tra le vitamine si ricorda soprattutto la A, la C, e tracce di vitamina B1 e B2. Il melone è fonte di potassio, di fosforo, magnesio e soprattutto di beta-carotene, luteina e zeaxantina (tabella 5).

Valori nutrizionali per 100 g	
Calorie 34 kcal	
Acqua 90,15 g	Glucidi 8 g
Lipidi 0,2 g	Fibra alimentare 0,9 g
Proteine 0,8 g	Zuccheri 8 g
Calcio 9 mg	Acido ascorbico (vit. C) 36,7 mg
Sodio 16 mg	Retinolo (vit. A) 3,4 IU
Potassio 267 mg	Tiamina (Vit. B1) 0,041 mg
Ferro 0,2 mg	Riboflavina (Vit. B2) 0,019 mg
Magnesio 12 mg	Niacina (Vit. B3) 0,734 mg
Fosforo 15 mg	Acido Pantotenico (Vit. B5) 0.105 mg
Zinco 0,18 mg	Piridossina (Vit. B6) 0,072 mg
Rame 0,041 mg	Folati 21 mcg
Manganese 0,041 mg	Alpha-tocoferolo (Vit. E) 0,05 mg
Selenio 0,4 mcg	Beta-Carotene 2020 mcg
Fluoro 1 mcg	Luteina + zeaxantina 26 mcg

Tabella 5: Valori nutrizionali del Melone (INRAN).

Le proprietà e i benefici del melone sono numerosi. Ha proprietà dissetanti, diuretiche e rinfrescanti; la presenza di vitamina A conferisce al melone proprietà antiossidanti in grado di apportare benefici nel contrastare l'attività nociva dei radicali liberi. La presenza di betacarotene nel melone stimola l'organismo alla produzione di melanina, il pigmento principale della nostra pelle, mentre la vitamina B svolge un ruolo attivo nei confronti degli stati depressivi, la buona percentuale di potassio presente nella sua polpa ha effetti benefici sulla circolazione e sulla pressione arteriosa.

In particolare la varietà "Cartucciaro", analizzata presso il laboratorio del Co.Ri.Bi.A., presenta un buon valore di concentrazione di polifenoli totali e di attività antiossidante rispetto ai valori riscontrati in campioni di meloni di provenienza estera (grafico 9).

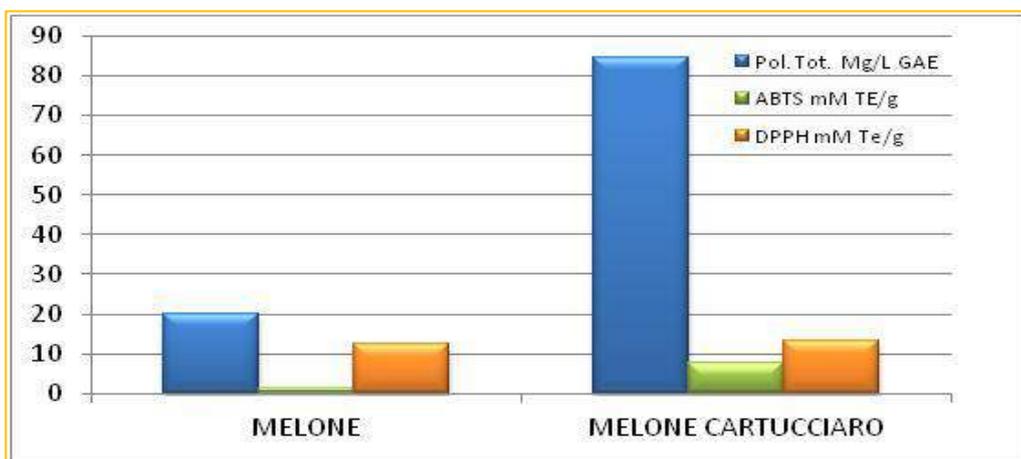


Grafico 9: Contenuto in polifenoli totali e attività antiossidante (TAA) nelle varietà di Melone.

Aspetti genetici

Le analisi molecolari sono state avviate mediante l'utilizzo di marcatori SSR (Simple Sequence Repeats) su DNA estratto dopo amplificazione tramite PCR utilizzando 9 coppie di primers, marcate con fluorocromi. Sono stati utilizzati, tra i numerosi microsatelliti descritti in bibliografia e depositati in GenBank, quelli che sono sembrati più idonei e con elevato potere discriminante in base a risultati riportati in letteratura anche se non si trattava di varietà tipiche siciliane. Di seguito vengono elencati i 9 loci microsatelliti: CM1 - CM09 - CM15 - CM17 - CM22 - CM33 - CM38 - CM39 - CM49.

Ciascuna coppia di primer delinea un profilo allelico unico. La comparazione dei profili ottenuti dalla combinazione di primers, permette la discriminazione delle cultivar analizzate. Le coppie di primers per il locus CM49 sono risultate discriminanti nell'ambito delle tre varietà esaminate; il CM09 CM17 e CM 38 discrimina la varietà *Cartucciaro* dalle altre due; il CM15 discrimina la varietà *Purceddu d'Alcamo* dalle altre due; il CM22 discrimina la varietà *Elios* dalle altre due (riquadro 3).

VARIETÀ <i>CUCUMIS MELO</i>	CM1	CM09	CM15	CM17	CM22	CM33	CM38	CM39	CM49
<i>ELIOS</i>	125:125	154:154	239:239	115:115	261:261	108:108	122:122	194:194	249:255
<i>PURCEDDU D'ALCAMO</i>	125:125	154:154	239:247	115:115	257:257	108:108	122:122	194:194	249:249
<i>CARTUCCIARO</i>	126:126	152:152	239:239	111:111	257:257	109:109	115:115	194:194	243:243

Riquadro 3: Profili allelici delle varietà di Melone.

LA NOCCIOLA



La nocciola è il frutto del nocciolo (*Corylus avellana*) una pianta appartenente alla famiglia delle Betulaceae, coltivata dall'uomo già nell'antichità. Si pensa che sia originario dell'Asia, poiché sono stati trovati manoscritti risalenti a 5000 anni fa che parlano di questa pianta considerata sacra. Anche i Greci e i Romani apprezzavano le qualità medicinali di questa pianta. Ha portamento a cespuglio o ad albero e raggiunge l'altezza di 5-7 m. È una specie monoica diclina. Le infiorescenze sono unisessuali. Le maschili in amenti penduli che si formano in autunno, le femminili somigliano ad una gemma di piccole dimensioni. Ogni cultivar di nocciolo è autosterile ed ha bisogno di essere impollinata da un'altra cultivar. Il frutto è avvolto da brattee da cui si libera a maturazione e cade. Il nocciolo ha trovato il suo habitat naturale nel bacino del Mediterraneo, infatti i principali produttori sono la Turchia, la Spagna, la Francia e l'Italia. In particolare in quest'ultima le principali regioni produttrici sono: Campania, Lazio, Piemonte e Sicilia (nella provincia di Messina, ma anche sull'Etna, sulle Madonie e nei dintorni di Piazza Armerina). La cultivar di riferimento è la Tonda Gentile delle Langhe piemontesi, molto richiesta dall'industria dolciaria. Si ambienta con difficoltà fuori dalla sua area classica di coltivazione. In Sicilia la varietà più diffusa è la "Nostrale" ottima per la tostatura perché esalta il suo aroma intenso.

Aspetti nutrizionali e salutistici

Le nocciole sono semi oleosi, quindi particolarmente ricchi di grassi, in particolare di acidi grassi mono e polinsaturi che aiutano a controllare i processi infiammatori. L'importanza nutrizionale delle nocciole è anche imputabile all'elevato contenuto in vitamine (vitamina E, B6, folati e tiamina) e sali minerali (rame, ferro, manganese e calcio). Ad ogni modo, considerato il loro elevato apporto calorico, le nocciole andrebbero consumate con moderazione (10-20 grammi sono più che sufficienti). Se assunte in piccole dosi hanno proprietà antiossidanti, ricostituenti, ipoglicemizzanti e ipocolesterolemizzanti (sono una buona fonte di steroli vegetali) (tabella 6).

Valori nutrizionali per 100 g	
Calorie 628 kcal	Acqua 5,31 g
Lipidi 60,75 g	Glucidi 16,7 g
Acidi grassi saturi 4,5 g	Fibra alimentare 9,7 g
Acidi grassi polinsaturi 8 g	Zuccheri 4,34 g
Acidi grassi monoinsaturi 46 g	Acido ascorbico (vit. C) 6,3 mg
Proteine 14,95 g	Retinolo (vit. A) 20 IU
Calcio 114 mg	Tiamina (Vit. B1) 0,643 mg
Sodio 0 mg	Riboflavina (Vit. B2) 0,113 mg
Potassio 680 mg	Niacina (Vit. B3) 1,8 mg
Ferro 4,7 mg	Acido Pantotenico (Vit. B5) 0,918 mg
Magnesio 163 mg	Piridossina (Vit. B6) 0,563 mg
Fosforo 19 mg	Folati 113 mcg
Zinco 2,45 mg	Alpha-tocoferolo (Vit. E) 15,03 mg
Rame 1,725 mg	Beta-Carotene 11 mcg
Manganese 6,175 mg	Luteina + zeaxantina 92 mcg
Selenio 2,4 mcg	Fitosteroli 96 mg

Tabella 6: Valori nutrizionali delle Nocciole (INRAN).

Nonostante le nocciole tostate siano più sensibili ai processi degradativi dovuti alla rottura degli oleosomi durante il trattamento termico, esse mostrano comunque un maggior contenuto polifenolico rispetto alle nocciole naturali in conseguenza alla inattivazione termica della polifenolossidasi. Inoltre sono stati analizzati anche i residui pellicolari che mostrano concentrazioni molto elevate di polifenoli totali. Tale sottoprodotto della lavorazione della nocciola costituisce infatti un'ottima fonte per l'ottenimento di concentrati fenolici naturali ad attività antiossidante particolarmente potente e potrebbe trovare ampie applicazioni da parte dell'industria alimentare (additivo naturale per l'industria di trasformazione), cosmetica (in pillole o aggiunto in formulazioni cosmetiche varie) e farmaceutica (ingrediente per integratori alimentari).

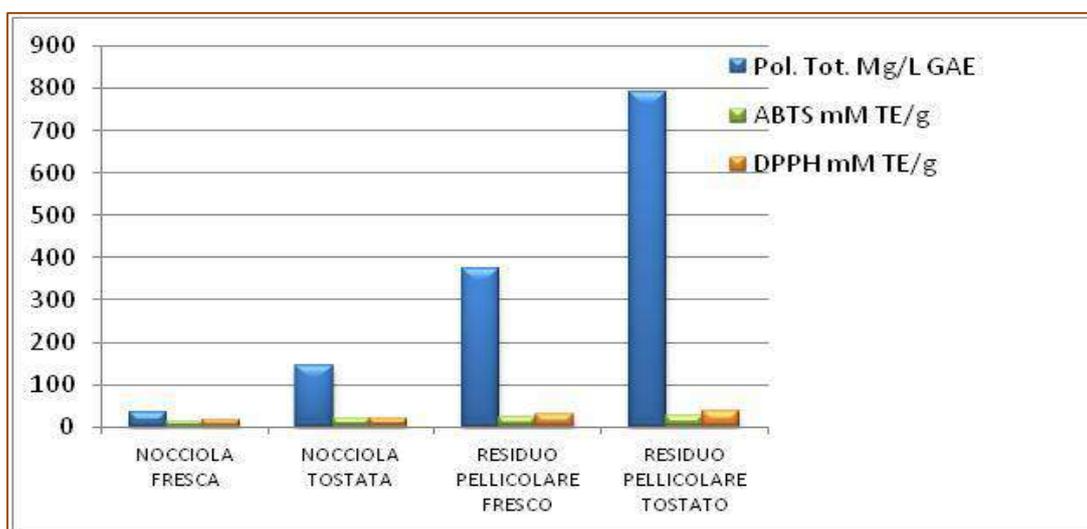


Grafico 10: Contenuto in polifenoli totali e attività antiossidante (TAA) nella Nocciola "Nostrale".

Il campione di nocciola analizzato dal Co.Ri.Bi.A., è risultato privo di aflatossine. Di seguito si riporta la tabella di riferimento dei limiti massimi tollerabili di aflatossine nelle diverse categorie di alimenti secondo la Direttiva 2006/1881/CE (tabella 7).

Limiti Massimi Tollerabili di aflatossine (Direttiva 2006/1881/CE)			
Prodotto	B1	B1+B2+G 1+G2	M1
Arachidi, frutta a guscio, frutta secca e relativi prodotti derivati destinati al consumo umano diretto	2	4	
Arachidi da sottoporre a cernita	8	15	
Frutta a guscio e frutta secca da sottoporre a cernita	5	10	
Cereali e prodotti derivati eccetto granturco e alimenti per l'infanzia	2	4	
Granturco da sottoporre a cernita	5	10	
Cereali e alimenti per lattanti e bambini	0.10		
Alimenti e latte per lattanti			0.025
Latte crudo e trattato termicamente			0.050
Spezie	5	10	
Alimenti dietetici	0.10		0.025

Tabella 7: Limiti Massimi tollerabili di aflatossine in matrici alimentari.

Aspetti genetici

Da una ricerca bibliografica, per la scelta dei microsatelliti più idonei in grado di discriminare le due varietà di nocciolo prese in considerazione, “Nostrale” e “Tonda Gentile delle Langhe”, sono state estrapolate 9 coppie di primers, i cui forwards sono stati marcati con fluorocromi FAM ed HEX (CaC-B028 - CaC-B028 - CaT-B107 - CaT-B501 - CaT-B502 - CaT-B503 - CaT-B504 - CaT-B507 - CaT-B508).

I valori per ciascun allele di ogni microsatellite dovrebbero essere ulteriormente indagati, ciononostante i risultati ottenuti sono molto incoraggianti poiché in bibliografia vengono riportati pochi dati e pochi gruppi di ricerca lavorano su tale matrice.

VARIETA' NOCCIOLO	CaT-B107		CaT-B501		CaT-B503		CaT-B507	
	ALLELE 1	ALLELE 2	ALLELE 1	ALLELE 2	ALLELE 1	ALLELE 2	ALLELE 1	ALLELE2
<i>Nostrale</i>	112	120	115	128	-	123	183	192
<i>Tonda delle Langhe</i>	132	150	-	128	115	123	184	192

Riquadro 4: Profili allelici delle varietà di Nocciolo.

L'ARANCIA



L'arancia è il frutto dell'arancio (*Citrus sinensis*), una pianta sempreverde appartenente al genere *Citrus* e alla famiglia delle Rutacee. L'arancio è originario della Cina e del sud-est asiatico. Fu introdotto nel nostro Paese dagli arabi nel XIV secolo. Produce frutti in varietà amara, dolce e sanguigna. Viene coltivato in molte aree del Mediterraneo (Spagna, Grecia e Italia, dove gli aranceti da secoli caratterizzano il paesaggio dell'isola di Sicilia) nelle quali è stato diffuso dapprima dagli arabi e in seguito dai mercanti genovesi. L'arancia presenta esternamente una scorza detta *pericarpo* che inizialmente è di colore verde e poi, nel frutto maturo diventa gialla, arancione o rossastra. La parte interna, detta *endocarpo*, è polposa e commestibile ed è divisa in logge detti spicchi (da 8 a 12) che contengono alcuni semi e il succo di colore giallo, arancione o rosso. Fra pericarpo ed endocarpo troviamo il *mesocarpo (albedo)* dal colore biancastro, dalla consistenza spugnosa e dal sapore amarognolo.

Possiamo suddividere le arance in due macrocategorie: arance bionde e arance rosse, distinte essenzialmente dalla colorazione della polpa: giallo-arancio per le prime e rossastra per le seconde. Tra le principali arance rosse ricordiamo la Tarocco (tipico frutto da tavola, molto gustoso e anche facile da sbucciare, ha forma sferica, un po' schiacciata nella parte apicale, la buccia è di medio spessore, piuttosto tenue, la polpa presenta striature rosse e non ha semi) e la Sanguinello (dalla forma oblunga, sono arance poco zuccherine e contengono una notevole quantità di acido citrico, maturano tardivamente).

Aspetti nutrizionali e salutistici

Le arance rappresentano una importante fonte di vitamine: soprattutto la C e la A, ma anche quelle del gruppo B, (in particolare tiamina, riboflavina e niacina). Inoltre vantano anche un elevato contenuto di bioflavonoidi, sostanze che assieme alla vitamina C, sono molto importanti soprattutto per la ricostituzione del collagene del tessuto connettivo, contribuendo alla prevenzione della fragilità capillare e migliorando in generale il flusso venoso. Le arance “rosse” sono molto ricche di *antocianine* in grado di contrastare con successo, gli stati infiammatori. La vitamina C contenuta nell’arancia presenta proprietà antianemiche poiché favorisce l’assorbimento del ferro. La parte bianca della polpa contiene molte fibre che aiutano a regolare l’assorbimento dei grassi, zuccheri e proteine, favorendo di conseguenza il transito intestinale (tabella 8).

Valori nutrizionali per 100 g	
Calorie 47 kcal	
Acqua 86,75 g	Glucidi 11,75 g
Lipidi 0,12 g	Fibra alimentare 2,4 g
Proteine 0,94 g	Zuccheri 9,35 g
Calcio 40 mg	Acido ascorbico (vit. C) 36,7 mg
Sodio 0 mg	Retinolo (vit. A) 225 IU
Potassio 181 mg	Tiamina (Vit. B1) 0,087 mg
Ferro 0,1 mg	Riboflavina (Vit. B2) 0,04 mg
Magnesio 10 mg	Niacina (Vit. B3) 0,282 mg
Fosforo 14 mg	Acido Pantotenico (Vit. B5) 0,25 mg
Zinco 0,07 mg	Piridossina (Vit. B6) 0,06 mg
Rame 0,045 mg	Folati 30mcg
Manganese 0,025 mg	Alpha-tocoferolo (Vit. E) 0,18 mg
Selenio 0,5 mcg	Beta-Carotene 71 mcg
	Luteina + zeaxantina 129mcg

Tabella 8: Valori nutrizionali dell’Arancia (INRAN).

Molti studi hanno riportato una attività antiossidante diversa in arance provenienti da diversi siti di produzione e da varietà differenti. Il contenuto di polifenoli totali nelle arance analizzate presso il laboratorio del Co.Ri.Bi.A. (Sanguinello, Tarocco Gallo, Tarocco Comune e Tarocco Nucellare) è stato compreso nel range tra 171,9 mg/L del Tarocco Gallo e 223 mg/L GAE del Tarocco Nucellare.

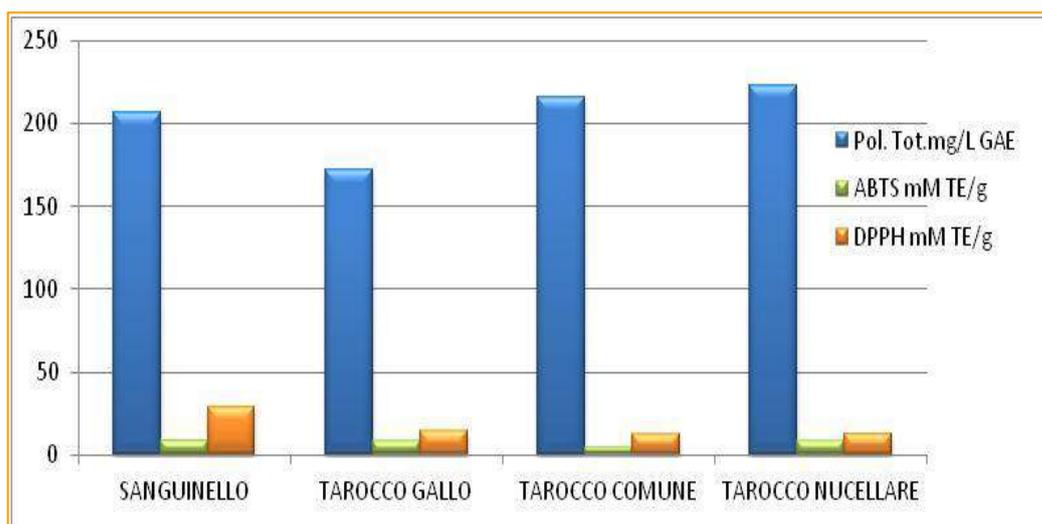


Grafico 11: Contenuto in polifenoli totali e attività antiossidante (TAA) nelle varietà di Arance.

I polifenoli maggiormente presenti in tutte e quattro le varietà sono la **crisina** (varia da un minimo di 7,23 ng/ul nel Tarocco Comune a un massimo di 22,63 ng/ul nel Tarocco Nucellare), la **pinociambrina** (min 5,83ng/ul nel Tarocco Comune e max 53,03 ng/ul nel Tarocco Nucellare) e la **galangina** (min 4,76ng/ul nel Tarocco Gallo e max 28,35 ng/ul nel Tarocco Nucellare). Notevole inoltre è la concentrazione di **Glicoside_trans_Resveratrolo** nel Tarocco Nucellare (con valori massimi di 16,21 ng/ul nell'albedo) e del **kaempferolo** nel Tarocco Comune (circa 3,92 ng/ul nel succo)(grafico 12).

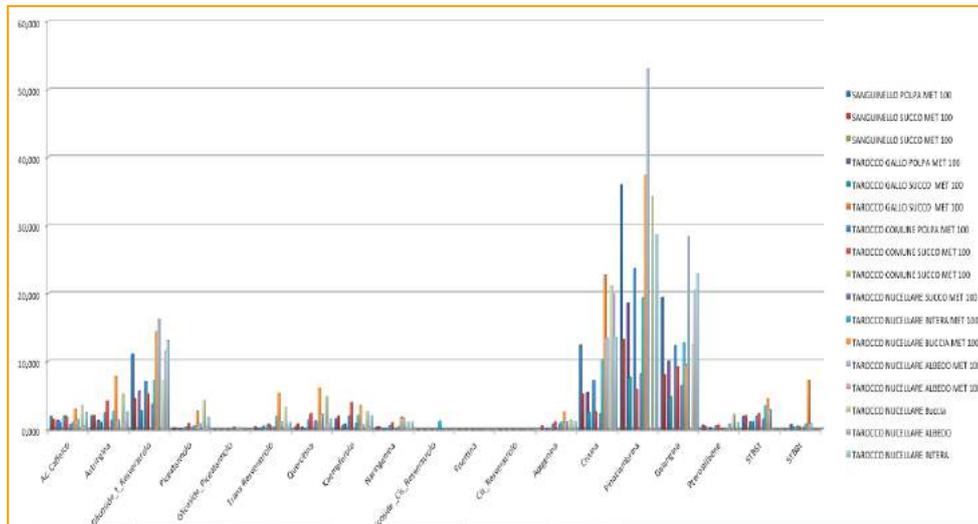


Grafico 12: Contenuto di polifenoli da analisi in HPLC nelle varietà di Arance.

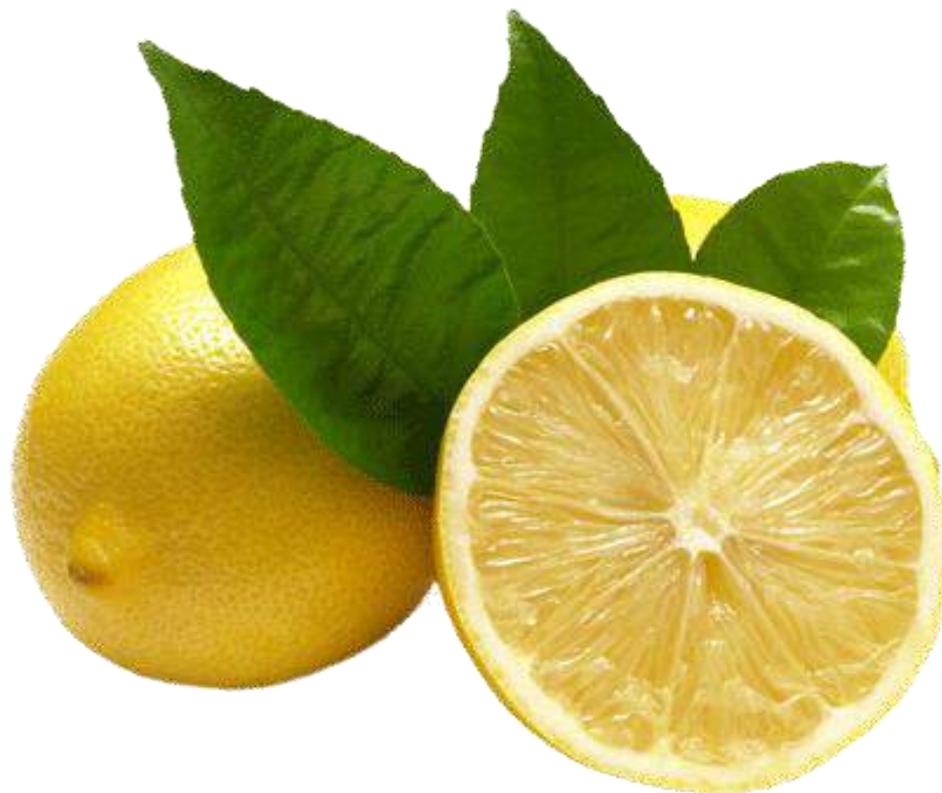
Aspetti genetici

Per l'identificazione delle diverse varietà di arance campionate, (varietà Tarocco nucleare, Tarocco gallo, Tarocco gallo risinatu e Sanguinello) sono stati scelti, confrontando dati di letteratura, 10 coppie di primers specifici con marcatura FAM ed HEX, quali: AC01 - AG14 - CAG01 - CAT01 - CT02 - CT21 - CTT01 - CMS4 - CMS7 - CMS8. I microsatelliti AG14 - CAG01 - CAT01 - CT02 mostrano maggiori differenze, ma le analisi meritano ulteriori approfondimenti e possono considerarsi solo dati preliminari.



Figura 7 : PCR su campioni di DNA di Arancia.

IL LIMONE



Il limone (*Citrus limon*) appartiene alla famiglia delle Rutacee. È un albero molto vigoroso, alto fino a 6 m. Il frutto è una bacca, detta anche esperidio, di media pezzatura, ovoidale, con almeno un'estremità pronunciata, con una buccia di colore verde o giallo pallido, ricca di oli essenziali, liscia o rugosa e tendenzialmente sottile. La polpa, succosa, acida e pigmentata di giallo, è costituita da 8-10 spicchi aderenti tra loro e può contenere alcuni semi (poliembrionici) di colore bianco oppure esserne priva (frutti apireni). Il limone è originario dell'India e dell'Indocina: la sua prima descrizione appare già in epoca romana fin dal I secolo in alcuni dipinti pompeiani. Un'altra descrizione del limone appare in scritti indiani del XII secolo: la parola *limun*, in arabo, indica però indifferentemente tutti gli agrumi, e per tale motivo potrebbe essere che il limone e le sue proprietà fossero già conosciute dal popolo arabo e appellato, insieme a tutti gli altri agrumi, col nome *limun*. Il limone giunse in Europa nel 1200 a. C. : la sua prima coltivazione è attestata in Sicilia.

La seconda cultivar, per importanza produttiva in Italia, dopo la Feminello è la "Monachello". Essa partecipa in ragione di circa il 10-12% alla composizione varietale nazionale. È quella che in assoluto resiste meglio al mal secco, ma le piante sono più lente nella messa a frutto e poco produttive. In certi ambienti non è molto rifiorente ed è per questo che è necessario ricorrere alle tecniche di forzatura per ottenere una determinata produzione. Talvolta viene innestato sull'arancio amaro con risultati non molto longevi. Solo le recenti selezioni clonali del Monachello presentano in forma attenuata i noti difetti di questa cultivar.

Aspetti nutrizionali e salutistici

Il limone è il vegetale con il più alto contenuto di acido citrico, una sostanza essenziale per il ricambio energetico delle cellule. Contiene inoltre citrati di sodio e di potassio, che hanno un notevole potere depurativo. L'uso del limone è davvero vario e spazia in tutti i campi, da quello alimentare, a quello medico-farmacologico, a quello dell'industria conserviera, alla profumeria e liquoreria. Ha innumerevoli effetti benefici per la salute ed è noto per le sue proprietà terapeutiche da diverse generazioni. Ostacola l'insorgere dell'osteoporosi, riequilibra il pH del corpo, migliora la digestione, favorisce il riposo, previene raffreddore e influenze, depura il fegato, elimina gli acidi urici, favorisce l'attività intestinale, dissolve i calcoli biliari, renali e i depositi di calcio che si accumulano nei reni, contrasta i radicali liberi, previene l'invecchiamento cellulare dell'organismo, abbassa il colesterolo, favorisce la digestione, ha proprietà antibatteriche, antinfiammatorie e antitumorali.

Valori nutrizionali per 100 g	
Calorie 22 kcal	
Acqua 92,31 g	Glucidi 6,9 g
Lipidi 0,22 g	Fibra alimentare 0,3 g
Proteine 0,35 g	Zuccheri 2,52 g
Calcio 6 mg	Acido ascorbico (vit. C) 38,7 mg
Sodio 1 mg	Retinolo (vit. A) 6 IU
Potassio 103 mg	Tiamina (Vit. B1) 0,024 mg
Ferro 0,08 mg	Riboflavina (Vit. B2) 0,015 mg
Magnesio 6 mg	Niacina (Vit. B3) 0,091 mg
Fosforo 8 mg	Acido Pantotenico (Vit. B5) 0,131 mg
Zinco 0,05 mg	Piridossina (Vit. B6) 0,046 mg
Rame 0,016 mg	Folati 20 mcg
Manganese 0,012 mg	Alpha-tocoferolo (Vit. E) 0,15 mg
Selenio 0,1 mcg	Beta-Carotene 1 mcg
	Luteina + zeaxantina 15 mcg

Tabella 9: Valori nutrizionali del Limone (INRAN).

La varietà di limone Monachello analizzata dal Consorzio, presenta elevati livelli di antiossidanti sia nella totalità (grafico 13) che nella specifica composizione polifenolica nelle diverse porzioni del frutto (grafico 14). A livello della buccia troviamo maggiormente concentrata la **pinociambrina** che raggiunge valori di 44,20 ng/ul, la **galangina** (10,64 ng/ul) e la **crisina** (21,84 ng/ul); la crisina e la galangina nell'albedo (rispettivamente 14,19ng/ul e 8,95 ng/ul) e l'**acido caffeico** e l'**astrigina** nel frutto intero (10,33 ng/ul e 11,16 ng/ul).

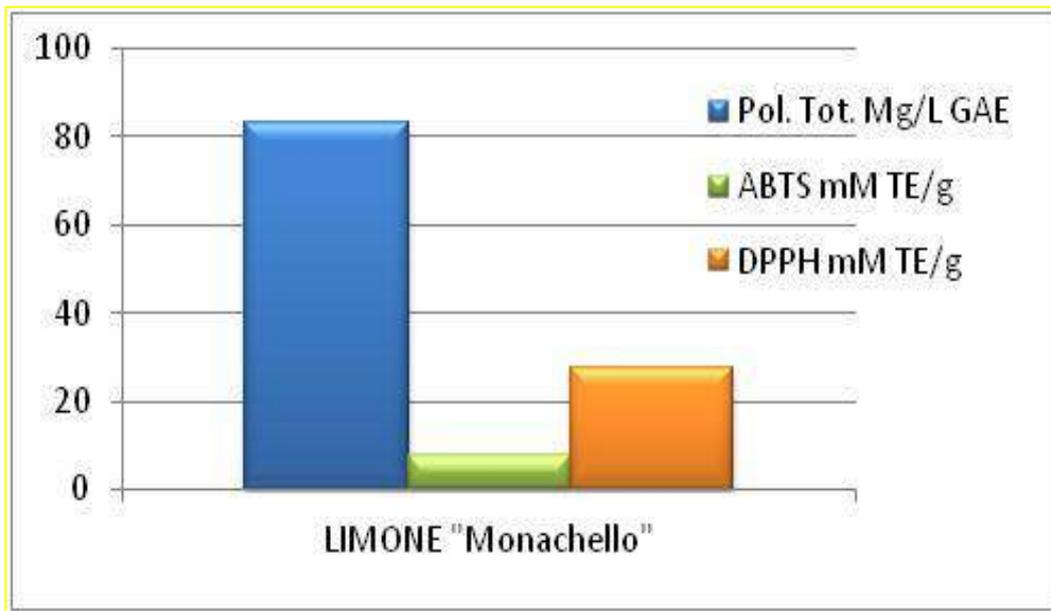


Grafico 13: Contenuto in polifenoli totali e attività antiossidante (TAA) nel Limone.

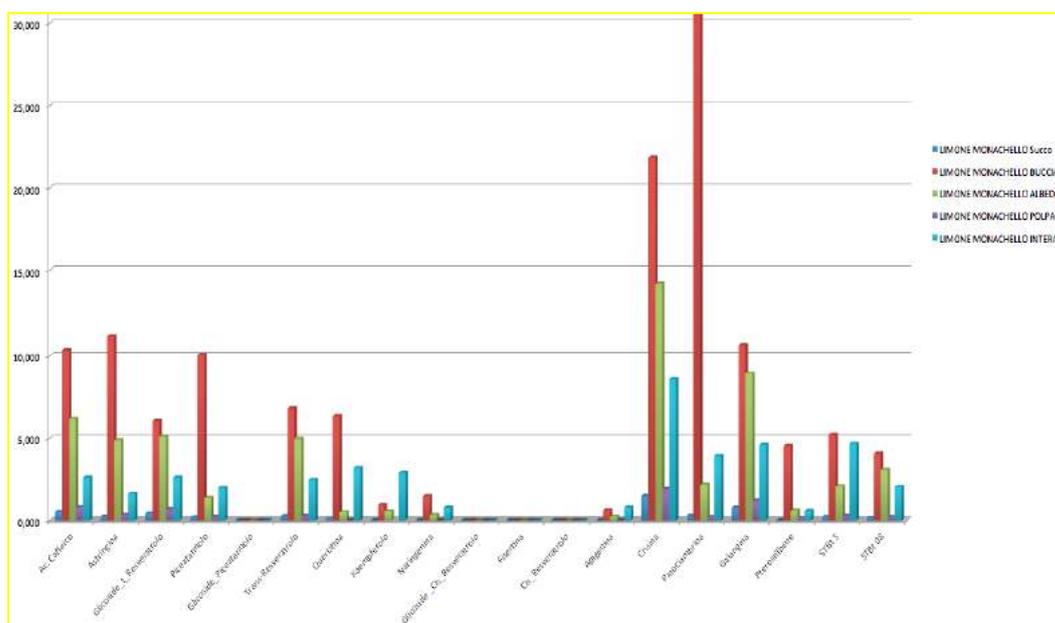


Grafico 14: Contenuto di polifenoli da analisi in HPLC nel Limone.

Aspetti genetici

Per l'identificazione molecolare della cultivar del limone "Monachello" sono stati scelti, confrontando dati di letteratura, alcuni primers specifici marcati FAM ed HEX, quali: AMB2 - AMB3 - AMB5 - AMB7 - AMB8 - AMB10. Per la reazione di PCR è stato applicato il seguente programma di amplificazione: 94°C 4 min - 94°C 1 min - T. A. 55°C 1 min - 72°C 1 min - 72°C 4 min (32 cicli). La corsa elettroforetica relativa all'amplificazione del campione di DNA estratto dalla cultivar "Monachello", per le coppie di primers riferiti ai sette SSR scelti mostra bande nette e ben determinate. Il profilo allelico necessita però di ulteriori analisi di conferma.

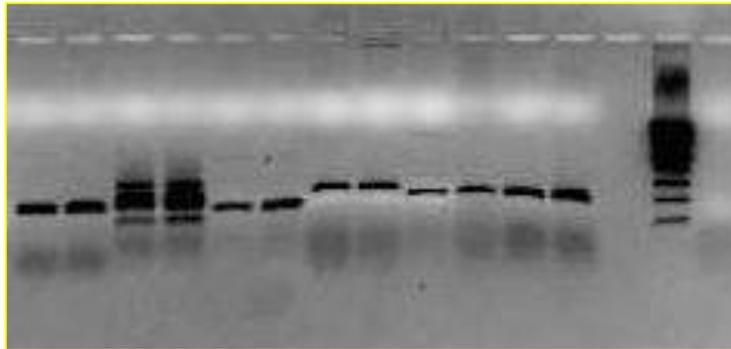


Figura 8: PCR su campioni di DNA di limone varietà Monachello.

IL CARCIOFO



Il carciofo, *Cynara scolymus* è una pianta della famiglia delle Asteracee coltivata in Italia e in altri Paesi per uso alimentare e, secondariamente, medicinale. Documentazioni storiche, linguistiche e molecolari sembrano indicare che la domesticazione del carciofo (*Cynara scolymus*) dal suo progenitore selvatico (*Cynara cardunculus*) possa essere avvenuta in Sicilia, a partire dal I secolo circa. Proprio in orti familiari della Sicilia centro-occidentale (nei dintorni di Mazzarino) ancora oggi si conserva un'antica cultivar che, sotto il profilo morfologico e molecolare, sembrerebbe una forma di transizione tra il cardo selvatico ed alcune delle varietà di carciofo di più ampia diffusione. La pianta chiamata *Cynara* era già conosciuta dai greci e dai romani, ma sicuramente si trattava della specie selvatica. Nel secolo XV il carciofo era già consumato in Italia. Venuto dalla Sicilia, appare in Toscana verso il 1466. La tradizione dice che fu introdotto in Francia da Caterina de' Medici, la quale gustava volentieri i cuori di carciofo. Sarebbe stata costei che lo portò dall'Italia alla Francia quando si sposò con il re Enrico II di Francia. Il carciofo è una pianta erbacea perenne. La superficie della lamina è verde lucida o verde-grigiastra sulla pagina superiore, mentre nella pagina inferiore è verde-cinerea per la presenza di una fitta tomentosità. Le estremità delle lacinie fogliari possono esse spinose in alcune varietà (Spinoso di Palermo, Spinoso Sardo).

Nel capolino immaturo l'infiorescenza vera e propria è protetta da una serie di brattee involucri strettamente embricate, con apice inerme, mucronato o spinoso, a seconda della varietà. La parte edule del carciofo è rappresentata dalla base delle brattee e dal ricettacolo, quest'ultimo comunemente chiamato cuore.

Aspetti nutrizionali e salutistici

I carciofi rappresentano una vera e propria miniera di principi attivi e vantano particolari virtù terapeutiche. Hanno pochissime calorie e contengono molte fibre, oltre ad una buona quantità di calcio, fosforo, magnesio, ferro e potassio. Sono dotati di proprietà regolatrici dell'appetito, vantano un effetto diuretico e sono consigliati per risolvere problemi di colesterolo, diabete, ipertensione. I carciofi contengono cinarina, presente in concentrazione massima durante la formazione del capolino, in grado di provocare un aumento del flusso biliare e della diuresi e in particolare di ridurre il livello di colesterolo (tabella 10).

Valori nutrizionali per 100 g	
Calorie 47 kcal	
Acqua 84.9 g	Glucidi 11 g
Lipidi 0,2 g	Fibra alimentare 5 g
Proteine 3,3 g	Zuccheri 1 g
Calcio 44 mg	Acido ascorbico (vit. C) 11,7 mg
Sodio 94 mg	Retinolo (vit. A) 13 IU
Potassio 370 mg	Tiamina (Vit. B1) 0,072 mg
Ferro 1,3 mg	Riboflavina (Vit. B2) 0,066 mg
Magnesio 60 mg	Niacina (Vit. B3) 1,046 mg
Fosforo 90 mg	Acido Pantotenico (Vit. B5) 0,338 mg
Zinco 0,49 mg	Piridossina (Vit. B6) 0,116 mg
Rame 0,231 mg	Folati 68 mcg
Manganese 0,256 mg	Alpha-tocoferolo (Vit. E) 0,19 mg
Selenio 0,2 mcg	Beta-Carotene 8 mcg
	Luteina + zeaxantina 464 mcg

Tabella 10: Valori nutrizionali del Carciofo (INRAN).

Il carciofo è ricco di flavonoidi glicosilati (cinaroside, scolimoside, cianaratrioside, luteolin-7-O-glucoside, inulina), composti polifenolici monocaffeilchinici (acido clorogenico, acido caffeico) che tramite studi in vivo ed in vitro hanno dimostrato l'efficacia del carciofo come epatoprotettore, diuretico, ipoglicemico, antidispeptico ecc..

L'estratto di foglie di carciofo produce nei neutrofili umani una inibizione concentrazione-dipendente dello stress ossidativo indotto. La cinarina, l'acido caffeico, l'acido clorogenico, la luteolina, risultano i principi attivi maggiormente coinvolti nell'attività protettiva antiossidante. Recentemente sono state confermate le proprietà antiradicaliche dell'estratto acquoso ed alcolico del carciofo, come pure le capacità inibenti la perossidazione lipidica. Gli estratti di carciofo esercitano efficaci proprietà contro lo stress ossidativo indotto da mediatori del processo infiammatorio e dall'ossidazione delle LDL, agiscono come antiossidanti perché catturano le ROS (Specie Reattive dell'Ossigeno) trasformandole in radicali meno aggressivi. E' nota l'importanza delle proprietà antiossidanti nel ridurre i danni ossidativi e degenerativi a livello cellulare e quindi tissutale. Dalle analisi effettuate dal Co.Ri.Bi.A. sul carciofo spinoso di Menfi e sul carciofo romanesco coltivati in Sicilia, si sono trovati i valori più elevati sia in termini di polifenoli totali 227 mg/L GAE che come attività antiossidante. I valori in polifenoli totali e attività antiossidante sono riportati nel grafico 15.

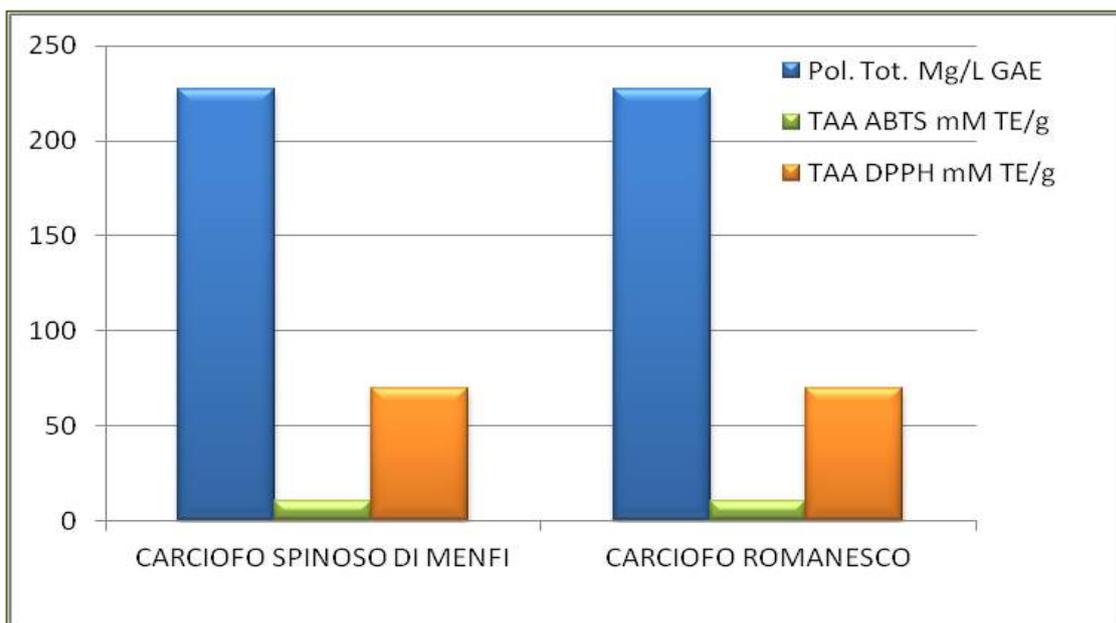


Grafico 15: Contenuto in polifenoli totali e attività antiossidante (TAA) nelle varietà di Carciofo.

La varietà Spinoso di Menfi è stata estratta con due concentrazioni di metanolo differenti, il primo (istogramma blu) con metanolo all'80 % e il secondo (istogramma verde) con metanolo assoluto. Come molti studi recenti confermano anche il carciofo è ricco di polifenoli e stilbeni che gli conferiscono una notevole attività antiossidante. Tra i polifenoli emergono in entrambe le varietà la galangina (46,14 ng/ul C. Spinoso di Menfi e 37,00 ng/ul C. Romanesco), il Glicoside_trans_Resveratrolo (C. Spinoso di Menfi 26,24 ng/ul e C. Romanesco 21,05 ng/ul) e il Glicoside_cis_Resveratrolo nel C. Spinoso di Menfi (16,63 ng/ul) (grafico 16).

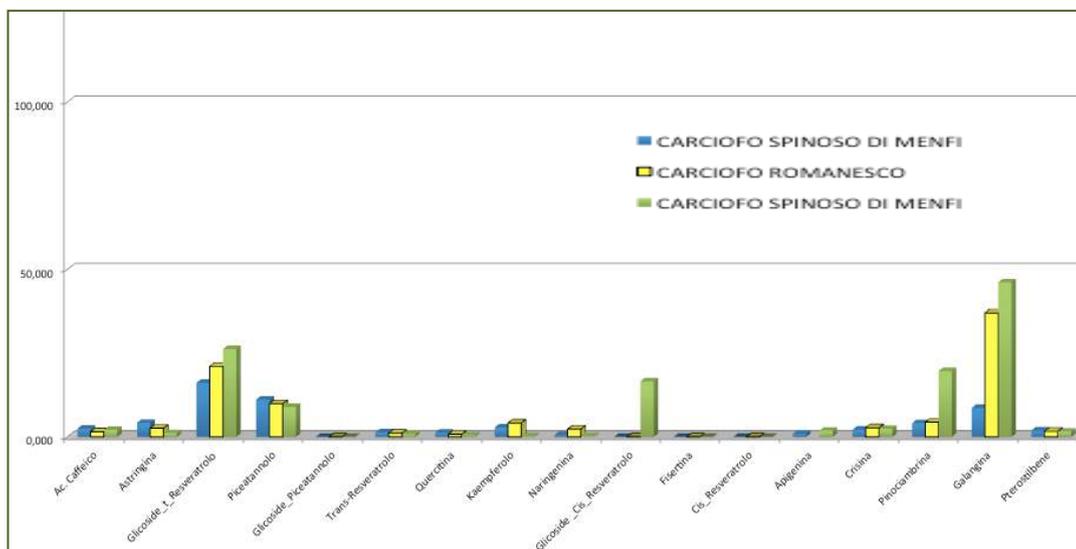


Grafico 16: Contenuto di polifenoli da analisi in HPLC nelle varietà di Carciofo.

Aspetti genetici

Per l'identificazione delle diverse varietà di carciofi campionati sono stati scelti, alcuni primers specifici con marcatura FAM ed HEX, quali: CAR1 – CAR2 – CAR3 – CAR4 – CAR5 – CAR6 – CAR7 – CAR8 – CAR9. Per la reazione di PCR è stato applicato il seguente programma di amplificazione: 94°C 1 min – 94°C 30 sec – T. A. (52° C - 55°C -59°C a seconda dei primers)30 sec – 72°C 1 min– 72°C 4 min (35 cicli). Per alcuni primers gli amplificati hanno mostrato bande nette e distinguibili (figura 9), mentre altri necessitano di miglioramenti nel protocollo di PCR ed ulteriori analisi. I dati riportati sono perciò preliminari.

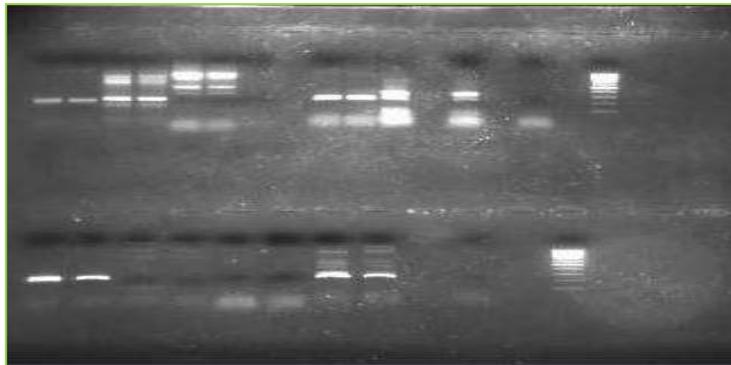


Figura 9: PCR su campioni di DNA di Carciofo.

IL POMODORO



Il pomodoro (*Solanum lycopersicum*, L. 1753, secondo alcuni autori *Lycopersicon esculentum*) della famiglia delle Solanacee, è una pianta i cui frutti sono bacche dal caratteristico colore rosso alla base di molti piatti della cucina italiana. Le parti verdi, compresi i frutti verdi, sono tossici, in quanto contengono solanina, un glicoalcaloide steroidale, che non viene eliminato nemmeno per mezzo dei processi di cottura. Il pomodoro è nativo della zona del centro-Sud America e della parte meridionale del Nord America, zona compresa oggi tra i paesi del Messico e Perù. Arriva in Italia nel 1596 ma solo più tardi, trovando condizioni climatiche favorevoli nel sud del paese, si ha il viraggio del suo colore dall'originario e caratteristico colore oro, che diede appunto il nome alla pianta, all'attuale rosso, grazie a selezioni e innesti successivi. Il pomodoro è una pianta a fusto sarmentoso e pubescente, che si ramifica abbondantemente nelle parti più basse. Nelle varietà a sviluppo indeterminato il fusto si accresce continuamente, mentre in quelle a sviluppo determinato si arresta dopo aver emesso un certo numero di fiori e di foglie. Le infiorescenze, a grappolo, sono inserite sugli internodi e la fioritura avviene a partire dai primi palchi. Il frutto è una grossa bacca, rossa a maturità, di pezzatura e forma diversa a seconda della varietà. Il pomodoro è diffuso come coltura ortiva in tutta Italia, ma in pieno campo è coltivato soprattutto in Puglia, Campania, Emilia-Romagna, Calabria e Sicilia. A seconda della destinazione del prodotto si ha infatti la coltura per consumo fresco o da mensa e quella da industria per la produzione di pelati, concentrati e succhi. Per la presenza di diverse proteine allergizzanti (Lyc e 1, Lyc e 2, 2-Apoligalatturonasi, alfa-fructofuranosidase, superossido dismutasi, pectinesterase, chitinosi), il pomodoro può essere causa di allergia alimentare.

Aspetti nutrizionali e salutistici

Questo ortaggio da sempre molto presente sulle nostre tavole, contiene discrete quantità di vitamine (caroteni, B, C, D, E) e sali minerali (potassio, fosforo, calcio). Significativa è anche la presenza di oligoelementi come il ferro, lo zinco e il selenio, che fanno del pomodoro un alimento ad alta attività antiossidante. Particolarmente ricco di licopene, una sostanza che previene diversi tipi di cancro, presenta inoltre vitamina A, vitamina C e flavonoidi. Il pomodoro contiene in una certa misura anche fibre e acidi organici (citrico, malico, succinico, tartarico, gluteninico) che stimolando sia la secrezione di saliva che di succhi gastrici, favorisce sia la digestione che l'eliminazione di acido urico (tabella 11).

Valori nutrizionali per 100 g	
Calorie 17 kcal	
Acqua 94,28 g	Glucidi 4 g
Lipidi 0,13 g	Fibra alimentare 1 g
Proteine 0,78 g	Zuccheri 2,38 g
Calcio 31 mg	Acido ascorbico (vit. C) 36,7 mg
Sodio 143 mg	Retinolo (vit. A) 117 IU
Potassio 188 mg	Tiamina (Vit. B1) 0,045 mg
Ferro 0,97 mg	Riboflavina (Vit. B2) 0,055 mg
Magnesio 11 mg	Niacina (Vit. B3) 0,712 mg
Fosforo 19 mg	Acido Pantotenico (Vit. B5) 0,118 mg
Zinco 0,14 mg	Piridossina (Vit. B6) 0,111 mg
Rame 0,069 mg	Folati 8 mcg
Manganese 0,077 mg	Alpha-tocoferolo (Vit. E) 0,68 mg
Selenio 0,1 mcg	Beta-Carotene 70 mcg
Fluoro 5,1 mcg	Luteina + zeaxantina 86 mcg

Tabella 11: Valori nutrizionali del Pomodoro (INRAN).

I pomodori rappresentano una componente principale della dieta mediterranea tradizionale e mangiare pomodori è stato associato ad una riduzione dei rischi di alcuni tipi di cancro e altre malattie. Queste proprietà benefiche sembrano essere correlate al contenuto di antiossidanti, in particolare i carotenoidi (licopene e beta-carotene), acido ascorbico e fenoli. I valori ottenuti rispecchiano i dati riportati in letteratura secondo cui la buccia rappresenta la parte del frutto a maggiore contenuto polifenolico e che quindi nel prodotto fresco andrebbe consumata e non eliminata. Dalle analisi condotte presso il Co.Ri.Bi.A., i valori più elevati come contenuto in polifenoli totali e come attività antiossidante sono stati rilevati nella varietà autoctona “pizzutello”, rispetto alle varietà “scirè” e “genio”. I valori ottenuti sono riportati nel grafico 17. I pomodori, ricchi di polifenoli e antociani, principalmente concentrati nella buccia, hanno una notevole capacità antiossidante. Tra i vari analiti ricercati emerge il **kaempferolo** in entrambe le varietà analizzate, Pomodoro Scirè IGP (5,36 ng/ul) e Pomodoro Genio IGP (4,51 ng/ul), l'**astringina** e il **piceatannolo**, in minor quantità, con valori che oscillano in media tra 0,38 ng/ul e 0,45 ng/ul per entrambi gli analiti (grafico 18).

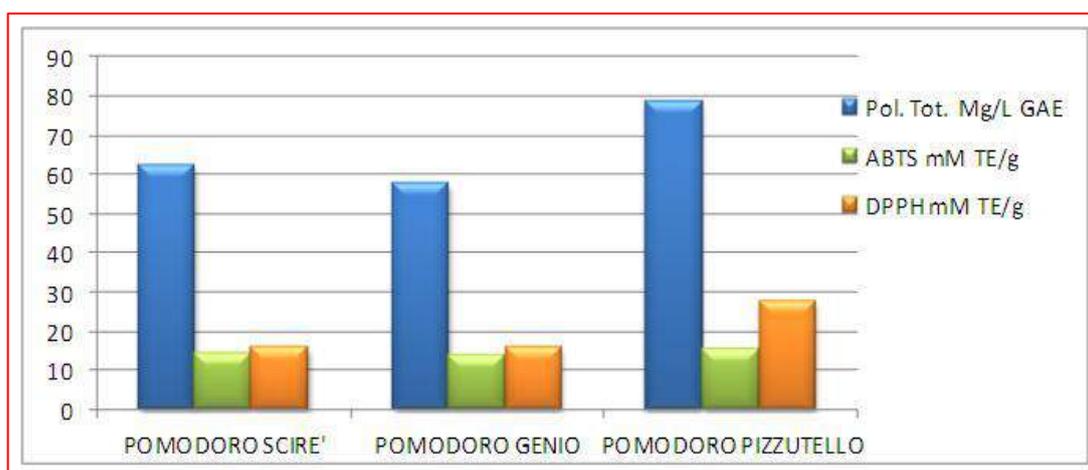


Grafico 17: Contenuto in polifenoli totali e attività antiossidante (TAA) nelle varietà di Pomodoro.

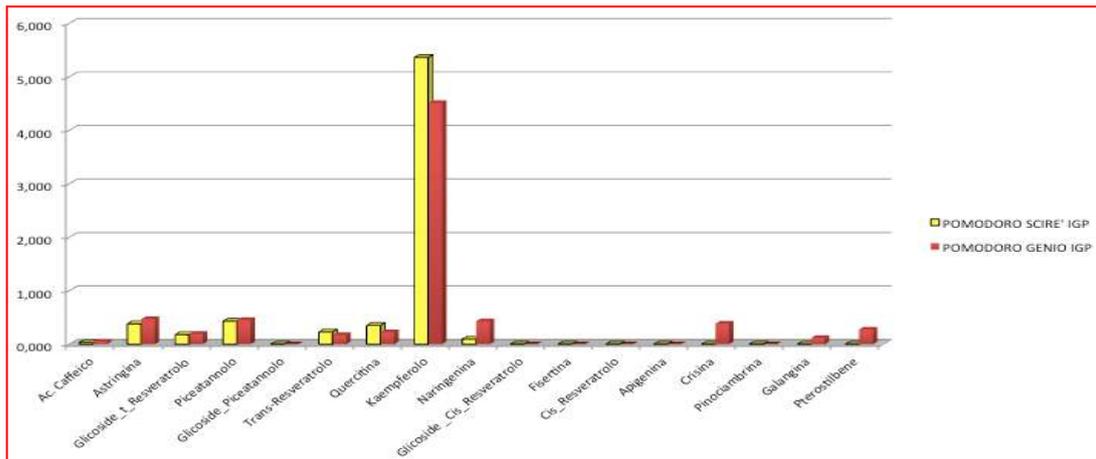


Grafico 18: Contenuto di polifenoli da analisi in HPLC nelle varietà di Pomodoro.

Aspetti genetici

Per l'identificazione delle diverse varietà di pomodori campionati sono stati scelti, confrontando dati di letteratura, alcuni primers specifici marcati in HEX e FAM, quali: TM63 - LEST253712 - TMS60 - TOM236-237 - TOM-46-48 - TMS42 - LE-20592 - LEEF-1Aa - LESSRPSGgb. E' stato applicato il seguente programma di amplificazione: 94°C 7 min - 94°C 45 sec - T. A. (54°C - 56°C a seconda dei primers) 50 sec - 72°C 1 min- 72°C 20 min (35 cicli). Uno dei maggiori problemi dei marcatori nel pomodoro e' che molti mostrano bassi livelli di polimorfismo intra ed interspecifico. Dai profili ottenuti è stato possibile come i primers scelti per l'identificazione dei microsatelliti non siano molto discriminanti nell'ambito delle cultivar.



Figura 10: PCR su campioni di DNA di Pomodoro.

LA CAROTA NOVELLA DI ISPICA



La carota (*Daucus carota*) è una pianta erbacea appartenente alla famiglia delle Apiaceae. Il 7 gennaio 2011 è entrato ufficialmente in vigore il regolamento che introduce la *carota novella di Ispica* nel registro ufficiale europeo dei prodotti ad Indicazione Geografica Protetta (IGP). Tra le varietà coltivate si ricordano: Exelso, Dordogne, Nancò, Concerto, Romance, Naval, Chambor e Selene. Le origini della Carota Novella di Ispica Igp risalgono al 1950, come documentato da un articolo del 1955 dell'agronomo Giuseppe Di Pietro, pubblicato sulla rivista di storia e cultura ispicese "Hyspicae Fundus". Da quegli anni, la sua coltivazione si è progressivamente allargata dalla zona di Ispica fino a comprendere tutti gli attuali territori, Ispica, Pachino e Pozzallo. La particolare combinazione di fattori pedoclimatici e produttivi nell'area delimitata dal disciplinare di produzione permettono al prodotto di avere una serie di caratteristiche che lo rendono unico. Le temperature invernali elevate e le ore di luce solare, in particolare, sono quelle che favoriscono una colorazione più intensa, una conformazione più regolare e un'ottimizzazione dei contenuti in zuccheri, vitamine e sali minerali. La Carota di Ispica Igp raggiunge la maturazione commerciale già alla fine di febbraio, da cui "Novella" e rimane in commercio fino agli inizi di giugno.

Aspetti nutrizionali e salutistici

Secondo i dati riportati dal consorzio di tutela della Carota novella di Ispica, questo ortaggio è una vera e propria miniera di minerali: ferro, calcio, magnesio, rame, zinco, contiene vitamine del gruppo B, nonché vitamine D, E, C e soprattutto beta-carotene. La carota aumenta le difese dell'organismo, la capacità di resistere alle malattie infettive, alle affezioni polmonarie e gastro-duodenali, nell'insufficienza epato-biliare e nelle dermatosi, aiuta a regolare i livelli di colesterolo. Previene l'invecchiamento, grazie alla sua azione antiossidante, che contrasta gli effetti nocivi dei radicali liberi che il nostro organismo produce quando è sottoposto a stress fisici (tabella 12).

Valori nutrizionali per 100 g	
Calorie 41 kcal	
Acqua 88,29 g	Glucidi 9,58 g
Lipidi 0,24 g	Fibra alimentare 2,8 g
Proteine 0,93 g	Zuccheri 2,38 g
Calcio 33 mg	Acido ascorbico (vit. C) 5,9 mg
Sodio 69 mg	Retinolo (vit. A) 16706 IU
Potassio 320 mg	Tiamina (Vit. B1) 0,066mg
Ferro 0,3 mg	Riboflavina (Vit. B2) 0,058 mg
Magnesio 12 mg	Niacina (Vit. B3) 0,983 mg
Fosforo 35 mg	Acido Pantotenico (Vit. B5) 0,273 mg
Zinco 0,24 mg	Piridossina (Vit. B6) 0,138 mg
Rame 0,045 mg	Folati 19 mcg
Manganese 0.143 mg	Alpha-tocoferolo (Vit. E) 0,66 mg
Selenio 0.1 mcg	Beta-Carotene 8285 mcg
Fluoro 3,2 mcg	Alfa-Carotene 3477 mcg
Fillochinone (vit. K) 13,2 mcg	Luteina + zeaxantina 86 mcg

Tabella 12: Valori nutrizionali della Carota (INRAN).

In letteratura si trovano diversi valori per quanto riguarda il contenuto di polifenoli totali e dell'attività antiossidante per la carota, da imputare ai differenti metodi di estrazione utilizzati e ai diversi modi di espressione dei risultati. I valori dei polifenoli totali e dell'attività antiossidante, ottenuti dalle analisi condotte dal Co.Ri.Bi.A., sono riportati nei grafici 19 e 20.

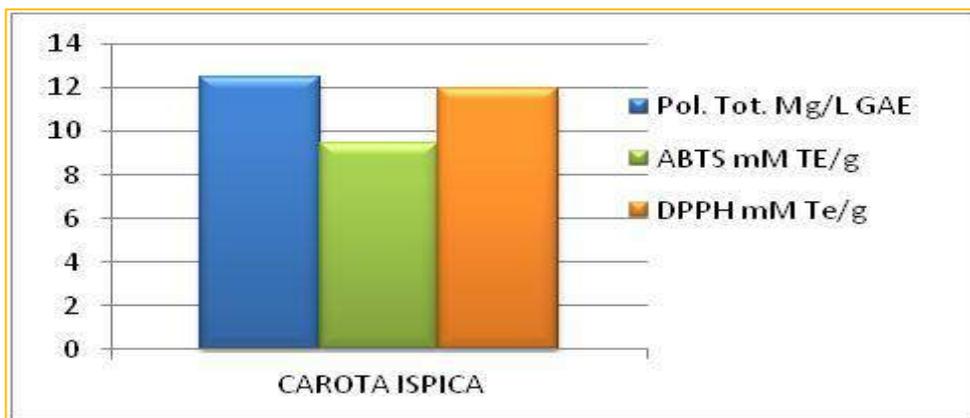


Grafico 19: Contenuto in polifenoli totali e attività antiossidante (TAA) nella Carota.

La carota, oltre a essere la fonte principale di carotenoidi è anche una risorsa non indifferente di stilbeni tra cui emergono l'astringina (1,25 ng/ul), l'acido caffeico (0,20 ng/ul) e il trans-resveratrolo (0,16 ng/ul) (grafico 20).

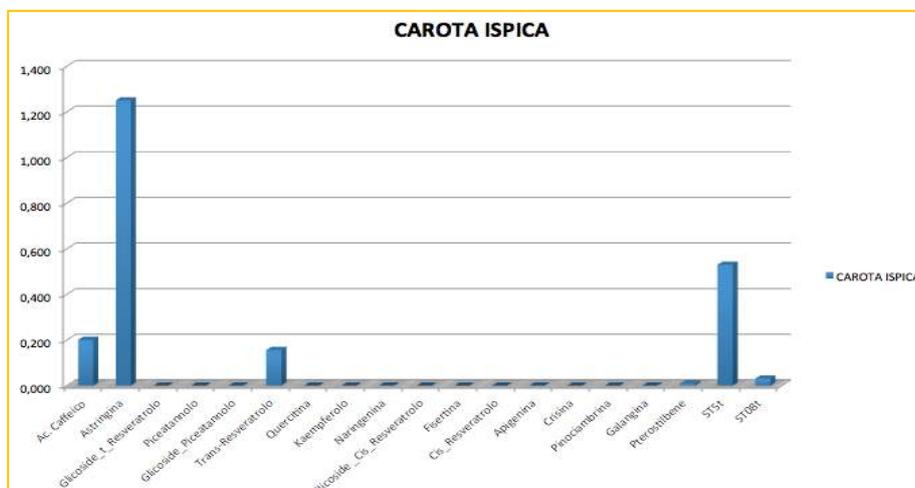


Grafico 20: Contenuto di polifenoli da analisi in HPLC nella Carota di Ispica.

CONCLUSIONI

Il progetto di ricerca “Tracciabilità e Sicurezza degli Alimenti: un valore aggiunto alle produzioni agricole del Territorio Siciliano” ha voluto valorizzare i prodotti e la biodiversità dei prodotti ortofrutticoli ad alta vocazione territoriale, valutando la presenza di componenti con proprietà salutistiche, quali polifenoli e stilbeni, la sicurezza alimentare per il consumatore attraverso la determinazione di residui di prodotti fitosanitari, in particolare quelli della serie dei carbammati ed, infine, definendo per ciascuno un profilo genetico identificativo volto a valorizzare la singola varietà.

Dai risultati ottenuti possiamo affermare innanzitutto, come tutti i prodotti analizzati siano “sicuri” per il consumatore in quanto esenti sia dalla presenza di residui fitosanitari che, come nel caso delle nocciole, da micotossine (aflatossine) e da ocratossina A nei mosti e nei vini. I risultati ottenuti dalle analisi genomiche risultano essere molto attendibili per alcune matrici esaminate (come per esempio le uve), ma necessiterebbero di ulteriori approfondimenti per ciò che concerne le altre matrici vegetali. L'appartenenza a genotipi differenti e le tecniche colturali specifiche per ciascuna area di produzione (ecotipi locali), e di conseguenza per ciascuna cultivar, permettono di distinguere i prodotti locali per i contenuti di molecole bioattive, in quanto hanno un profilo polifenolico caratteristico che potrebbe identificarlo e differenziarlo. Sarebbero, quindi, utili ed interessanti ulteriori indagini per la determinazione di polifenoli e stilbeni nelle matrici già esaminate, così come su altre classi di prodotti fitosanitari, per una maggiore e più completa caratterizzazione e valorizzazione dei prodotti ortofrutticoli siciliani.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- Acquadro A.; E. Portis; S. Lanteri. Isolation of microsatellite loci in artichoke (*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus*). *Molecular Ecology Notes* (2003).
- Ahmad R.; D. Struss; S.M. Southwick. Development and characterization of microsatellite markers in Citrus. *J. Amer. Soc. Hort.Sci.* 128(4): 584-590. 2003.
- Barcaccia G., Lucchin M., Parrini P. (2000 a) Analisi del genoma mediante marcatori molecolari: I fondamenti metodologici. *Sementi Elette* 5: 5-15.
- Bahorun T., Luximon-Ramma A., Crozier A., e Aruoma O.I., 2004. Totalphenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1553-1561.
- Baker H.G., 1972. Human Influences on Plant Evolution. *Econ. Bot.*, 26, 32-43.
- Baik H.Y., Juvic J.A., Jeffery E.H., Walling M.A., Kusand M., Klein B.P., 2003. Relating glucosinolate content and flavour of broccoli cultivar. *J. Food Sci.*,68, 1043-1050.
- Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by- products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 2006, 99, 191-203.
- Bassil NV, Botta R, Mehlenbacher SA (2005) Microsatellite markers in hazelnut: isolation, characterization and crossspecies amplification. *J Am Soc Hortic Sci* 130:543–549.
- Bassil N. V, Gunn M., Folta K. and Lewers K. (2006) Microsatellite markers for *Fragaria* from ‘Strawberry Festival’ expressed sequence tags *Molecular Ecology Notes* 6:473–476.
- Bignami, C., Cristofori, V., Troso D. Kernel quality and composition of hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. *Proceedings of the VIth International Congress on Hazelnut, Acta Horticulturae*, 686: 477-484, (2005).
- Bignami C. Dinamica della composizione del seme di tre cultivar di nocciolo (*Corylus avellana* L.) durante lo sviluppo del frutto” *Atti del 2° Convegno Nazionale sul Nocciolo*. Giffoni V.P Ottobre (2002).
- Blum A., Monir M., Wirsansky I. and Ben-Arzi S. “The beneficial effects of tomatoes”. *Eur. J. Intern. Med.* 2005; 16(6):402-4.
- Boccacci P, Akkak A, Bassil NV, Mehlenbacher SA, Botta R (2005) Characterization and evaluation of microsatellite loci in European hazelnut (*Corylus avellana* L.) and their transferability to other *Corylus* species. *Mol Ecol Notes* 5:934–937.

- Boccacci P, Akkak A, Botta R (2006) DNA typing and genetic relations among European hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars using microsatellite markers. *Genome* 49:598–611.
- Boccacci P.,A. Akkak, N.V.Bassil,S.A.Mehlenbacher and R.Botta (2005) Characterization and evaluation of microsatellite loci in European hazelnut (*Corylus avellana* L.) and their transferability to other *Corylus* species. *Molecular Ecology Notes* 5, 934–937.
- Bonoli M.; G. Cipriani; L, Manzecchi; W. Faedi. Impiego di marcatori molecolari microsatelliti nella caratterizzazione varietale della fragola. *Frutticoltura* n° 4, 2005.
- Bowers J.E.; Dangl G.S.; Vignani R.; Meredith C.P. (1996) Isolation and characterization of new polymorphic simple sequence repeat loci in grape (*Vitis vinifera* L.) *Genome*, vol. 39, n°4, pp. 628-63.
- Borek C., 1997. Antioxidants and Cancer. *Science and Medicine*, 4, 51-62. Borek C., 2001. Antioxidants Health Effects of Aged Garlic Extract. *J Nutrition*,131, 1010S-5S.
- Borek C., 2004. Dietary Antioxidants and Human Cancer. *Integrative Cancer Therapies*, 3, 333-41.
- Brera C., Grossi S., De Santis B., Miraglia M. (2003) Automated HPLC Method for the Determination of Ochratoxin A in Wine Samples. *J. Liquid Chromatography & Related Technologies* 26, 119-133.
- Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutritional Review*, 56: 317-333, (1998).
- Bowers John E, Gerald S. Dangl , and Carole P. Meredith (1999) Development and Characterization of Additional Microsatellite DNA Markers for Grape Am. J. Enol. Vitic. 50:3:243-246.
- Carratù B., Sanzini E. Sostanze biologicamente attive negli alimenti di origine vegetale. *Ann Ist Super Sanità* 41(1): 7-16, (2005).
- Chiba N, Suwabe K, Nunome T, Hirai M (2003) Development of microsatellite markers in melon (*Cucumis melo* L.) and their application to major cucurbit crops. *Breeding Science*, 53, 21–27.
- Cipriani, G., Pinoso, F., Bonoli, M., and Faedi, W. 2006. A new set of microsatellite markers for *Fragaria* species and their application in linkage analysis. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 81: 668–675.
- Costantini, L.; Monaco, A.; Vouillamoz, J. F.; Forlani, M.; Grando, M.S (2005) Genetic relationships among local *Vitis vinifera**cultivars from Campania (Italy) *Vitis*, 44 (1) 25-34.

- Creppy EE., Chiarappa P., Baudrimont I, Borracci P., Moukha S., Carratù MR. (2004). Synergistic effects of fumonisin B1 and ochratoxin A: are in vitro cytotoxicity data predictive of in vivo acute toxicity? *Toxicology* 201, 115-123.
- Cristofori V. FATTORI DI QUALITA' DELLA NOCCIOLA Tesi di Dottorato di Ricerca in "ORTOFLOORFRUTTICOLTURA" – XVIII Ciclo Università degli Studi della Tuscia Dipartimento di Produzione Vegetale Sezione Ortofloroarboricoltura
- Currie L. A., *Detection in Analytical Chemistry - Importance, Theory and Practice*, ACS Symposium, Series 361, ACS, Washington, DC (198).
- Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. (1990) *Focus*, 12: 13-14.
- Doyle, J.J., and Doyle, J.L.(1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- Fardelli A. EFFETTO DEI SISTEMI DI CONSERVAZIONE SULLA QUALITA' DELLE NOCCIOLE (CORYLUS AVELLANA L.) CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA. Biotecnologie degli Alimenti - XX CICLO, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo. Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroalimentari
- Fung F., Clark RF. (2004). Health effects of mycotoxins: a toxicological overview. *J. Toxicol.* 42, 217-234.
- Gambardella M., Cadavid-Labrada A., Diaz V., Fiore N. (2000) "Caratterizzazione di varietà di fragola in Cile utilizzando marcatori RAPD". *Frutticoltura* n.12.
- Gebbia N., M.Monte, G.Aiello, A.Calderone, F.Cannizzaro, A.Curione, A.Lo Giudice, M.Montalbano, F.Oliveri, L.Crosta INFLUENZA DEL SUOLO SULLA PRODUZIONE DI OCHRATOSSINA A LUNGO LA FILIERA VITIVINICOLA Rapporti ISTISAN 10/32.
- Gulsen O. and Roose M.L.. Lemons: diversity and relationships with selected Citrus genotypes as measured with nuclear genome markers. (2001) *J. Amer. Soc. Hort.Sci.* 126(3): 309-317.
- In-House Method Validation, LGC Teddington UK (2009) 32.
- INRAN Banca dati di composizione degli alimenti.
- Liazid, A.; Palma, M.; Brigui, J.; Barroso, G.C. Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *J. Chromatogr. A.* 2007, 1140, 29-34.
- Lo Cascio M. C. ; Tesi di laurea Specialistica in chimica. Determinazione di residui fitosanitari nella pesca: messa a punto e validazione del metodo Quechers e analisi LC-MS/MS.
- Naczki, M.; Shahidi, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, 41, 1523-1542.

- Kong Q., Xiang C., Yu Z., Zhang C., Liu F., Peng C. and Peng X. (2007) Mining and charactering microsatellites in *Cucumis melo* expressed sequence tags from sequence database. *Molecular Ecology Notes* 7, 281-283.
- Mertz, C.; Gancel, A-L.; Punata, Z.; Alter, P.; Dhuique-Mayer, C.; Vaillant, F.; Perez, A.M.; Ruales, J.; Prat, P. Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity of three tropical fruits. *J. Food. Compos. Anal.* 2009, 22, 381-387.
- Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed.
- Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, Document n° SANCO/2007/3131.
- Morgante M., Olivieri A.M. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*, 3: 175-182.
- Ross, K.A.; Beta, T.; Arntfield, S.D. A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. *Food. Chem.* 2009, 113, 336-344.
- Schneider A., Carra A., Boccacci P. (2003) Indagini ampelografiche e analisi con marcatori molecolari per la verifica di sinonimie tra vitigni minori. *Vigne vini*.
- Slinkard K, Singleton VL (1977). Total phenol analyses: Automation and Comparison with Manual Methods. *Am. J. Enol. Vitic.* 28: 49-55.
- Squadrito M., Corona O., Biosintetici degli HTCA, dei flavonoli e degli antociani negli acini d'uva. *Riv. Di Vitic. Enol.* 60 (3). pp. 59-70.
- This P, Jung A, Boccacci P, Borrego J, Botta R, Costantini Crespan M, Dangl GS, Eisenheld C, Ferreira-Monteiro F, Grando S, Ibanez J, Lacombe T, Laucou V, Magalhaes R, Meredith CP, Milani N, Peterlunger E, Regner F, Zulini L, Maul E. (2004) Development of a standard set of microsatellite reference alleles for identification of grape cultivars. *Theor Appl Genet.* Nov;109(7):1448-58.
- Tufan Gökirmak, Shawn A. Mehlenbacher and Nahla V. Bassil. Characterization of European hazelnut (*Corylus avellana*) cultivars using SSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* Volume 56, Number 2, 147-172.
- UNI EN 15662:2009, Alimenti di origine vegetale, Determinazione dei residui dei pesticidi utilizzando GC-MS e/o LC-MS/MS dopo estrazione/separazione con acetonitrile e purificazione mediante SPE dispersiva - Metodo QuEChERS.
- USDA (United States Department of Agriculture)
<http://ndb.nal.usda.gov/>