

INDICE

ABSTRACT	4
RIASSUNTO	6
1. INTRODUZIONE	9
1.1 Il pomodoro (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	9
1.2 Il pomodoro da industria	10
1.3 Aspetti nutrizionali	12
1.4 Principali composti funzionali del pomodoro	13
1.4.1 Acidi fenolici	14
1.4.2 Flavonoidi	18
1.4.3 Carotenoidi	20
1.5 L'estrazione con fluidi supercritici (SFE)	24
2. SCOPO DELLA TESI	30
3. MATERIALI E METODI.....	31
3.1 Strumentazione	36
3.2 Standard e reagenti	37
3.3 Messa a punto del metodo analitico per acidi fenolici liberi e flavonoidi	37
3.4 Messa a punto del metodo analitico per licopene e β-carotene	40
3.5 Messa a punto del metodo SFE per licopene e β-carotene.....	41
3.6 Analisi statistica	43
4. RISULTATI.....	44

4.1 Metodo ottimale per l'analisi di alcuni composti funzionali del pomodoro da industria.....	44
4.2 Metodo ottimale per SFE	46
4.3 Umidità nei pomodori da industria	47
4.4 Acidi fenolici liberi e flavonoidi	49
4.5 Licopene e β-carotene	65
4.6 Licopene e β-carotene estratti con SFE	73
4.7 Correlazione tra licopene e colore	81
4.8 Confronto tra SFE ed estrazione chimica per il quantitativo di β-carotene.....	88
4.9 Confronto tra SFE ed estrazione chimica per il quantitativo di licopene	90
4.10 Confronto tra i quantitativi di β-carotene e licopene ottenuti con SFE	92
4.11 Confronto fra i quantitativi di β-carotene e licopene ottenuti con estrazione chimica	94
5. DISCUSSIONE.....	96
6. CONCLUSIONI	98
BIBLIOGRAFIA	100

ABSTRACT

The tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) is one of the most diffuse vegetable in the world. In Italy, it embodies a great part of the overall farm production and, in the last century, industries specialized in fresh or processed products have largely spread all over the country.

This thesis pertains a work carried out at the horticulture laboratory of the Department of Environmental Agriculture and Vegetable Production, Faculty of Agriculture of the University of Padua. The experiment concerned two cultivar of industrial tomato, containing high concentrations of lycopene, cultivated at the “L. Toniolo” experimental farm, in Legnaro. A 768 m² surface was divided into plots, according to an experimental scheme of *split-split plot*, that implied the comparison between 3 factors: two techniques of mulching, two varieties (NPT, AUG) and four times of transplanting (T1, T2, T3, T4).

The profile of the main functional compounds was evaluated from the obtained samples; among these compounds there were phenolic acids (gallic acid, cinnamic acid, ferulic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid and chlorogenic acid), flavonoids (rutin and naringenin) and two carotenoids (lycopene and β -carotene). High pressure liquid chromatography (HPLC) was used for this evaluation; several preliminary tests were made to refine the best analytic methods for the quantification of the above-mentioned metabolites. Moreover an extraction technique, using supercritical CO₂, was refined to extract carotenoids and the extraction performance was compared with the classic chemical methodology.

The analytic methods for the free phenolic acids and flavonoids resulted reliable to apply them to the examined thesis about tomato. The extraction technique for carotenoids requires further minimal improvements, such as the protection of the sample from light (at dark) and the use of low temperatures (in ice), to limit the degradation of compounds. Regarding the method refined for the SFE, it resulted considerable for analytical purposes but mainly applicable at an industrial level; in fact, it could represent a valid substitute to the use of conventional techniques which employ toxic solvents and are hardly manageable. Finally, the tomato variety which gave best results for the considered functional compounds is AUG; the same is for the mulched variety. Therefore, the mulching technique allows not only a better farming performance

but also a better production of the considered compounds. Since these compounds are important in health (antioxidant proprieties) and economy (exploited as colorants), a precocious farm selection of industrial tomato varieties, containing high concentrations of these compounds, could be really convenient.

RIASSUNTO

Il pomodoro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) è uno degli ortaggi più diffusi a livello mondiale. In Italia rappresenta una buona fetta della produzione agricola totale del paese che nell'ultimo secolo ha visto il fiorire di diverse industrie specializzate nella produzione sia di prodotti freschi, sia di prodotti trasformati.

Il lavoro effettuato in questa tesi si è svolto presso il laboratorio di orticoltura del Dipartimento di Agronomia ambientale e Produzioni vegetali della facoltà di Agraria dell'Università degli studi di Padova. Ha interessato due cultivar di pomodoro da industria ad alto contenuto di licopene coltivate presso l'azienda agraria sperimentale "L. Toniolo" di Legnaro. Una superficie di 768 m² è stata suddivisa in parcelle seguendo uno schema sperimentale a *split-split plot*, che ha previsto il confronto tra tre fattori: due modalità di pacciamatura, due varietà (NPT, AUG) e quattro epoche di trapianto (T1, T2, T3, T4).

Dai campioni ottenuti è stato valutato il profilo dei principali composti funzionali, tra cui alcuni acidi fenolici (acidi gallico, cinnamico, ferulico, caffeico, *p*-cumarico e clorogenico) alcuni flavonoidi (rutina e naringenina) e i due principali carotenoidi (licopene e β -carotene). Per fare ciò è stata utilizzata la cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) che ha previsto una serie di prove preliminari per mettere a punto i metodi analitici migliori per la quantificazione dei metaboliti interessati. Inoltre è stato messo a punto un metodo di estrazione dei carotenoidi mediante l'utilizzo di CO₂ supercritica e rapportarne la resa estrattiva con l'estrazione chimica.

Le metodiche analitiche per gli acidi fenolici liberi e i flavonoidi sono risultate attendibili per l'applicazione alle tesi di pomodoro considerate. La metodica di estrazione dei carotenoidi richiede ulteriori semplici miglioramenti per limitare la degradazione dei composti ma è risultata ugualmente attendibile. Per quanto riguarda la metodica messa a punto per l'SFE, questa è risultata apprezzabile per scopi analitici ma applicabile prevalentemente a livello industriale dove può essere una reale alternativa all'utilizzo di tecniche convenzionali che prevedono l'utilizzo di solventi tossici e difficilmente gestibili. L'applicazione di tali metodiche ai campioni ha rivelato che la varietà di pomodoro che ha dato valori più elevati di composti funzionali presi in esame è AUG. Lo stesso vale per il testimone pacciamato. Quindi la tecnica della pacciamatura permette oltre che una maggiore resa di coltivazione anche una migliore produzione di

composti considerati. Essendo composti importanti dal punto di vista salutistico per le proprietà antiossidanti e dal punto di vista economico per lo sfruttamento dei carotenoidi come coloranti, potrebbe essere particolarmente vantaggioso selezionare già in campo varietà di pomodoro da industria ad elevato contenuto.

1. INTRODUZIONE

1.1 Il pomodoro (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Il pomodoro è una pianta erbacea appartenente alla classe *Magnoliopsida* (dicotiledoni), perennante, inizialmente classificata da Linneo come appartenente alla famiglia delle Solanacee e raggruppata nel genere *Solanum*. Successivamente (1768) Miller scrisse il genere *Solanum*, formando il genere indipendente *Lycopersicon* a sua volta comprendente due subgeneri : *Eulycopersicon* C.H.Muller, a frutti rossi e glabri ed *Eriopersicon* C.H Mull, caratterizzato da frutti verdi e tomentosi (Amadei *et al.*, 1990) . Il pomodoro è una pianta erbacea, annuale, alta fino a 2 metri, con portamento iniziale eretto, successivamente prostrato a causa del peso dei frutti. Ha un accrescimento simpodiale (ogni segmento della pianta termina con un'infiorescenza) e presenta gemme all'ascella di ciascuna foglia (Tesi, 1994). Le foglie sono grandi, spicciolate, irregolarmente composte da foglioline diseguali a lembo più o meno inciso. I fiori si formano in numero variabile da 4 a 12 su infiorescenze a racemo che sorgono all'ascella delle foglie. I fiori sono gialli, bisessuati, con ovario supero pluriloculare e pluriovulare, gli stami sono in numero di 5 o più, formanti con le antere un manicotto intorno al pistillo. Il frutto, unica parte commestibile, è una bacca di forma e dimensioni variabili (globosa, appiattita, allungata, ombelicata; liscia o costoluta), con numero di logge variabile di colore generalmente rosso al raggiungimento della maturazione (www.agraria.org). Nella polpa, contenuta nelle logge delle bacche, stanno numerosi semi discoidali schiacciati che quando sono secchi sono tomentosi e di colore giallo-grigiastro. La pianta del pomodoro presenta un apparato radicale fittonante che raggiunge una profondità di 2 m, anche se circa il 60% dello strato attivo è compreso nei primi 0,30 m di terreno e il 25% nei primi 0,50m. L'apparato fittonante comprende una fitta rete di radici laterali più o meno superficiali e il suo accrescimento è più intenso nella fase vegetativa rispetto alla fase di formazione dei frutti.

Nel pomodoro è presente un polimorfismo molto accentuato: esistono diverse varietà che si diversificano tra di loro per ciclo (precoce-tardivo), copertura fogliare , caratteristiche estrinseche del frutto(forma, dimensione, colore e pezzatura) e tolleranza alle malattie. Possiede un corredo cromosomico $2n=24$, che può presentare fenomeni di

poliploidia spontanea, caratterizzata da fenotipi con foglie e fiori più grandi ed intensamente colorati e una completa (o quasi) sterilità (Marzi *et al.*,2001).

Il pomodoro ben si adatta a condizioni di clima temperato–caldo, anche se il trasferimento in ambienti più rigidi, porta questo ortaggio da perennante ad annuale. I limiti termici per la coltura sono: 0-2°C come temperatura minima letale, 8-10 °C come minimo di vegetazione, 13-16 °C come valori termici ottimali notturni e 22-26°C come valori ottimali diurni. Il pomodoro si adatta a diversi tipi di suolo, con variazioni che dipendono dalla varietà scelta e dalle condizioni nutritive di base che devono essere garantite. Predilige terreni a reazione sub acida e risulta essere una specie suscettibile alla salinità: fino a $EC= 2,5 \text{ mS cm}^{-1}$ non presenta effetti negativi mentre von $EC= 5\text{mS cm}^{-1}$ riduce del 25% le rese e tollera un valore massimo pari a $12,5 \text{ mS cm}^{-1}$ (Marzi *et al.*,2001). Per quanto riguarda le esigenze nutritive, necessita di una maggiore quantità di potassio a cui seguono in ordine di importanza, azoto fosforo e calcio. Il potassio gioca un ruolo importante sulla qualità delle bacche influenzandone la quantità di zuccheri, il residuo secco e il colore. L'azoto esalta il vigore vegetativo, quindi è un componente molto importante per ottenere rese elevate, anche se un suo eccesso può favorire eccessivamente il rigoglio della vegetazione a scapito della fruttificazione.

1.2 Il pomodoro da industria

Alcune varietà di pomodoro possiedono caratteristiche di resistenza a traumi, parassiti, trattamenti e lavorazioni da essere preferiti per la trasformazione. Queste particolari razze sono definite come “ pomodoro da industria” e hanno origine negli Stati Uniti d’America, dove la loro coltivazione ha avuto enorme sviluppo. In Italia l’evoluzione di questo settore produttivo è stata inizialmente piuttosto lenta. All’inizio dell’ottocento il pomodoro si impose quale condimento essenziale della pasta, alimento base della cultura mediterranea e successivamente la sua coltivazione si estese attorno a Napoli e nelle campagne del mezzogiorno (Silvestri e Siviero, 1991). Oggi il pomodoro risulta essere la specie più diffusa sul territorio nazionale, sia per superficie investite (96771 ha-1) sia per l’interesse che riveste nelle regioni del nord e in quelle ad esclusivo reddito agricolo del centro e del sud Italia. Pionieri dell’industria conserviera furono i fratelli *Cirio*, i quali realizzarono a Napoli i primi impianti di trasformazione del pomodoro.

Con queste esigenze industriali, l'agricoltura si adatta a nuove metodiche colturali intensive che prevedono un maggiore sfruttamento delle superfici terricole per l'ottenimento di maggiori rese per ettaro e riescano a far ottenere particolari caratteristiche ai pomodori, una di queste è il pH. Un acidità sopra il 4,5 è considerata pericolosa per il rischio di sviluppo di microorganismi, valori tra 4,3 e 4,5 invece sono accettabili. Un' acidità uguale o inferiore a 4.3 rende possibile il solo trattamento termico senza nessuna aggiunta di conservanti antimicrobici (Gould, 1983). In caso di acidità troppo elevata (indice di pomodori poco maturi) è concessa l'aggiunta di acido citrico (da dichiarare in etichetta). Per la produzione di concentrati si richiedono cultivar con frutti ad elevata resa industriale (pochi semi e poche bucce), colore rosso intenso uniforme, contenuto elevato in residuo secco (maggiore del 6%), rapporto glucidico espresso in percentuale di zuccheri su 100% di residuo maggiore di 45 ed infine un rapporto di acidità inferiore a 4,5. Per quanto riguarda la forma e la dimensione, queste non risultano determinanti, anche se si preferiscono le grosse pezzature per favorire la raccolta. Su scala Europea l'Italia è la prima produttrice di tale risorsa e terza al mondo dopo USA e Cina. A livello Nazionale, la produzione del pomodoro da industria risulta concentrata per lo più al nord e al sud (Figura 1) e nello specifico per il 34% in Puglia, il 28% in Emilia Romagna e a seguire Lombardia e Campania rispettivamente con il 22% e 18% (Istat 2009). In questa classifica la regione Veneto si posiziona al decimo posto con una produzione del 3-5 % sul totale nazionale. L'Italia risulta essere inoltre una grande esportatrice di conserve e pelati che nel 2007 sono stati secondi nella classifica dei prodotti più esportati, secondi solamente ai vini rossi DOC (Canali ,2009)

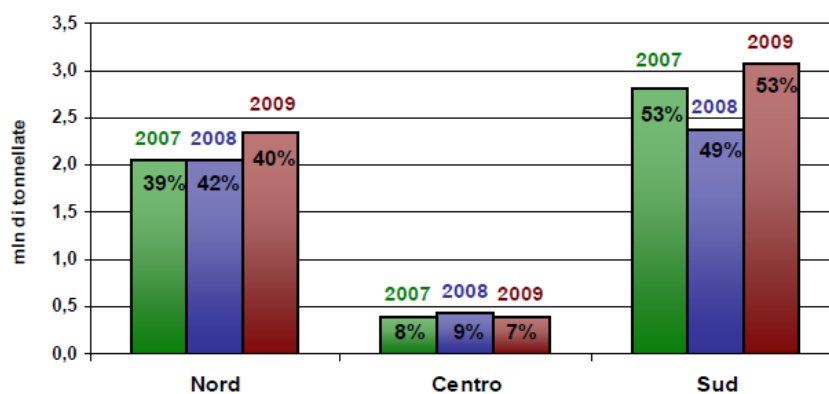


Figura 1: Produzione nazionale pomodoro da industria (mln di tonnellate).

1.3 Aspetti nutrizionali

L'evoluzione e il largo consumo di questi lavorati sono dovuti alle proprietà salutistiche che questo prodotto apporta alla dieta umana, dato ormai supportato da numerosi studi effettuati. Nel mondo l'80% del consumo deriva da prodotti trasformati come succo di pomodoro, puree, ketchup e salse di vario genere (Fogliano, 2009). Le caratteristiche nutrizionali che il pomodoro può apportare, variano notevolmente in rapporto a vari fattori ambientali quali luce, temperatura, concimazione, epoca di trapianto e pacciamatura del terreno. Il pomodoro comprende una parte edibile costituita dal 98% da polpa e succo e un 2% di parte non edibile costituito da buccia, fiocina e semi (Tesi *et al.*, 1994). In 100 g di prodotto la composizione percentuale risulta essere in media del 93 % di acqua, 0,2 % di grassi, 1% proteine e 1,8% fibre, per un valore energetico totale di circa 73 KJ (17 Kcal) (www.valori.alimenti.it). I composti funzionali principali del pomodoro risultano essere gli antiossidanti. Il pomodoro costituisce infatti uno degli alimenti principe della dieta mediterranea essendo consumato abitualmente sia crudo che processato e contribuisce all'apporto giornaliero di una significativa porzione di questi composti benefici (Lenucci *et al.*, 2006). I pomodori inoltre rappresentano la principale fonte di composti fenolici nella dieta umana seguiti da granturco e fagioli (Vinson *et al.*, 1998). I principali rappresentati di questa classe chimica sono i flavonoidi che nelle varie cultivar in media sono presenti dal 12 al 49%. La presenza di acidi organici invece conferisce al prodotto il suo sapore acidulo, promuovendo la secrezione dell'apparato digerente, predisponendo a una corretta digestione e risulta essere un eccellente attivatore della mobilità gastrica (www.medicinalive.com). Altro apporto nutrizionale di questo ortaggio è rappresentato dalle vitamine tra le quali sono presenti la A, le vitamine del gruppo B e in maniera predominante la vitamina C. Tra gli elementi minerali quello più rappresentativo è il potassio (200-300 mg /100g⁻¹ di succo) seguito dal cloro (30-60 mg/100 g⁻¹ di succo) e sono presenti anche ferro, zinco, calcio e selenio. Un aspetto negativo di alcune *Solanaceae* tra cui il pomodoro, è la presenza di una tossina chiamata solanina. La solanina è un glucoalcaloide steroideo, tossico per l'uomo in dosi superiori a 3 mg/kg di peso corporeo (Medicine & Biology, 2003). Questa è maggiormente concentrata quando il frutto è verde e tende a scomparire con la maturazione diventando innocua quando il frutto è pronto per il consumo (Wood and Young, 1974).

1.4 Principali composti funzionali del pomodoro

I composti funzionali rappresentano molecole utili al fine dell'accrescimento della pianta e forniscono una fonte nutrizionale per l'alimentazione umana. Tra i composti funzionali giocano un ruolo essenziale gli antiossidanti. L'importanza dei vegetali e degli ortaggi come fonte di queste sostanze è ben nota.

Gli antiossidanti sono una famiglia di specie chimiche naturali e sintetiche in grado di neutralizzare, cedendo elettroni, l'effetto dannoso esercitato sulle cellule dai radicali liberi, molecole chimicamente instabili capaci di modificare la fluidità delle membrane cellulari alterandone l'equilibrio degli scambi e favorire l'insorgenza di malattie cardiovascolari ischemiche, diabete di tipo 2 e osteoporosi. Gli antiossidanti si possono raggruppare in tre categorie (Medicine & Biology, 2003). Alla prima appartengono i veri antiossidanti (detti anche antiossigeno), composti che inibiscono l'ossidazione reagendo con i radicali liberi. Ne fanno parte sostanze efficaci contro l'autossidazione ma non verso le reazioni reversibili di ossidazione (tocoferoli, butilidrossanisolo). Alla seconda categoria appartengono gli agenti riducenti, sostanze con un potenziale redox minore di quello del composto da proteggere e che quindi vengono ossidate più facilmente al suo posto. Queste sostanze comprendono ad esempio l'acido ascorbico e i sali sodici e potassici dell'acido solforoso (usati nei vini) che sono efficaci contro gli agenti ossidanti e contro i radicali liberi stessi. Alla terza categoria appartengono gli antiossidanti sinergici che di per sé hanno poco potere antiossidante, ma potenziano l'effetto delle molecole appartenente al primo gruppo. Essi reagiscono infatti con gli ioni dei metalli pesanti che catalizzano la reazione di ossidazione. Un esempio di questi composti sono l'acido tartarico e la lecitina, che potenziano l'azione antiossidante del acido citrico.

Gli effetti benefici delle molecole fitochimiche presenti nella frutta e nella verdura, hanno favorito lo sviluppo della ricerca sui prodotti naturali. Diversi articoli in letteratura riguardano la ricerca orientata all'identificazione e all'isolamento di principi attivi da una vasta gamma di materie prime (Robards K.,1999;Collins A.,2003) tra cui la frutta, la verdura di campo e i loro prodotti trasformati, i cereali integrali (Shahidi, 1995), le alghe e i funghi (Mau J.,2002) e il vino e il tè che contengono potenti antiossidanti e sono stati studiati in tutto il mondo per il loro alto contenuto di composti fenolici (Ghiselli A.,2000;Jeong W.,2004). Altra fonte è rappresentata dall'olio di oliva

e dai suoi scarti, in relazione al loro contenuto di sostanze benefiche come acidi linoleici coniugati e fosfolipidi (Obied H.,2005). Anche le piante officinali ricche di composti fisiologicamente attivi, sono una fonte importante di queste molecole (Mau J.,2003) e gli oli essenziali derivati da tali piante contengono antiossidanti come cumarine, flavoni e sostanze coloranti, potenziate dall'effetto sinergico dei terpeni. Alcune di queste sostanze di sintesi o estratte dalle piante sono introdotte in preparazioni alimentari, farmaceutiche e cosmetiche. Hanno lo scopo di evitarne le alterazioni dovute a processi degradativi (ad esempio nel cibo il deterioramento ossidativo di grassi e oli causa odori rancidi, sapori alterati e la formazione di componenti tossiche secondarie) e di modificarne o accentuarne il colore utilizzando ad esempio carotenoidi estratti dal pomodoro per conferire colorazioni aranciate.

In riferimento al pomodoro sono sotto riportati i principali composti funzionali.

1.4.1 Acidi fenolici

Gli acidi fenolici appartengono all'ampia categoria dei composti fenolici derivanti dal metabolismo secondario delle piante.

La variabilità molecolare e l'ampia distribuzione nel regno vegetale fa di queste molecole un argomento di studio estremamente interessante sia per quanto riguarda il loro ruolo nei processi fisiologici e biochimici, sia per la loro partecipazione ai meccanismi di difesa chimica verso i predatori e i fattori ambientali (soprattutto luce UV). Il nome deriva dal fenolo che è la molecola più semplice e i composti con numerosi sostituenti ossidrilici sono definiti polifenoli. In base alla loro struttura i composti fenolici vengono distinti in tre classi denominate fenoli semplici, flavonoidi e tannini. I fenoli semplici comprendono gli acidi fenolici che possiedono uno scheletro carbonioso base del tipo C₆-C₃. Tra gli acidi fenolici maggiormente rappresentati nelle matrici vegetali tra cui il pomodoro vi sono gli acidi cinnamico, *p*-cumarico, caffeico, ferulico, clorogenico e gallico. Questi acidi hanno diverse funzioni: l'acido clorogenico ha un'attività importante in quanto contribuisce alla costruzione delle barriere chimiche e fisiche delle piante agendo direttamente sulla sintesi della lignina. L'acido gallico viene complessato con i tannini formando i gallotannini che conferiscono il gusto amaro

e astringente di alcune bevande quali tè, caffè e vino. L'acido cinnamico ha la caratteristica di donare aroma ad alcuni fiori e al miele, liberando sostanze odorose volatili (Budavari, 2000). L'acido caffeico nell'uomo ha un'attività antiinfiammatoria in quanto inibisce le ciclossigenasi 1 e 2 che assieme ad altri enzimi mediano questo processo. Infine l'acido ferulico è un componente della suberina che ha un ruolo di protezione fisica nei vegetali, inoltre inibisce la germinazione la crescita e lo sviluppo di alcune piante erbacee, funzione che hanno anche l'acido cinnamico, cumarico, gallico e caffeico (Lodhi, 1976; Green e Corcoran, 1975).

Le vie di formazione di questi acidi sono molto complesse e solo in questi ultimi anni sono state studiate accuratamente le varie vie biochimiche (Salisbury, 1994; Dewick, 2000; Zhano, 2008). Si formano a partire da precursori quali la L-fenilalanina e la L-tirosina tramite le vie dell' "acido scichimico" (come gli acidi clorogenico e gallico) e la via "degli acidi cinnamici" (come ad esempio gli acidi cinnamico, caffeico, cumarico e ferulico) (Figura 2).

Via degli acidi cinnamici:

Come già anticipato, i precursori di una vasta gamma di sostanze naturali sono L-tirosina e L-fenilalanina. Una reazione importante nella formazione di questi derivati è la conversione della fenilalanina in acido cinnamico. Questa reazione è una deaminazione nella quale l'ammoniaca viene staccata dalla fenilalanina utilizzando come enzima catalizzatore la fenilalanina ammoniacica liasi.

Con la tirosina avviene una reazione simile nel quale l'enzima tirosina ammoniacica liasi converte la tirosina ad ammoniacica ed acido *p*-cumarico.

Questo acido può anche essere formato più rapidamente in varie specie per addizione diretta di un atomo di ossigeno e di un atomo di idrogeno proveniente dal NADPH alla posizione para del acido cinnamico. Una successiva addizione attraverso una reazione simile, di un gruppo ossidrilico in posizione adiacente al gruppo OH del acido *p*-cumarico porta alla formazione dell'acido caffeico. L'aggiunta di un gruppo metilico proveniente dalla S-adenosil metionina ad un gruppo dell'acido caffeico porta alla sintesi del acido ferulico. L'acido caffeico inoltre forma un estere con il gruppo alcolico dell'acido quinico, con la produzione di acido clorogenico. L'importanza della presenza di questi acidi non è tanto da attribuire alla loro concentrazione ma al fatto che da loro derivano importanti composti complessi come le fitoalessine, le cumarine, la lignina e

vari flavonoidi come le antocianine. Gli acidi fenolici possono dare inoltre reazioni aldeidiche che portano alla formazione di aldeidi fenoliche o fenolate comuni in molti oli essenziali, quali salicialdeide, 4-idrossibenzaldeide, *p*-anisaldeide e la più diffusa vanillina.

Via dell'acido scichimico:

Il catabolismo di due intermedi della via dell'acido scichimico, l'acido deidrochinico e lo stesso acido scichimico, porta alla formazione e all'accumulo di due composti fenolici di difesa; l'acido clorogenico e l'acido protocatechico. Questa reazione è catalizzata da due enzimi ; la 3-deidroscichimato idratasi, la quale catalizza la trasformazione dell'acido deidroscichimico in acido protocatechico e una deidrogenasi chinica che trasforma l'acido deidrochinico in acido chinico, precursore dell'acido clorogenico. Gli acidi protocatechico (acido 3,4—diidrossibenzoico) e gallico (acido 3,4,5- triidrossibenzoico) si formano dall'acido 3-deidroscichimico mediante reazioni laterali di deidratazione e enolizzazione (acido protocatechico) e reazioni di deidrogenazione ed enolizzazione (per il gallico).

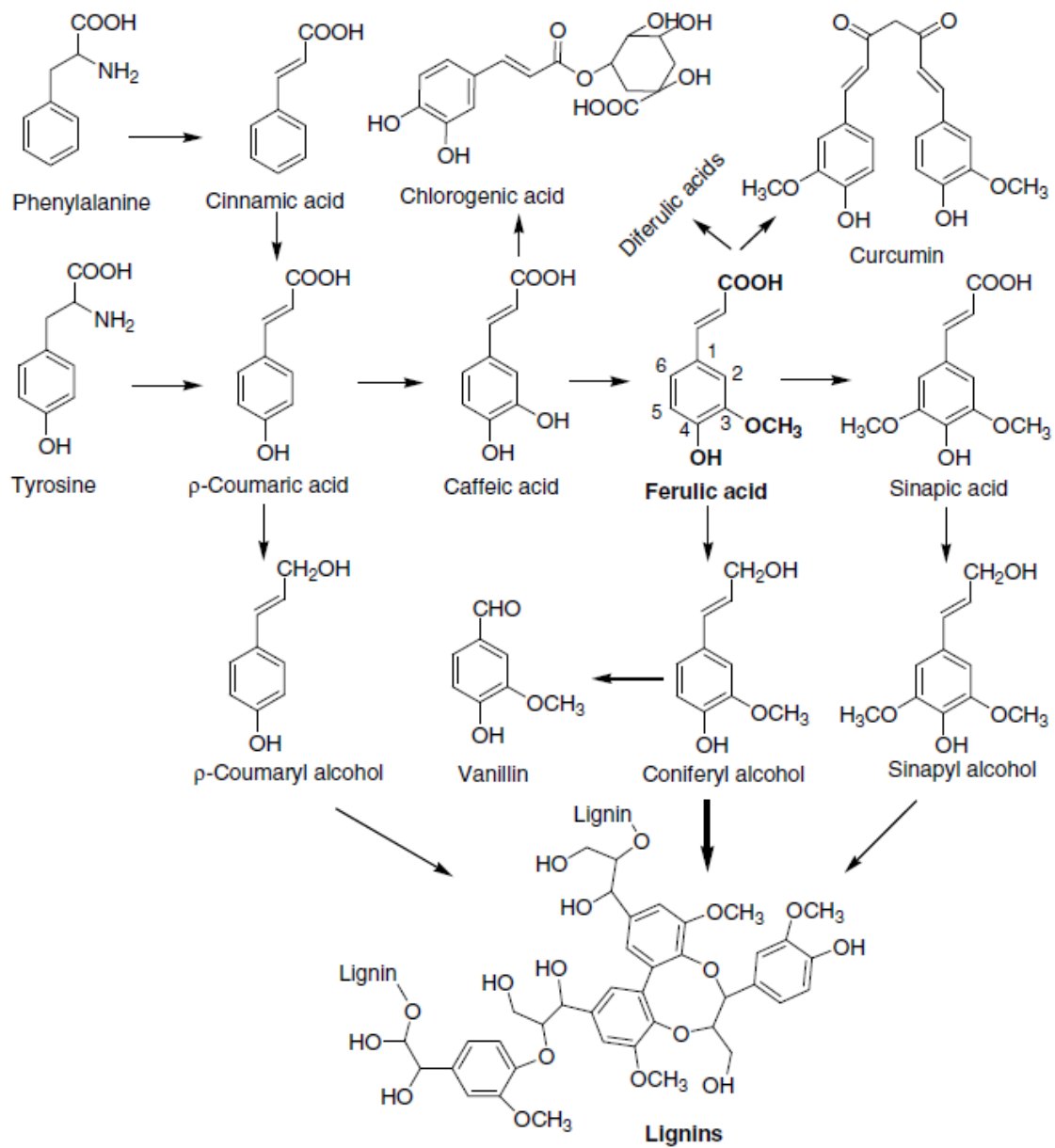


Figura 2: Via di formazione degli acidi fenolici (Zhao,2008).

1.4.2 Flavonoidi

I flavonoidi sono prodotti naturali ampiamente distribuiti nelle piante e formati da due anelli aromatici uniti insieme da un ponte a tre atomi di carbonio (Figura 3). Il primo anello aromatico si forma a partire dall'acetato mentre l'ultimo anello aromatico (a destra della molecola) prende origine dall'acido scichimico. I tre atomi di carbonio che uniscono i due anelli aromatici esterni originano dal fosfoenol piruvato. Successive idrossilazioni e riduzioni portano alla formazione di differenti flavonoidi (Di Francesco Capasso, R. DePasquale, 2000). Ne esistono sei classi principali: i calconi, i flavanoni, i flavoni, i flavonoli, le antocianidine e gli isoflavoni. Attualmente sono noti circa 4000 flavonoidi. Dal punto di vista chimico sono dei derivati del flavone (2-fenil- γ -benzopirone); il flavone per idrogenazione dà il flavanone (2,3-diidrossiflavone) mentre la sostituzione dell'atomo di idrogeno con un ossidrile in posizione 3 dell'anello pironico porta al flavonolo (3-idrossiflavone). Molti flavonoidi costituiscono l'aglicone (genina) di glicosidi naturali che si formano dal legame di uno o più zuccheri nella posizione 7 del flavone (o 3 del flavonolo). Alcune di queste sostanze come le antocianidine conferiscono colorazione gialla (dal latino *flavus*=giallo) arancione, rossa e azzurra e sono diffuse nei fiori, frutti, cortecce, semi e radici.

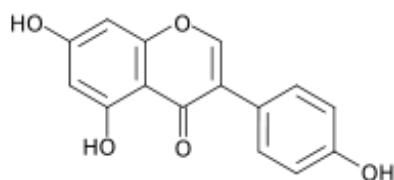


Figura 3: Struttura base di un flavonoide.

Oltre alle loro importanti funzioni legate alle strategie riproduttive (conferiscono colore a frutti e fiori) questi composti assorbono fortemente la radiazione ultravioletta e il loro accumulo nell'epidermide delle foglie ne suggerisce una funzione specifica di protezione dal danno che queste causano al DNA delle cellule. Una delle risposte più generali delle piante all'esposizione di radiazioni UV infatti è l'attivazione di geni che esprimono enzimi della via biosintetica dei flavonoidi (Maffei M. 1998). In riferimento

al pomodoro alcuni flavonoidi sono la naringenina e la rutina (Figura 4). La naringenina è classificata come flavanone e le principali fonti naturali sono le bucce degli agrumi e del pomodoro nelle quali gioca un ruolo importante nella permeabilità dell'acqua attraverso la matrice polimerica della cuticola (Adato A. *et al.*,2009). Assunta nella dieta gioca un ruolo importante per la protezione della salute umana in quanto mostra un'attività antiestrogenica che diminuisce l'incidenza del cancro al seno nelle donne, inoltre ha un'attività regolatrice sui livelli di colesterolo in quanto ne inibisce la sintesi degli esteri. Ha un'attività modulatrice sull'enzima monoossigenasi P-450 dipendente, il principale enzima coinvolto nel metabolismo di molti farmaci, sostanze cancerogene e inquinanti ambientali (Rosanna B., *et al.*,2002). Per quanto riguarda la rutina, questa viene inclusa in coadiuvanti dietetici come vitamina P ed è indicata nel trattamento della fragilità capillare (Maffei, *Biochimica vegetale*) rafforzandone la parete. Anche questa ha funzione antiossidante e ha un ruolo importante nell'inibire alcuni tipi di tumore e nel diminuire il rischio di malattia cardiaca.

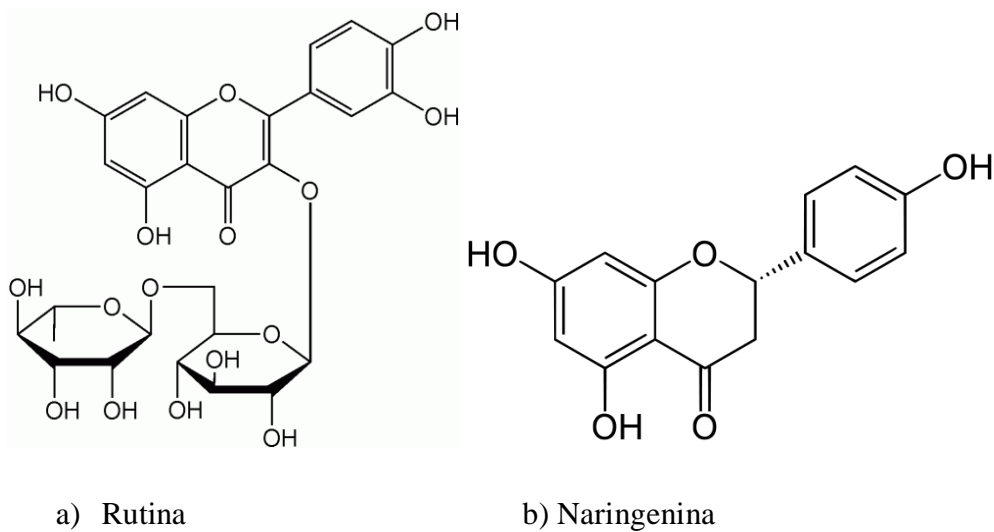


Figura 4: Struttura molecolare dei flavonoidi rutina (a) e naringenina (b).

1.4.3 Carotenoidi

I carotenoidi sono pigmenti responsabili per la maggior parte del colore giallo, arancione, rosso degli ortaggi e della frutta. Sono i pigmenti maggiormente diffusi in natura; si conoscono più di 560 strutture carotenoidiche, senza contare gli isomeri geometrici *cis* e *trans*. Si trovano in tutte le piante fotosintetiche come componenti dei cromoplasti e anche in alcuni microorganismi. Svolgono un'attiva funzione di fotosintesi e fotoprotezione nei tessuti delle piante, infatti in tutti i tessuti che contengono clorofilla funzionano da pigmenti accessori coadiuvanti della clorofilla nella cattura dell'energia solare. I carotenoidi si distinguono in caroteni e xantofille e la loro biosintesi (Figura 6) coinvolge tre passaggi:

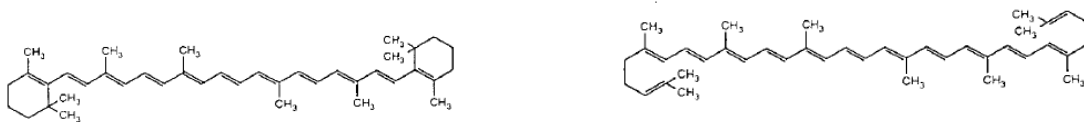
- 1) Via dell'acido mevalonico a formare l'isopentil pirofosfato (IPP)
- 2) Sintesi del geranylgeranyl pirofosfato (GGPP)
- 3) Sintesi dei vari caroteni

Il primo passaggio della biosintesi dei carotenoidi implica la condensazione di due molecole di GGPP ad opera della fitogene sintasi (PSY) che si compie in due tappe portando prima alla formazione di prefitoene pirofosfato(PPPP) e quindi di fitoene. La reazione di condensazione porta alla perdita dell'idrogeno e del gruppo pirofosforico in C-1' della stessa molecola. Quindi si ha il distacco del gruppo pirofosforico in C-1 del PPPP seguito da un riaggiustamento C-1' con la conseguente formazione del fitogene, che può risultare 15-*cis* oppure tutto in *trans*. Successivamente una serie di quattro desaturazioni (ad opera di fitoene desaturasi) portano alla formazione dei doppi legami coniugati convertendo il fitoene (incolore) in fitofluene (incolore) in ζ -carotene (giallo), in neurosporene (arancio) e licopene (rosso). L'azione della licopene ciclasi porta alla formazione del carotenoide biciclico β -carotene. Negli ultimi stadi della via biosintetica si formano le xantofille.

Il ruolo più importante di questi pigmenti, principalmente il β -carotene (Figura 5), nella dieta umana e di altri animali, risiede nella sua capacità di essere precursore della vitamina A (P. Cabras ; A. Martelli .,2004).Un'altro importante pigmento carotenoide e precursore del β -carotene è il licopene (Figura 5) responsabile della colorazione rossa di alcuni vegetali, principalmente il pomodoro ma anche anguria, albicocche e guava. Il licopene (C₄₀-H₅₆) è un idrocarburo a catena aperta con 11 doppi legami coniugati e 2

non coniugati ed è il carotene a più alto grado di insaturazione. Ha un forte potere antiossidante, superiore a quello del β -carotene e della luteina, che lo rende un elemento della dieta particolarmente indicato per prevenire alcune malattie degenerative come certi tumori epiteliali. In aggiunta al suo potere antiossidante il licopene ha un ruolo nella induzione della comunicazione cellulare (Zhang *et al.*,1991) e nella modulazione delle risposte ormonali e del sistema immunitario (Fuhramn *et al.*,1997). Nei vegetali freschi tale carotenoide si trova tutto in forma *trans* e in media nel pomodoro ha una concentrazione di 30-200 mg/kg di peso fresco e rappresenta circa l'85% del contenuto totale di carotenoidi. Ciononostante la sua concentrazione può variare notevolmente in base alla varietà e allo stadio fisiologico della pianta (Siviero, 1998). E' stato infatti dimostrato che frutti di pomodoro prossimi all'invasiatura, possono avere concentrazioni di licopene anche doppie rispetto alla medesima varietà in fase fenologica diversa (Raffo *et al.*,2004). Il genotipo ha una grande influenza sul contenuto di licopene tanto che forti delle recenti scoperte sulle sue proprietà salutistiche, molte ditte sementiere sono riuscite ad ottenere ibridi ad alta contenuto di questo pigmento detti "higt pigment" (fino a 200 mg/kg di licopene nel prodotto fresco).

I carotenoidi essendo particolarmente instabili a causa della loro struttura sono sensibili a luce, calore, metalli e condizioni acide o alcaline che ne favoriscono l'ossidazione e l'isomerizzazione. Durante i trattamenti termici o il trattamento dei campioni per le analisi di laboratorio, si verificano spesso queste alterazioni che possono essere rallentate tramite particolari accorgimenti come l'aggiunta di antiossidanti (Ummihan T. *et al.*,2006). Tuttavia diversi studi hanno dimostrato che la forma *cis* viene assorbita più facilmente dall'organismo e gioca un ruolo più importante rispetto al *trans*-licopene (V. Bhom *et al.*,1999).



β -carotene

Licopene

Figura 5: Formule chimiche di β -carotene e Licopene (Cadoni E., *at al.*,2000).

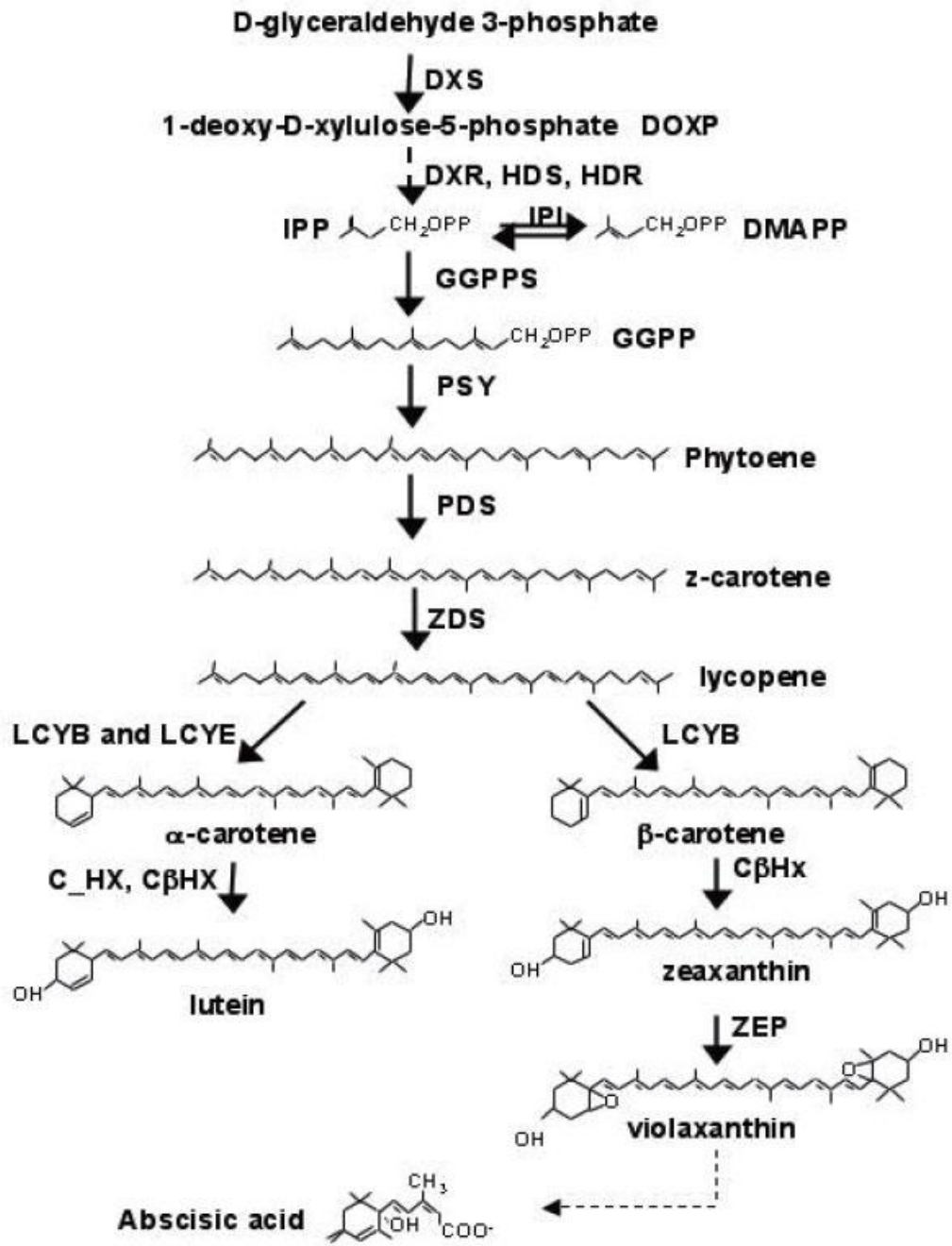


Figura 6: Rappresentazione della via biosintetica dei carotenoidi.

Licopene, β -carotene e altri carotenoidi come le xantofille sono utilizzati come coloranti nell'industria alimentare, aggiunti direttamente ad alcuni cibi come pop corn, burro, snack salati, oppure in maniera indiretta nel pesce e nella carne di pollo tramite i mangimi che gli vengono somministrati (Vega *et al.*,1996).

Nel 1995 l'industria del pomodoro ha processato oltre 25 milioni di tonnellate di questa materia prima. I solidi totali si aggirano intorno al 5-7% e l'1% è contenuto nella buccia e nei semi. Questi scarti sono una buona fonte di sostanze utili tra cui alcuni pigmenti che possono essere estratti. Una delle metodiche che a livello industriale viene utilizzata per estrarre elevate quantità di coloranti di origine vegetale è l'estrazione con fluidi supercritici (SFE). Ad esempio notevoli quantità di licopene sono contenute nella frazione di scarto del pomodoro come la buccia, che possono essere estratte mediante l'ausilio di CO₂ allo stato supercritico.

1.5 L'estrazione con fluidi supercritici (SFE)

Ogni materiale puro può esistere normalmente in tre stati di aggregazione diversi, solido, liquido e aeriforme a seconda delle condizioni di temperatura e pressione.

Rappresentando graficamente la relazione tra pressione e temperatura, applicate agli equilibri tra le fasi in esame, si ottiene un diagramma di stato.

Nel diagramma di stato specifico dell'anidride carbonica (Figura 7) si possono distinguere tre curve che separano tre aree che si intersecano in un punto in comune.

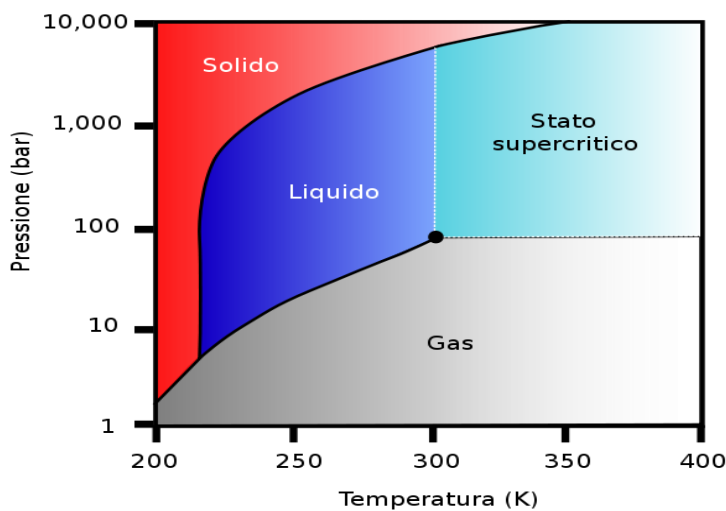


Figura 7: Diagramma di stato dell'anidride carbonica (www.wikimedia.org).

I punti appartenenti alla curva che separa la fase solida (nel grafico area rossa) da quella aeriforme (nel grafico l'area grigia) formano la curva della pressione di vapore del solido. Essi rappresentano le condizioni di temperatura e pressioni per le quali i due stati solido e aeriforme sono in equilibrio; quelli sulla linea di separazione tra la fase solida e quella liquida (nel grafico l'area blu) corrispondono ai valori in cui i due stati, solido e liquido, sono in equilibrio. Questo vale anche per la curva di separazione tra lo stato liquido e quello aeriforme che danno la curva di pressione di vapore del liquido. Il punto di intersecazione tra queste tre curve è chiamato **punto triplo** e presenta una particolare condizione di pressione e temperatura per le quali tutti e tre gli stati di aggregazione sono in equilibrio. Ogni sostanza possiede un proprio punto triplo che è determinato dalle forze intermolecolari nel solido nel liquido e nel vapore. Si osserva

che la curva di pressione del vapore e del liquido terminano in un punto definito **punto critico**. La temperatura in questo punto è chiamata temperatura critica (T_c) ed è la massima temperatura di liquefazione del vapore dovuta al graduale aumento di pressione. La pressione critica (P_c) è la pressione necessaria affinché avvenga la liquefazione del vapore. Al di sopra della temperatura critica non può esistere la fase liquida della sostanza in questione indipendentemente dal valore della pressione. A temperatura e pressione critica, liquido e vapore formano una fase omogenea che viene definita come **fluido allo stato supercritico** (Figura 8).

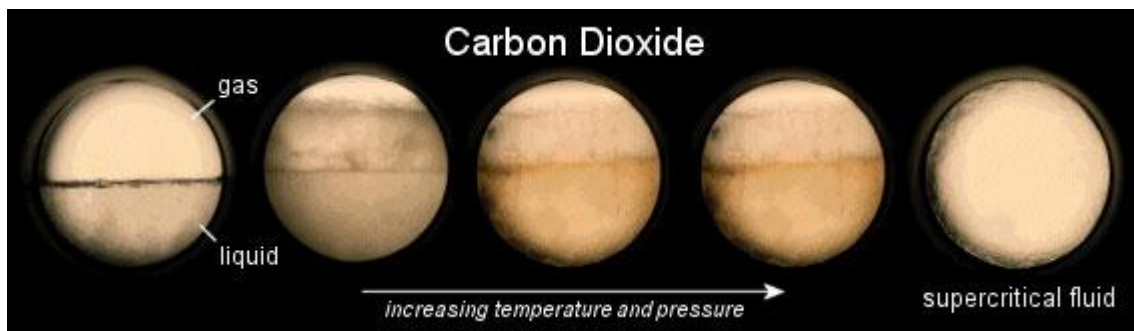


Figura 8: Fotogrammi che illustrano la sequenza della transizione a CO₂ superfluida (foto NASA).

Per fluido supercritico si intende un fluido a basso peso molecolare avente una temperatura critica prossima a quella ambiente (T_c 10-40 °C) ed una pressione critica non troppo elevata (P_c 40-60 bar). I fluidi supercritici possono essere utilizzati nella tecnica di estrazione SFE che vede l'utilizzo di una vasta gamma di solventi inclusi diossido di carbonio, ossido nitroso, ammoniaca, cloroformio e acqua (M. Zougagh at al.,2004). Anche gli idrocarburi leggeri hanno queste proprietà fisiche ma presentano il problema dell'infiammabilità e della tossicità. Certi clorofluorocarburi si prestano bene allo scopo ma sono relativamente costosi se raggiungono un elevato grado di purezza e sono oggi banditi per quanto riguarda l'accettabilità ambientale. L'anidride carbonica, pur avendo una pressione critica leggermente elevata ($P_c = 72,1$ bar), offre altre vantaggiose proprietà che ne fanno il fluido più impiegato nell'SFE:

- non infiammabilità
- accettabilità ambientale
- non tossicità
- basso costo anche ad elevate purezze

La possibilità di modulare la densità dei fluidi supercritici grazie a modeste variazioni di temperatura e pressione, specialmente nell'intorno del punto critico (PC), rappresentano il fattore caratterizzante di questi fluidi. In questo modo la pressione si introduce come variabile aggiuntiva nel controllo di un processo di separazione/estrazione (www.separeco.it).

L'impiego dei fluidi supercritici come solventi nelle tecniche di separazione ed estrazione rappresenta una risorsa importante a livello sia scientifico che industriale. Un esempio di estrattore in CO₂ supercritica industriale è rappresentato in figura 10.

Il limite rappresentato dagli alti costi degli impianti ne ha sempre condizionato l'utilizzo in campo commerciale e solo ultimamente l'aumento del costo delle materie prime, della manodopera e delle risorse energetiche ha reso possibile la loro applicazione, unitamente ai vantaggi di poter lavorare con ridotti volumi e di facilitare la separazione del solvente dal prodotto di estrazione. Inoltre le basse temperature utilizzate durante il processo permettono di lavorare con molecole termolabili che sarebbero compromesse con l'ausilio di tecniche classiche come la distillazione. Le aree di interesse sono varie e comprendono le produzioni alimentari, farmaceutiche, petrolchimiche e cosmetiche (Figura 9). L'incremento dell'utilizzo della SFE si rende evidente dal crescente numero di pubblicazioni scientifiche avvenute negli ultimi anni (Figura 10), soprattutto nel campo alimentare, anticipando il largo uso che questa tecnica avrà in futuro.

Applicazioni industriali della SFE	Solvente
Decaffeinizzazione del caffè	CO ₂
Decaffeinizzazione del tè	CO ₂
Estrazione aromi	CO ₂
Oli essenziali	CO ₂
Estrazione oli vegetali	CO ₂
Estrazione del colesterolo	CO ₂
Rimozione della nicotina	CO ₂
Estrazione piretrine	CO ₂
Rimozione di grassi dagli alimenti	CO ₂
Purificazione terreni	CO ₂
Trattamento di fanghi	etano

Figura 9: Alcune applicazioni industriali della SFE.

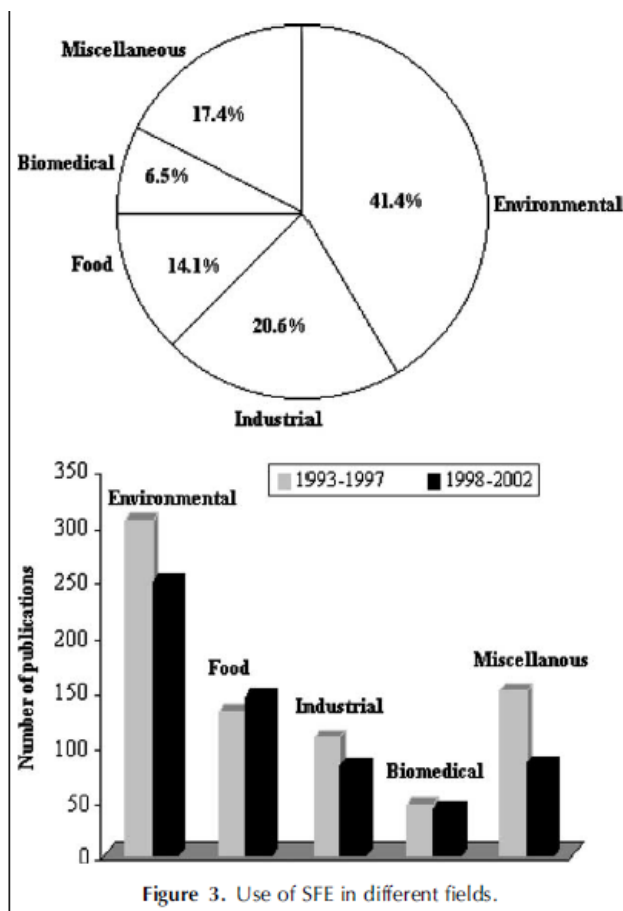


Figura 10: Incremento del numero di pubblicazioni riguardanti le tecniche SFE nei vari campi.

Il mercato della nutraceutica è in continua espansione, solo nel 2000 in Europa ha raggiunto gli 1,8 miliardi di euro (Capilla V. *et al.*, 2004) e vede la SFE come una tecnica adeguata per l'ottenimento di aromi, sapori e coloranti naturali da aggiungere agli alimenti classici, senza il rischio di contaminare il prodotto con solventi che possono risultare pericolosi. La tendenza odierna di consumare alimenti "light" impone alle aziende produttrici la necessità di offrire nuovi prodotti privi di sostanze considerate non salutari e arricchiti di principi attivi e componenti salutistici come ad esempio gli antiossidanti e altre molecole che possono essere estratte con questa metodica.

Nonostante i grandi vantaggi di questa tecnica comunque esistono dei vincoli tecnici nell'utilizzo della CO₂. Il limite principale risiede nelle sue caratteristiche chimico fisiche. La CO₂ in fase supercritica si comporta come un solvente lipofilo, quindi la sua performance di estrazione è limitata dalla sua polarità. Per ovviare a questo problema si

utilizzano cosolventi per migliorare la solubilità dei composti da estrarre o per incrementare la selettività operando a pressioni inferiori. La scelta del cosolvente dipende dall'ambito in cui si opera e sicuramente è condizionata dalla tossicità e dall'impatto ambientale che questo solvente determina con il suo utilizzo (Beatriz Díaz R., *et al.*, 2006). Infatti in ambito alimentare i cosolventi più utilizzati per la loro atossicità sono l'etanolo e alcuni oli vegetali come quelli di arachide, nocciola e girasole (Vasapollo G., *et al.*, 2004).

La SFE può essere applicata a sistemi su scala diversa: da quella analitica o da laboratorio, in cui si processano da poche centinaia di milligrammi fino a pochi grammi di campione o preparativa (qualche centinaio di grammi di campione), alla scala pilota con quantità di matrice nel ordine dei chilogrammi fino a scala industriale che tratta tonnellate di materiale grezzo. Nella figura 11 è riportato un esempio di apparato SFE su scala industriale. Questo prevede un estrattore con tre separatori in serie. La CO₂, che attraverso un sistema di refrigerazione raggiunge lo stato liquido, viene pressurizzata fino al livello desiderato da una pompa che spinge il flusso in un sistema di riscaldamento e inviata all'estrattore come fluido supercritico. Il fluido in uscita dall'estrattore viene indirizzato al primo separatore dopo essere stato raffreddato per ridurre la densità della CO₂. La variazione della densità del fluido determina la separazione delle frazioni nei tre compartimenti. Successivamente la CO₂ così riportata allo stato gassoso viene recuperata passando attraverso un sistema di filtrazione e un condensatore.

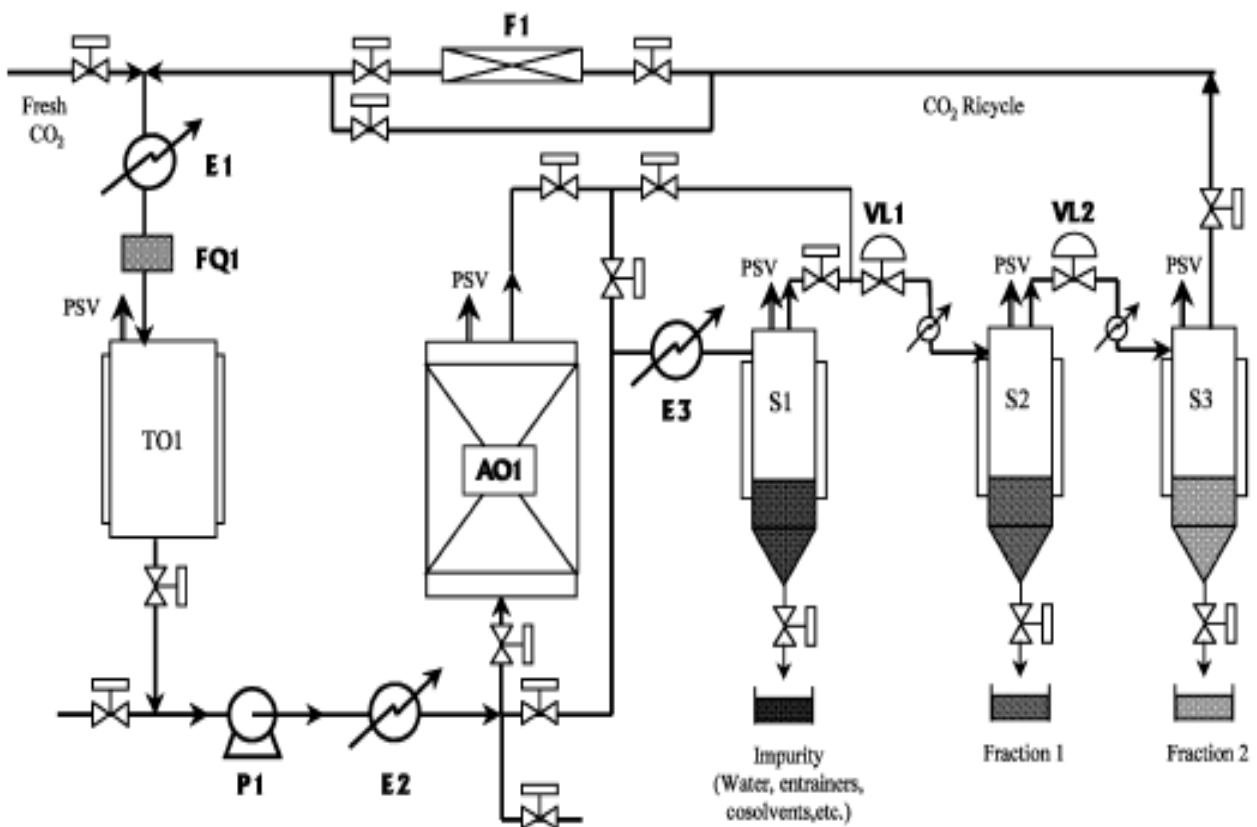


Figura 11: Schema dell'estrattore in CO₂ supercritica: AO1 estrattore; S1-3 separatori; TO1 serbatoio di alimentazione; F1 filtro; P1 pompa; E1 condensatore; E2 batteria di riscaldamento; E3 serpentina di raffreddamento; VL1-2 valvole dosaggio; FQ1 misuratore di portata; PVS valvole di sicurezza (Vasapollo G, *et al.*, 2004).

2. SCOPO DELLA TESI

Il pomodoro risulta essere la specie orticola più diffusa sul territorio nazionale e la produzione ha subito un notevole incremento negli ultimi anni. L'evoluzione e il largo consumo di tale ortaggio sia crudo che trasformato sono dovuti alle proprietà salutistiche che questo prodotto apporta alla dieta umana. Il pomodoro infatti costituisce uno degli alimenti principe della dieta mediterranea in quanto contribuisce all'apporto giornaliero di una significativa quota di composti funzionali che risultano essere principalmente gli antiossidanti. Tali molecole sono utili al fine dell'accrescimento della pianta e rappresentano una fonte nutrizionale per il consumatore. Inoltre gli scarti di lavorazione del pomodoro come bucce e semi contengono alcuni carotenoidi che vengono utilizzati come coloranti naturali e atossici nell'industria alimentare. Una delle metodiche che a livello industriale viene utilizzata per estrarre tali composti è l'SFE.

Il lavoro svolto in questa tesi è stato finalizzato alla messa a punto di metodiche analitiche per l'identificazione e la quantificazione di alcuni composti funzionali del pomodoro da industria come acidi fenolici, flavonoidi e carotenoidi. Una volta ottenute le metodiche ottimali, queste sono state utilizzate per verificare eventuali differenze in merito al quantitativo dei composti sopracitati dovute all'effetto di fattori tecnico-agronomici. Alcuni fattori come luce, temperatura, concimazione, epoca di trapianto e pacciamatura del terreno determinano una notevole variazione delle caratteristiche nutrizionali che il pomodoro può apportare. Inoltre si è voluta sperimentare a livello analitico la metodica di estrazione di carotenoidi con fluido supercritico (SFE) e la resa di estrazione è stata comparata con l'estrazione chimica.

3. MATERIALI E METODI

La seguente tesi di laurea sperimentale, è stata svolta presso il laboratorio di Orticoltura del Dipartimento di Agronomia ambientale e Produzioni vegetali della facoltà di Agraria dell'Università degli studi di Padova. Le analisi sono state effettuate nel 2010 su pomodoro da industria coltivato presso L'Azienda Agraria Sperimentale “*L.Toniolo*” dell'Università degli studi di Padova situata a Legnaro (45° 21'N;11° 58' E).

In questo studio, sono state considerate due varietà di pomodoro da industria (Augusto F1-AUG e NPT 63-NPT) costituite rispettivamente dalla ditta sementiera De Ruitter e S&G. Queste due varietà, entrambe ad alto contenuto di licopene sono state scelte tra le quattro varietà coltivate nell'annata precedente al fine di confermare alcune risposte produttive e qualitative. La semina è stata realizzata su vassoi di polistirolo da 336 alveoli, ciascuno dei quali caratterizzato da un volume di 20 cm³ e riempito con torba da cubettaggio. Una volta eseguita la semina, i contenitori sono stati ricoperti con un sottile strato di vermiculite e avvolti con tessuto non tessuto (TNT) per migliorare le condizioni di germinazione. Le operazioni di semina, effettuate in una serra in ferro-vetro, sono state eseguite in 4 epoche scaglionate di 10 giorni l'una dall'altra a partire dal 23 marzo 2010, al fine di ottenere piantine idonee per il trapianto in momenti differenti. Una volta che le plantule avevano raggiunto in serra lo stadio fenologico di 2-3 foglie vere, venivano trasferite in una serra-tunnel fino al momento del trapianto. Per quanto riguarda la nutrizione della plantule, l'apporto di macro e micro nutrienti impiegati per preparare la soluzione nutritiva durante la fase di coltivazione in ambiente protetto è riportata in tabella 1.

Elementi nutritivi	Nome dell'elemento	g in 25l H ₂ O
Macro elemento	Ca(NO ₃) ₂	22.9606
	NH ₄ H ₂ PO ₄	1.1500
	KH ₂ PO ₄	2.8921
	K ₂ SO ₄	7.6256
	MgSO ₄	12.3150
	KNO ₃	11.1100
Micro elemento	MnSO ₄ xH ₂ O	0.0423
	ZnSO ₄ x7H ₂ O	0.0359
	CuSO ₄ x5H ₂ O	0.0047
	H ₃ BO ₃	0.0464
	K ₂ MoO ₄	0.0030
	Ferro	0.1376

Tabella1: Macro e micro elementi utilizzati per preparare la soluzione nutritiva per fertirrigare le plantule nei vassoi alveolati (Pimpini *et al.*, 2004).

Il trapianto è stato ovviamente eseguito in pieno campo in epoche differenziate (scaglionate di 10 giorni, T1, T2, T3 e T4) quando le piante presentavano 4-5 foglie vere. La sperimentazione in campo aperto è iniziata il 29 aprile e si è conclusa il 30 agosto. La fertilizzazione con fosforo e potassio durante la fase di pieno campo è stata effettuata per tutte le parcelle in pre-trapianto. Per le parcelle pacciamate, l'azoto è stato apportato in un'unica soluzione in pre-trapianto, mentre per le parcelle non pacciamate la fertilizzazione è stata frazionata in diversi periodi (Tabella 2).

Macro elemento	Forma	Quantità (kg ha ⁻¹)	Epoca di distribuzione nelle parcelle pacciamate	Epoca di distribuzione nelle parcelle non pacciamate
Azoto	Urea	150	Alla data di trapianto	1/3 alla data di trapianto, 1/3 a un mese dal trapianto, e 1/3 a due mesi dal trapianto
Fosforo	P ₂ O ₅	100	pre-trapianto	
Potassio	K ₂ O	120	pre-trapianto	

Tabella 2: Metodi di fertilizzazione applicati in pieno campo.

Una superficie di 768 m² è stata suddivisa in parcelle seguendo uno schema sperimentale a *split-split plot* (Figura 12), che ha previsto il confronto tra tre fattori:

- 2 modalità di pacciamatura (pacciamato (P) e non pacciamato (NP))
- 2 varietà (NPT, AUG)
- 4 epoche di trapianto (T1, T2, T3 e T4)

Nei parcelloni è stata considerata la pacciamatura, nelle parcelle è stata considerata l'epoca di trapianto e nelle sub- parcelle la varietà, il tutto ripetuto tre volte.

Per quanto riguarda il sesto di impianto, la distanza tra le piante è stata di 0,40 m tra le file e di 0,30 m sulla fila. Queste distanze sono state applicate in accordo con le normali tecniche colturali per il pomodoro da industria praticate nella regione Veneto.

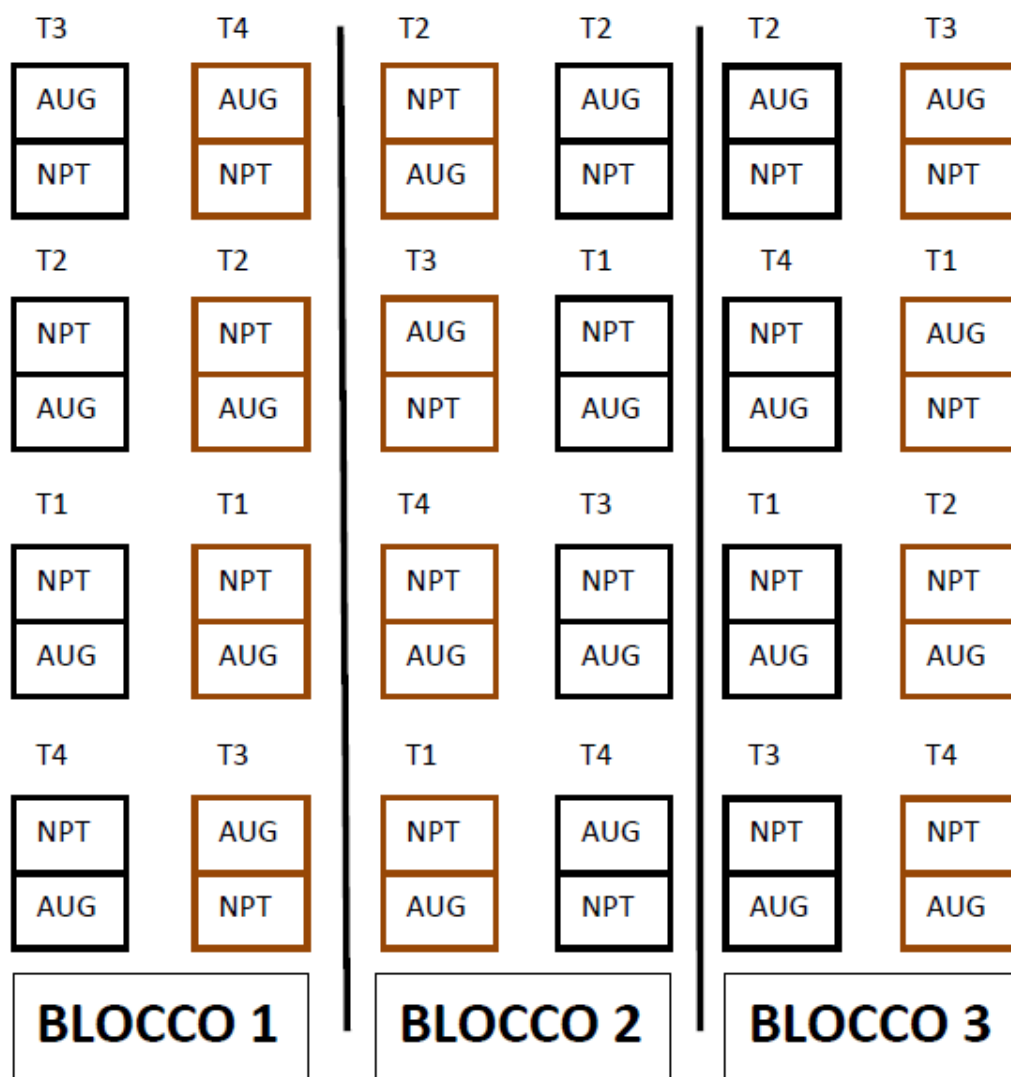


Figura 12: Rappresentazione schematica della disposizione della prova di campo; Le sub-parcelle contengono la varietà (NPT, AUG). Quelle marroni indicano le parcelle pacciamate, mentre quelle nere indicano quelle non pacciamate. Sono inoltre segnalate le 4 epoche di semina e trapianto (T1, T2, T3 e T4) e le tre repliche (blocchi).



Figura 13: Visione aerea dell'area destinata alla prova sperimentale in campo aperto.

3.1 Strumentazione

Le cromatografie liquide sono state effettuate usando un sistema cromatografico in gradiente Jasco X.LC (Figura 14), costituito da una pompa binaria (Jasco, PU-2080) basata sul principio di mescolamento ad alta pressione, da un rivelatore a serie di diodi (Jasco MD- 2015) per l'identificazione dei composti. La loro separazione è avvenuta utilizzando una colonna Tracer Extrasil OSD2 (250 X 45 mm, 5 μ m) con compartimento termostatato (Jasco CO- 2060). I dati forniti da questo sistema, sono stati raccolti ed elaborati usando il software ChromNAV Chromatography Data System. Le iniezioni (20 μ L) sono state effettuate mediante l'ausilio di un'autocampionatore (Jasco AS-2055). L'estrazione in CO₂ supercritica (Figura 14) è stata effettuata usando lo stesso sistema cromatografico sopra riportato, con il Back pressure Jasco BP-2080 e il barilotto di estrazione della capacità di 2 cm³ termostatato (Jasco CO -2060).



Figura 14: Apparecchiatura HPLC (a sinistra) e barilotto di estrazione termostatato per SFE (a destra).

3.2 Standard e reagenti

Gli standard degli acidi fenolici (acidi gallico, clorogenico, cinnamico, caffeico, p-cumarico e ferulico), dei flavonoidi (naringenina e rutina), del β - carotene e del licopene sono stati acquistati dall'azienda Sigma-Aldrich Chemical Company; il metanolo ed il tetraidrofurano (THF) ad alto grado di purezza utilizzati come fase mobile nelle analisi con HPLC provengono dalla ditta Carlo Erba (Milano, Italia). L'acqua milliQ utilizzata nelle analisi è stata preparata utilizzando un sistema di purificazione (Sartorius, Italia). La bombola per l'estrazione in supercritica (SIAD) è munita di tubo pescante e contiene CO₂ in fase liquida.

3.3 Messa a punto del metodo analitico per acidi fenolici liberi e flavonoidi

L'identificazione del metodo ottimale di estrazione degli acidi fenolici liberi e flavonoidi ha richiesto una serie di prove preliminari di seguito riportate.

Scelta della soluzione estraente: da una accurata ricerca bibliografica, si è deciso di sperimentare i solventi metanolo ed etanolo che consentono la massima estrazione dei composti idrofilici. Tra i due si è preferito usare il metanolo perché l'etanolo interferisce con la fase mobile utilizzata per la corsa cromatografica, causando picchi sovrapposti e instabilità nella linea di base del cromatogramma. Successivamente sono state testate varie percentuali di metanolo in acqua (con incrementi del 10%) per identificare la soluzione estraente che permettesse la massima resa di estrazione. In seguito a queste prove si è deciso di utilizzare come soluzione estraente metanolo 100% che permette una maggiore e più rapida estrazione.

Preparazione del campione: sono stati pesati con bilancia analitica 5 g di salsa di pomodoro e i composti in esame sono stati estratti mediante aggiunta di 20 mL di metanolo. Per permettere una migliore estrazione ogni campione è stato processato con Ultra-Turrax per circa 30'' a 17000 rpm. Questa operazione permette di aumentare la superficie di contatto della matrice con il solvente diminuendo i tempi di estrazione ed aumentandone la resa. I campioni sono stati successivamente filtrati con carta da filtro

(589 Schleicher filter paper). Il percolato ottenuto è stato filtrato con filtri per siringa in acetato di cellulosa (0,45 µm) e trasferito all'interno delle vials, per essere poi posti nell'autocampionatore e analizzati mediante HPLC.

L'identificazione del metodo cromatografico per l'analisi degli acidi fenolici liberi e flavonoidi ha richiesto una serie di prove preliminari di seguito riportate.

Scelta della fase stazionaria: l'analisi è stata eseguita con una fase stazionaria apolare. Si è utilizzato una colonna *Tracer Extrasil OSD2* di dimensioni 250 x 45 mm e una granulometria di 5 µm.

Scelta della fase mobile: si tratta di una miscela di soluzione acquosa e solvente organico idrofilo con polarità variabile durante la corsa cromatografica.

La composizione ottimale della fase mobile è quella che permette tempi di lavoro brevi e risoluzioni cromatografiche accettabili e si identifica facendo variare la composizione percentuale della fase mobile, agendo così sulla sua polarità.

Secondo quanto riportato in letteratura (Lin, 2003; Luthria, 2006; Xu, 2006) si è visto che le migliori performance di eluizione si ottengono utilizzando come fase mobile una soluzione acquosa di acido formico 0,1%(A) e metanolo (B).

Modalità della corsa cromatografica: le prove sulle corse cromatografiche sono state effettuate variandone la percentuale di miscelazione tra acido formico 0,1 % in acqua (A) e metanolo (B) e i tempi di gradiente che sono di seguito elencati.

- a) gradiente di B 0-40 % in 20', 40-60 % in 15', 60-80 % in 10', 80-100% in 5'
- b) B 25 % al tempo 0 e successivo gradiente 25-80 % in 35'
- c) gradiente di B 0-100% in 50'
- d) gradiente di B 0-100% in 60'

Il metodo che ha permesso di ottenere una migliore separazione e risoluzione dei picchi è risultato il c che è stato di conseguenza applicato all'analisi dei campioni.

Temperatura della colonna: sono state sperimentate due temperature (35°C e 25°C) per la termostatazione della colonna. I migliori risultati in termini di separazione e definizione dei picchi si sono ottenuti a 35°C.

Velocità di flusso: sono stati testati vari flussi (0,7-0,8-1-1,5 mL/min). Nonostante il flusso di 1,5 mL/min rendesse possibile accorciare la corsa cromatografica, si è deciso di utilizzare il flusso 0,8 mL/min per permettere una migliore separazione dei picchi interessati.

Modalità di rivelazione: come sistema di rilevazione è stato usato un rivelatore a serie di diodi (DAD) che consente il monitoraggio in un intervallo di lunghezze d'onda che va da 200 nm a 900 nm. Questo permette di identificare la lunghezza di massimo assorbimento di un composto mediante la corsa cromatografica del suo standard. Per l'identificazione degli acidi fenolici sono state utilizzate le seguenti lunghezze d'onda di massimo assorbimento:

- 270 nm per l'acido gallico
- 280 nm per l'acido cinnamico
- 290 nm per la naringenina
- 310 nm per l'acido *p*-cumarico
- 325 nm per gli acidi clorogenico, caffeico e ferulico
- 360 nm per la rutina.

Identificazione e quantificazione degli acidi fenolici e flavonoidi: l'identificazione degli acidi fenolici è avvenuta mediante il confronto dei tempi di ritenzione (t_R) e delle lunghezze d'onda (λ) di massimo assorbimento dei relativi standard (Tabella 4) con il cromatogramma del campione in esame. Una volta identificati gli acidi fenolici è stata eseguita la quantificazione mediante curva di calibrazione che consente di mettere in relazione le aree dei picchi degli standard con l'area del picco dell'analita in esame. La soluzione madre degli standard è stata preparata sciogliendo gli standard in metanolo ed eseguendo diluizioni seriali della soluzione (20 mg/L, 10 mg/l, 5 mg/L) al fine di ricavare i punti necessari per costruire le curve di calibrazione.

Acidi fenolici	t_R min	λ max (nm)
Acido clorogenico	24,1	325
Acido caffeico	25,85	325
Acido <i>p</i> -cumarico	29,5	310
Acido ferulico	30,22	325
Acido gallico	14,5	270
Acido cinnamico	36,64	280
Flavonoidi	t_R min	λ max (nm)
Naringenina	37,24	290
Rutina	33,1	360

Tabella 4: Tempo di ritenzione (t_R) e lunghezza d'onda di massimo assorbimento (λ) degli standards.

3.4 Messa a punto del metodo analitico per licopene e β -carotene

L'identificazione del metodo ottimale di estrazione chimica di licopene e β -carotene ha richiesto una serie di prove preliminari di seguito riportate.

Scelta della soluzione estraente: seguendo quanto trovato in bibliografia () il pomodoro è stato essiccato e polverizzato per permettere una migliore estrazione dei carotenoidi. I campioni sono stati disidratati in stufa a 65 °C e successivamente polverizzati con l'ausilio di una macina elettrica. I solventi sperimentati per l'estrazione sono stati metanolo e THF. Il metanolo è stato scelto per le sue caratteristiche mediamente polari e per la sua capacità di non interferire con la corsa cromatografica mentre il THF è stato impiegato perché discioglie sostanze liposolubili come i carotenoidi. Sono state sperimentate le seguenti soluzioni estraenti:

- Metanolo 100%
- Metanolo:THF 50:50
- Metanolo:THF: acqua 67:27:6
- THF100%

Il THF al 100% è stato scelto come solvente estraente in quanto permette una dissoluzione immediata e completa delle componenti interessate.

Preparazione del campione: sono stati pesati 200 mg di pomodoro secco polverizzato che sono stati estratti con l'aggiunta di 20 mL di THF. I campioni sono stati poi processati con Ultra Turrax per circa 30" a 17500 rpm, filtrati con carta da filtro e successivamente con filtri per siringa in cellulosa rigenerata (0,20 μ m) e poi caricati nelle vials per autocampionatore ed analizzati in HPLC.

L'identificazione del metodo cromatografico ottimale per l'analisi dei carotenoidi ha richiesto una serie di prove preliminari sotto riportate.

Scelta della fase stazionaria: l'analisi dei carotenoidi è stata eseguita con una fase stazionaria apolare. Si è utilizzato una colonna *Tracer Extrasil OSD2* di dimensioni 250 x 45 mm e una granulometria di 5 μ m.

Scelta della fase mobile: da quanto riportato in letteratura (Cadoni, *et al.*,2000; Vasapollo, *et al.*,2004) le migliori performance di eluizione si ottengono utilizzando

come fase mobile metanolo:THF:acqua 67:27:6 con modalità isocratica, in quanto specifica per i due carotenoidi presi in esame.

Temperatura della colonna: tenendo conto della labilità delle molecole in esame sono state testate due temperature , 25°C e 30 °C. La temperatura di 25 °C ha permesso una buona separazione dei picchi e una maggiore resistenza dei componenti alla degradazione indotta dal calore.

Velocità di flusso: sono stati testati i flussi di 1 mL/min e 1,5 mL/min. La velocità di flusso di 1 mL/min permette una buona separazione dei picchi evitando che tempi di ritenzione ravvicinati possano rendere difficile la lettura del cromatogramma.

Modalità di rilevazione: come modalità di rilevazione è stato utilizzato un rivelatore a serie di diodi (DAD) e il cromatogramma è stato ottenuto selezionando la lunghezza d'onda di massimo assorbimento del licopene di 470 nm e del β -carotene di 450 nm.

Identificazione e quantificazione di licopene e β -carotene: l'identificazione dei carotenoidi è avvenuta mediante confronto dei tempi di ritenzione (t_R) e delle lunghezze d'onda (λ) di massimo assorbimento dei relativi standard con il cromatogramma del campione in esame. Una volta identificati è stata eseguita la quantificazione mediante curve di calibrazione ottenute utilizzando una soluzione madre degli standard che sono stati sciolti in THF ed eseguendo diluizioni seriali (100 mg/L, 50 mg/L, 25mg/L, 12,5 mg/L).

3.5 Messa a punto del metodo SFE per licopene e β -carotene

Trattandosi di una metodica in fase sperimentale con strumentazione analitica e non industriale, i tempi di analisi risultano elevati e di conseguenza si è deciso di prendere in esame solo i campioni appartenenti al blocco 3.

Preparazione del campione: sono stati pesati 100 mg di campione polverizzato, caricati nel barilotto di estrazione e imbibiti con 100 μ L di THF insieme alla lana di ceramica posta alle estremità. I carotenoidi estratti in forma di nebulosa sono stati raccolti con 5 mL di THF e successivamente filtrati con filtri per siringa in cellulosa rigenerata da 0,2 μ m prima dell'iniezione in HPLC.

Prove effettuate con estrattore in CO₂ supercritica: ai fini della messa a punto del metodo sono state eseguite varie prove per valutare quali parametri consentissero la massima estrazione di licopene. I parametri valutati sono stati la temperatura (T) e la pressione (P) alle quali è stata sottoposta la CO₂, la velocità del flusso (f), il tempo durante il quale la CO₂ resta in contatto con la matrice nel barilotto di estrazione detto tempo di estrazione statica (t.s.) e il cosolvente utilizzato per imbibire il campione nel barilotto di estrazione. In tabella 5 sono schematizzate le prove effettuate; con in “prova 1” sono raggruppati gli esperimenti sulla variazione di temperatura, in “prova 2” quelli sulla variazione di pressione (in “prova 1” e “prova 2” sono stati inoltre testati 2 cosolventi diversi), in “prova 3” sono raggruppati gli esperimenti sulla variazione del flusso e in “prova 4” quelli sul tempo di estrazione statica.

PROVA 1	Cosolvente	T (°C)	P (MPa)	f (mL/min)	t.s.(min)
	Etanolo	30	30	2,5	10
		45	30	2,5	10
		60	30	2,5	10
PROVA 2	Cosolvente	T (°C)	P (MPa)	f (mL/min)	t.s.(min)
	THF	30	25	2,5	10
		30	30	2,5	10
		30	35	2,5	10
PROVA 3	Cosolvente	T (°C)	P (MPa)	f (mL/min)	t.s.(min)
	THF	50	30	1	10
		50	30	2,5	10
		50	30	4	10
PROVA 4	Cosolvente	T (°C)	P (MPa)	f (mL/min)	t.s.(min)
	THF	70	30	2,5	5
		70	30	2,5	10

Tabella 5: Prove effettuate con estrattore supercritico mediante variazione dei parametri di pressione (P), temperatura (T), flusso (f) e tempo di estrazione statica (t.s.).

3.6 Analisi statistica

L'elaborazione statistica dei dati ottenuti è stata effettuata utilizzando l'ANOVA: sono stati considerati gli effetti principali varietà, epoca e pacciamatura e le rispettive interazioni. La separazione delle medie è stata realizzata mediante il *Test HSD di Tukey* ($P < 0,05$).

4. RISULTATI

4.1 Metodo ottimale per l'analisi di alcuni composti funzionali del pomodoro da industria

Acidi fenolici liberi e flavonoidi: la metodica ottimale ha previsto l'estrazione a partire da 5 g di pomodoro fresco mediante l'aggiunta di 20 mL di metanolo. Il tutto è stato passato in Ultra Turrax per circa 30 ". Il campione è stato successivamente filtrato come riportato nel paragrafo 3.3 e analizzato mediante HPLC (Figura 15). La colonna utilizzata è la Tracer Extrasil ODS2 (250 x 45mm, 5 μ m) termostata a 35°C. Come fase mobile è stata utilizzata una soluzione acquosa di acido formico 0,1% (A) e metanolo (B) con gradiente di B 0-100% in 50'. La velocità del flusso è stata 0,8 mL/min. Sono state selezionate le lunghezze d'onda di 325 nm per gli acidi clorogenico, caffeico e ferulico, 310 nm per l'acido *p*-cumarico, 270 nm per l'acido gallico, 280 nm per l'acido cinnamico, 290 nm per la naringenina e 360 nm per la rutina. Gli analiti sono stati quantificati mediante curve di calibrazione come visto nel paragrafo 3.3.

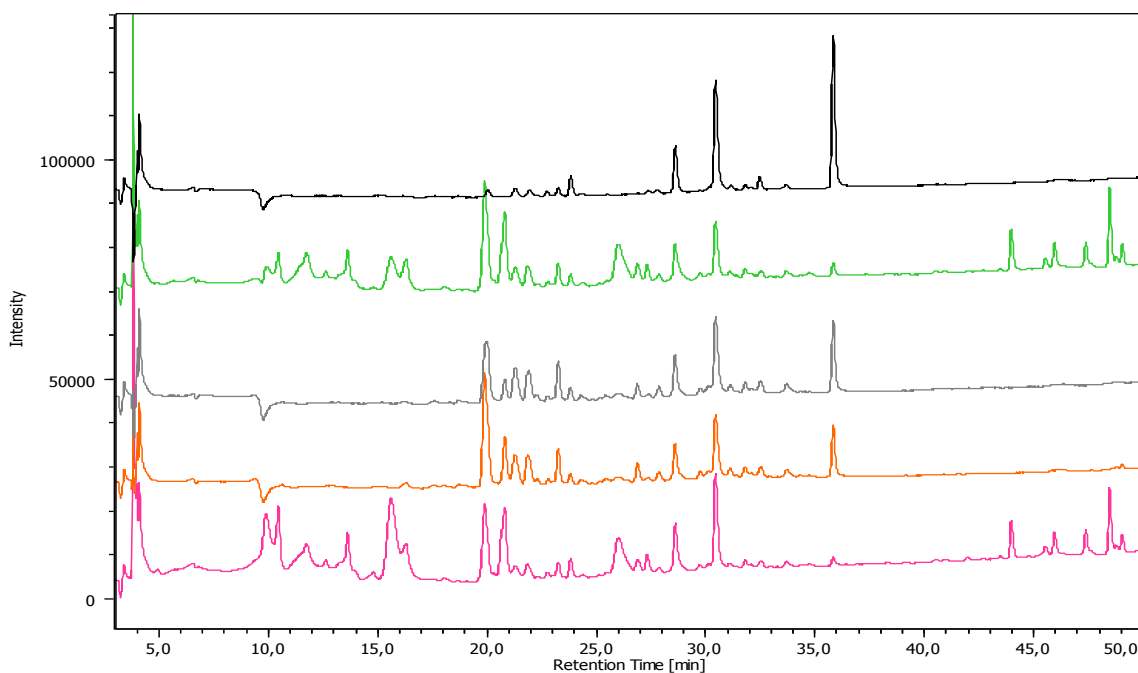


Figura 15: Cromatogramma dell'estratto di pomodoro per acidi fenolici e flavonoidi a differenti lunghezze d'onda (nero 270 nm; rosa 310 nm; arancione 325 nm; grigio 280 nm; verde 360 nm).

Carotenoidi: la metodica ottimale ha previsto l'estrazione da 200 mg di pomodoro secco macinato mediante l'aggiunta di 20 mL di THF. Il tutto è stato passato in Ultra Turrax per circa 30". I campioni sono stati successivamente filtrati come riportato nel paragrafo 3.4 e analizzati in HPLC (Figura 16). La colonna utilizzata è la Tracer Extrasil ODS2 (250 x 45mm, 5µm) termostata a 25°C. Come fase mobile è stato utilizzata una soluzione di metanolo:THF:acqua 67:27:6. La velocità del flusso utilizzata è stata di 1 mL/min. Sono state selezionate le lunghezze d'onda di massimo assorbimento di 470 nm per il licopene e 450 nm per il β-carotene e la quantificazione è avvenuta mediante curve di calibrazione come esposto nel paragrafo 3.4.

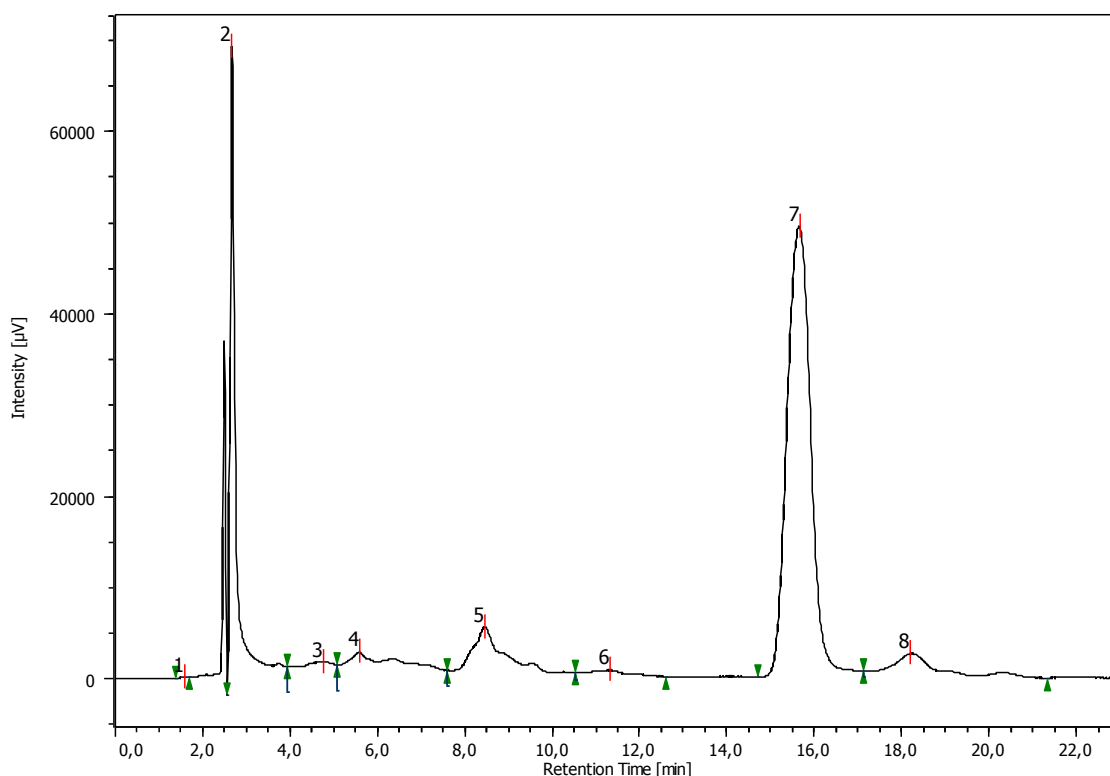


Figura 16: Cromatogramma dell'estratto di pomodoro per licopene (7) e β-carotene (8).

4.2 Metodo ottimale per SFE

Dalle prove effettuate e riportate nel paragrafo 3.5 di materiali e metodi è emerso che la temperatura migliore per l'estrazione del licopene è 30°C (Figura 17), la pressione risulta essere 30 MPa (Figura 18), il flusso più adeguato è di 2,5 mL/min (Figura 19) poiché un flusso di 4 mL/min può causare una scorretta elaborazione dei picchi del cromatogramma e il tempo di estrazione statica è di 5 minuti (Figura 20) che consente una buona estrazione in un minor tempo.

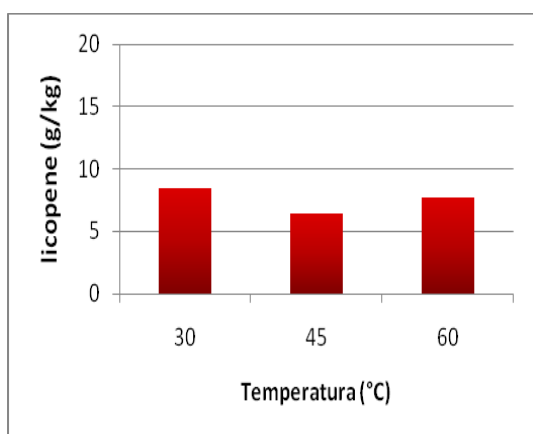


Figura 17: Variazione della quantità estratta di licopene in funzione della temperatura applicata alla CO₂.

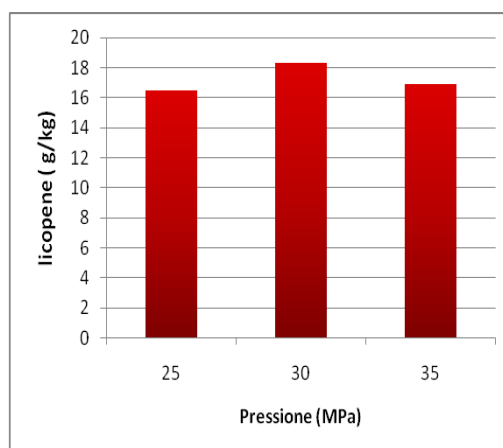


Figura 18: Variazione della quantità estratta di licopene in funzione della pressione applicata alla CO₂.

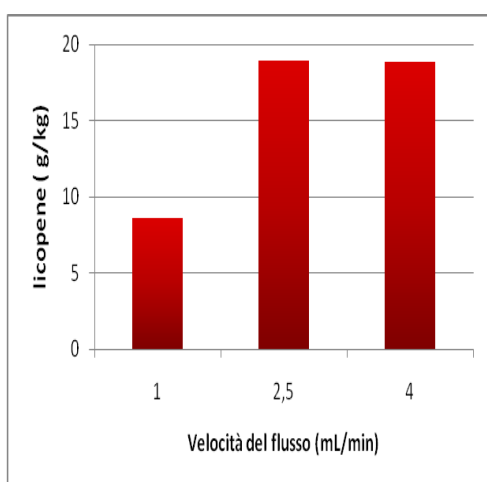


Figura 19: Variazione della quantità estratta di licopene in funzione del flusso di CO₂.

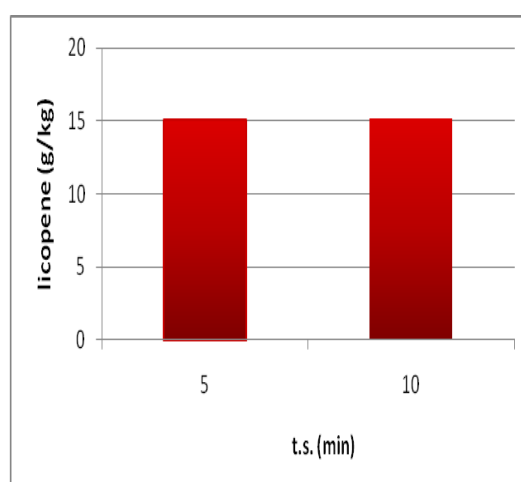


Figura 20: Variazione della quantità di licopene in funzione del t.s.

4.3 Umidità nei pomodori da industria

Dall'analisi della varianza (Tabella 6), si nota che i fattori varietà, epoca e pacciamatura influiscono in maniera statisticamente significativa sul contenuto di acqua nel pomodoro. In particolare il contenuto maggiore si ha nella varietà AUG e in assenza di pacciamatura (Figura 21), inoltre è maggiore nelle epoche di trapianto T3 e T4 (Figure 22 e 23).

SORGENTE	DEVIANZA	GL	VARIANZA	RAPP-F	PROBABILITA'
EFFETTI PRINCIPALI					
TOTALE	25.9849	45			
Blocchi	0.417058	2	0.208529	0.87	0.4293
Varietà	2.02741	1	2.02741	8.47	0.0070
Epoca	5.9647	3	1.98823	8.31	0.0004
Pacciamatura	6.57434	1	6.57434	27.48	0.0000
INTERAZIONI					
Varietà*epoca	0.73246	3	0.244153	1.02	0.3985
Varietà *pacciamatura	0.0908713	1	0.0908713	0.38	0.5427
Epoca*pacciamatura	2.02489	3	0.674963	2.82	0.0570
Varietà*epoca*pacciamatura	0.947149	3	0.315716	1.32	0.2877
ERRORE	6.69907	28	0.239253		

Tabella 6: Analisi della varianza per il contenuto di acqua nel pomodoro (i valori significativi sono riportati in grassetto).

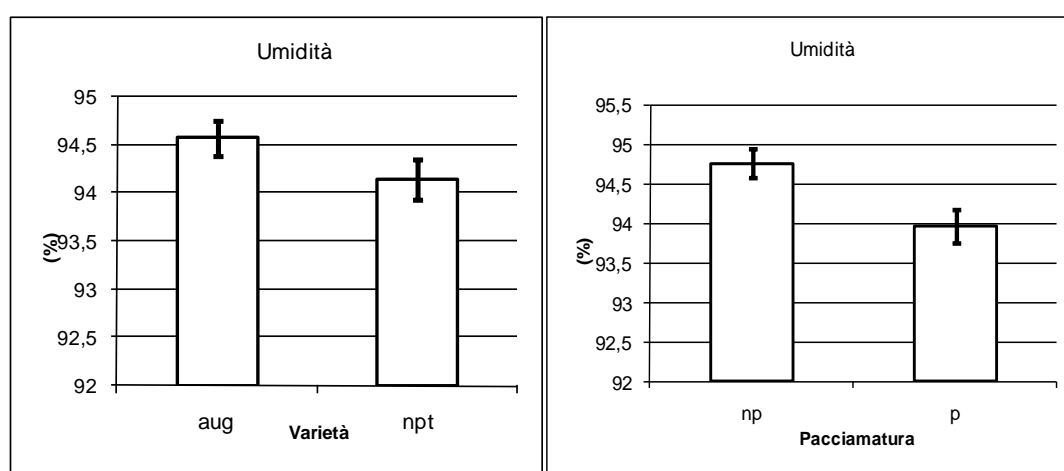


Figura 21: Variazione del contenuto di acqua nel pomodoro in relazione alla varietà e alla pacciamatura.

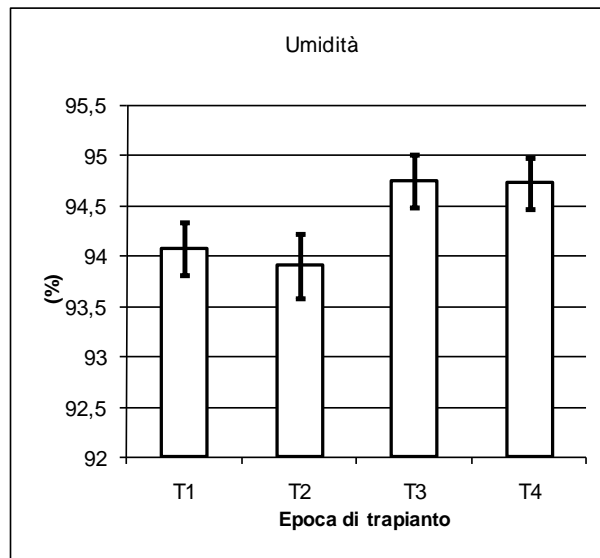


Figura 22: Variazione nel contenuto di acqua in relazione all'epoca di trapianto.

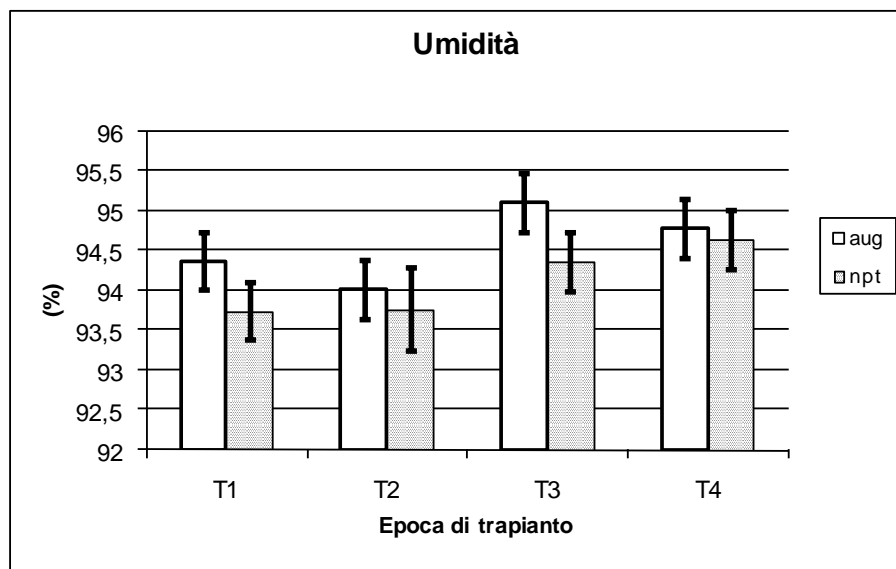


Figura 23: Variazione del contenuto di acqua in relazione all'epoca di trapianto e alla varietà.

4.4 Acidi fenolici liberi e flavonoidi

Di seguito sono riportati i risultati ottenuti dalle analisi con i relativi commenti.

Acido gallico

Dall'analisi della varianza dell'acido gallico (Tabella 6) emerge che nessuno degli fattori studiati è statisticamente significativo. Risultano inoltre non significative anche le interazioni tra gli effetti analizzati. Quindi l'acido gallico non subisce cambiamenti significativi al variare dei fattori anche se la varietà AUG, la tesi pacciamata (Figura 24) e la prima epoca di trapianto presentano valori apparentemente superiori (Figure 25 e 26).

SORGENTE	DEVIANZA	GL	VARIANZA	RAPP-F	PROBABILITA'
EFFETTI PRINCIPALI					
TOTALE	124.641	45			
Blocchi	5.62438	2	2.81219	0.95	0.3975
Varietà	0.207326	1	0.207326	0.07	0.7928
Epoca	4.5016	3	1.50053	0.51	0.6794
Pacciamatura	2.81599	1	2.81599	0.96	0.3368
INTERAZIONI					
Varietà*epoca	11.4946	3	3.83152	1.30	0.2941
Varietà *pacciamatura	0.0970765	1	0.0970765	0.03	0.8573
Epoca*pacciamatura	9.09569	3	3.0319	1.03	0.3951
Varietà*epoca*pacciamatura	6.18254	3	2.06085	0.70	0.5606
ERRORE	82.5622	28	2.94865		

Tabella 7: Analisi della varianza per l'acido gallico (i valori significativi sono riportati in grassetto).

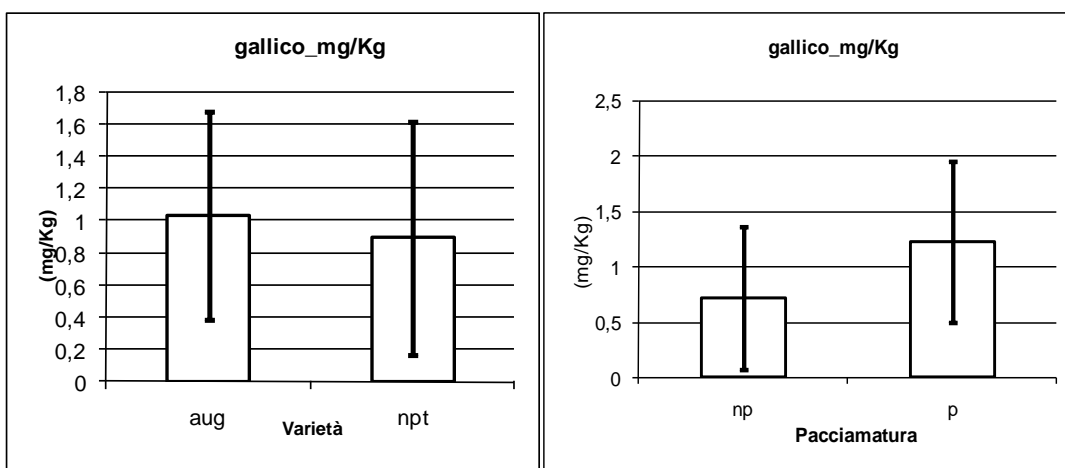


Figura 24: Variazione del contenuto di acido gallico in relazione alla varietà e alla pacciamatura.

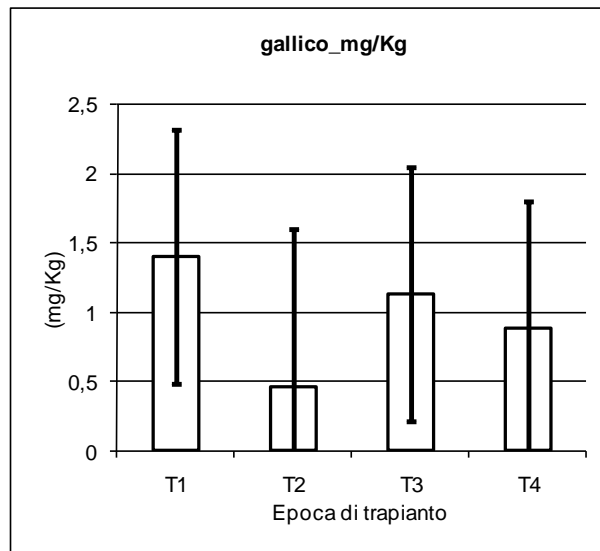


Figura 25: Variazione nel contenuto di acido gallico in relazione all'epoca di trapianto.

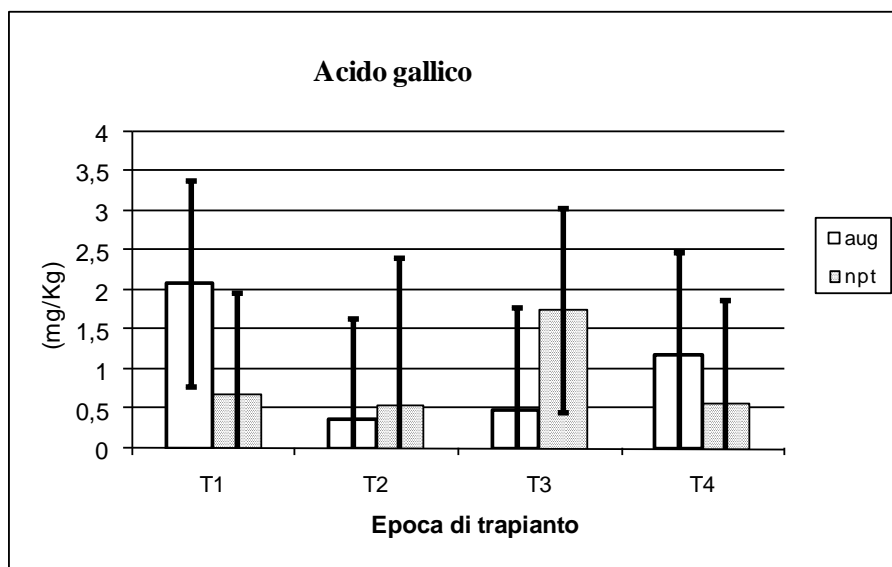


Figura 26: Variazione del contenuto di acido gallico in relazione all'epoca di trapianto e alla varietà

Acido clorogenico

Secondo l'analisi della varianza (Tabella 8), l'acido clorogenico non mostra nessuna differenza statisticamente significativa in nessuno dei fattori considerati e in nessuna delle interazioni anche se si è verificato un modesto ma non significativo aumento nella varietà NPT, nella pacciamatura e nella seconda epoca di trapianto (Figura 27, 28 e 29).

SORGENTE	DEVIANZA	GL	VARIANZA	RAPP-F	PROBABILITA'
EFFETTI PRINCIPALI					
TOTALE	18.7219	45			
Blocchi	0.421802	2	0.210901	0.59	0.5588
Varieta	1.32589	1	1.32589	3.74	0.0634
Epoca	1.51029	3	0.503429	1.42	0.2583
Pacciamatura	0.430563	1	0.430563	1.21	0.2801
INTERAZIONI					
Varietà*epoca	2.84786	3	0.949287	2.67	0.0665
Varietà *pacciamatura	1.26498	1	1.26498	3.56	0.0695
Epoca*pacciamatura	0.520247	3	0.173416	0.49	0.6930
Varietà*epoca*pacciamatura	0.672397	3	0.224132	0.63	0.6009
ERRORE	9.9387	28	0.354954		

Tabella 8: Analisi della varianza per l'acido clorogenico (i valori significativi sono in grassetto).

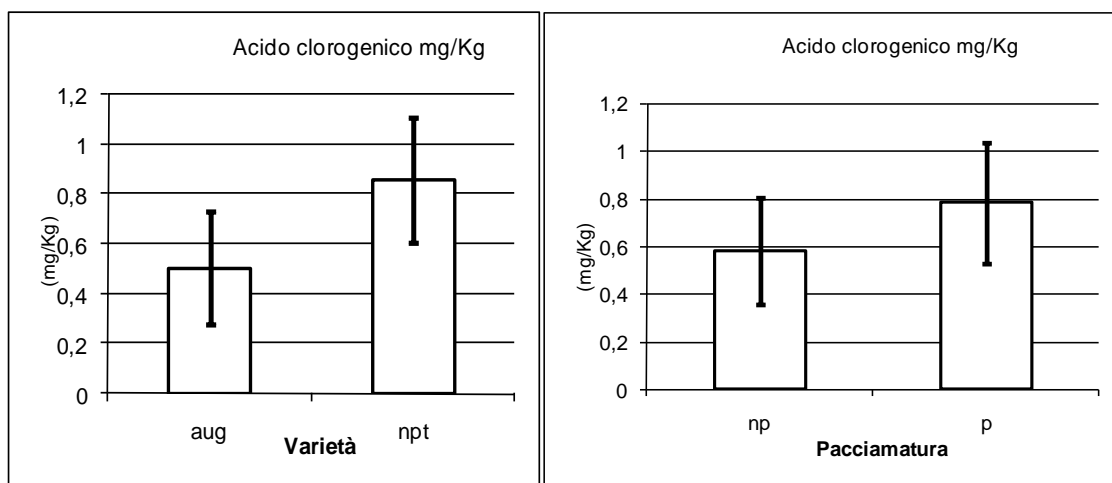


Figura 27: Variazione del contenuto di acido clorogenico in relazione alla varietà e alla pacciamatura.

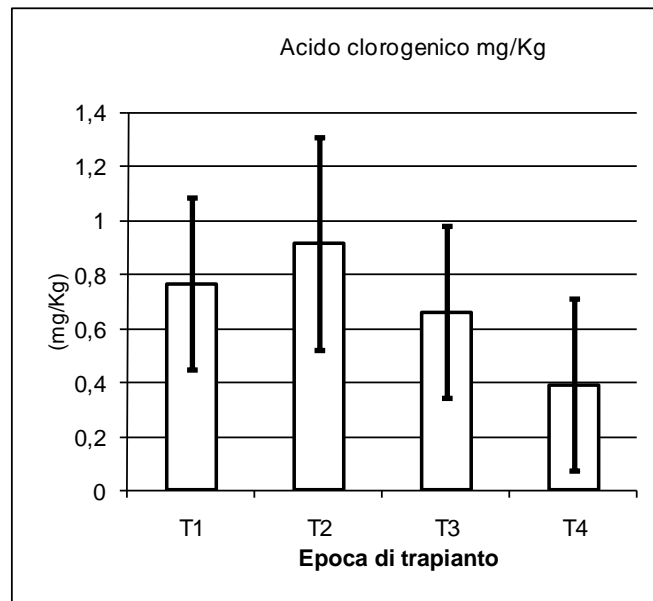


Figura 28: Variazione nel contenuto di acido clorogenico in relazione all'epoca di trapianto.

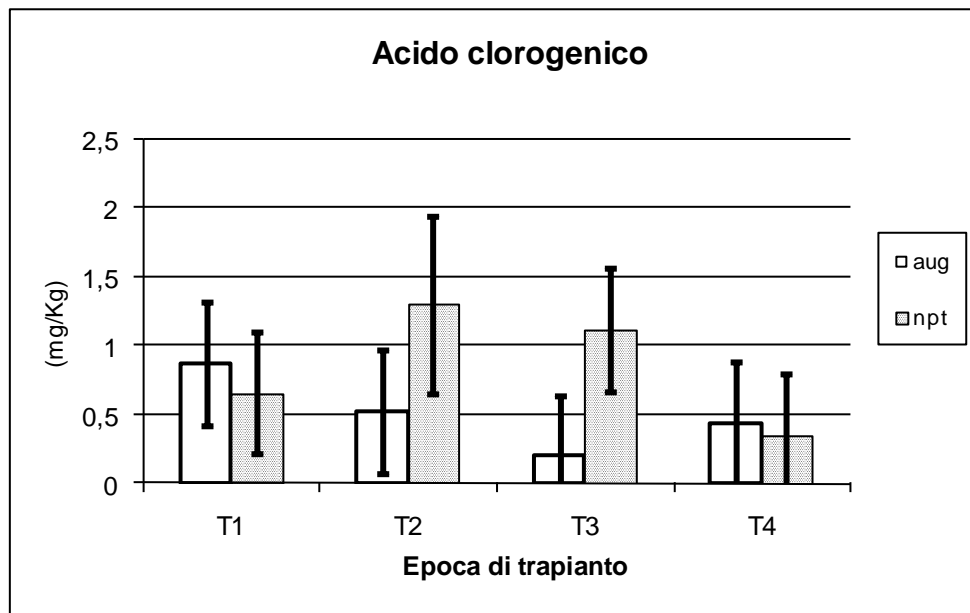


Figura 29: Variazione del contenuto di acido clorogenico in relazione all'epoca di trapianto e alla varietà.

Acido caffeico

L'analisi della varianza per l'acido caffeico (Tabella 9) dimostra che i fattori analizzati non determinano differenze statisticamente significative nella sua concentrazione. La varietà AUG, l'epoca di trapianto T2 e la pacciamatura hanno mostrato valori apparentemente superiori (Figura 30, 31 e 32).

SORGENTE	DEVIANZA	G.L	VARIANZA	RAPP-F	PROBABILITA'
EFFETTI PRINCIPALI					
TOTALE	12.8681	45			
Blocchi	0.212532	2	0.106266	0.35	0.7064
Varieta	0.519926	1	0.519926	1.72	0.2002
Epoca	1.17825	3	0.39275	1.30	0.2938
Pacciamatura	0.0546908	1	0.0546908	0.18	0.6737
INTERAZIONI					
Varietà*epoca	0.303557	3	0.101186	0.34	0.8001
Varietà *pacciamatura	0.00908741	1	0.00908741	0.03	0.8635
Epoca*pacciamatura	0.380946	3	0.126982	0.42	0.7398
Varietà*epoca*pacciamatura	1.44903	3	0.483011	1.60	0.2118
ERRORE	8.45656	28	0.30202		

Tabella 9: Analisi della varianza per l'acido caffeico (i valori significativi sono in grassetto).

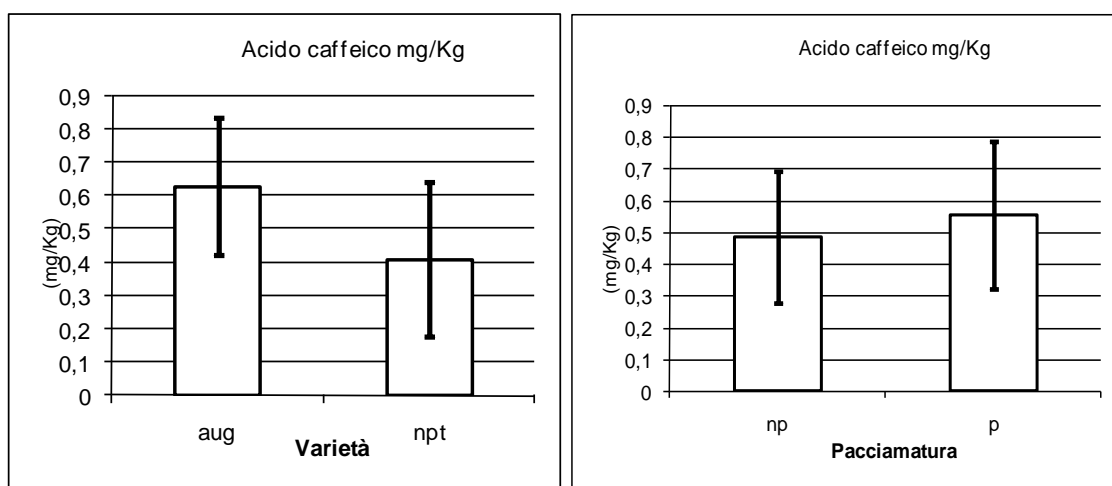


Figura 30: Variazione del contenuto di acido caffeico in relazione alla varietà e alla pacciamatura.

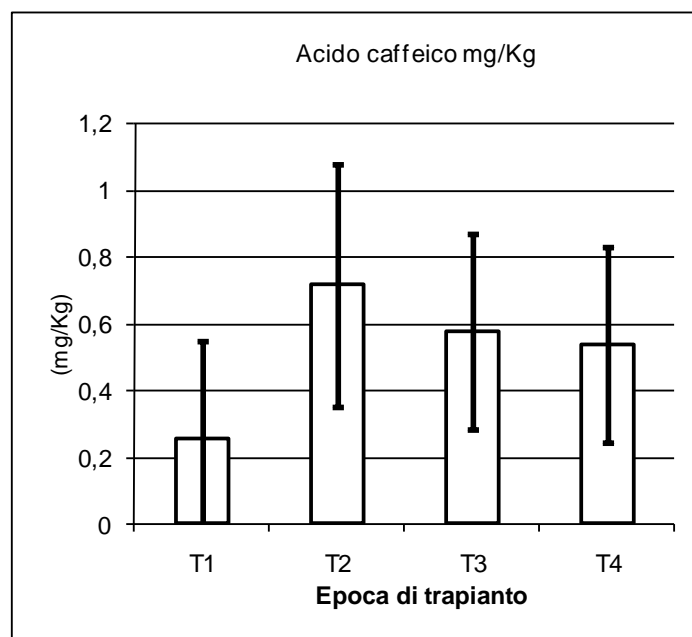


Figura 31: Variazione nel contenuto di acido caffeico in relazione all'epoca di trapianto.

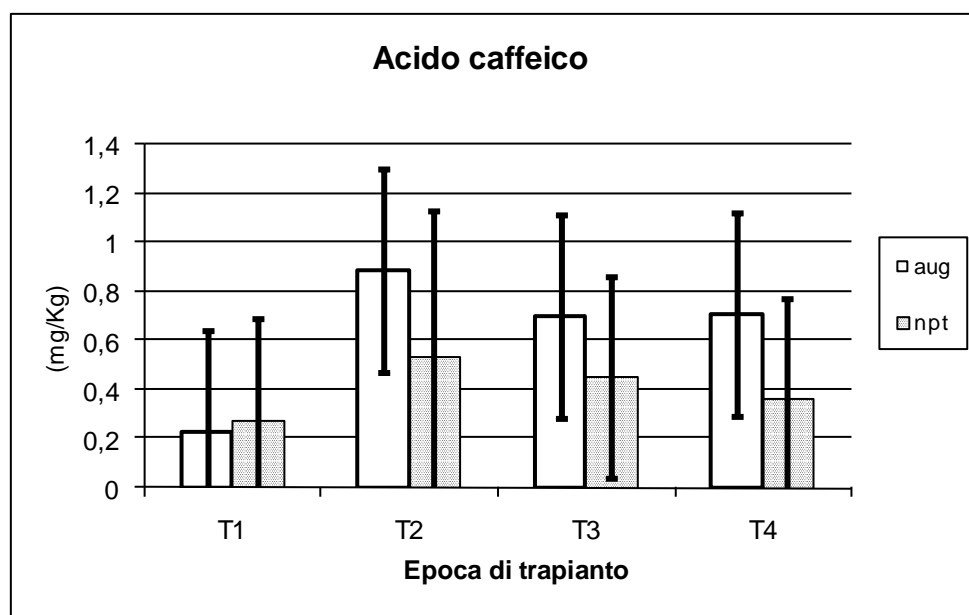


Figura 32: Variazione del contenuto di acido caffeico in relazione all'epoca di trapianto e alla varietà

Acido *p*-cumarico

Dall'analisi della varianza della acido *p*-cumarico (Tabella 10) risulta statisticamente significativo l'effetto varietà, con quantitativi maggiori nella varietà AUG rispetto ad NPT. Non risultano invece significativi i fattori pacciamatura, epoca di trapianto e le relative interazioni. In particolare si è registrato il contenuto apparentemente più elevato nel testimone non pacciamato e nell'epoca T4 (Figura 33, 34 e 35).

SORGENTE	DEVIANZA	GL	VARIANZA	RAPP-F	PROBABILITA'
EFFETTI PRINCIPALI					
TOTALE	157.275	45			
Blocchi	6.06112	2	3.03056	0.96	0.3957
Varietà	15.1445	1	15.1445	4.79	0.0371
Epoca	18.1798	3	6.05995	1.92	0.1498
Pacciamatura	1.01506	1	1.01506	0.32	0.5755
INTERAZIONI					
Varietà*epoca	6.50061	3	2.16687	0.69	0.5685
Varietà*pacciamatura	0.472576	1	0.472576	0.15	0.7020
Epoca*pacciamatura	3.32214	3	1.10738	0.35	0.7892
Varietà*epoca*pacciamatura	15.7717	3	5.25724	1.66	0.1976
ERRORE	88.5235	28	3.16155		

Tabella 10: Analisi della varianza per l'acido *p*-cumarico (i valori significativi sono in grassetto).

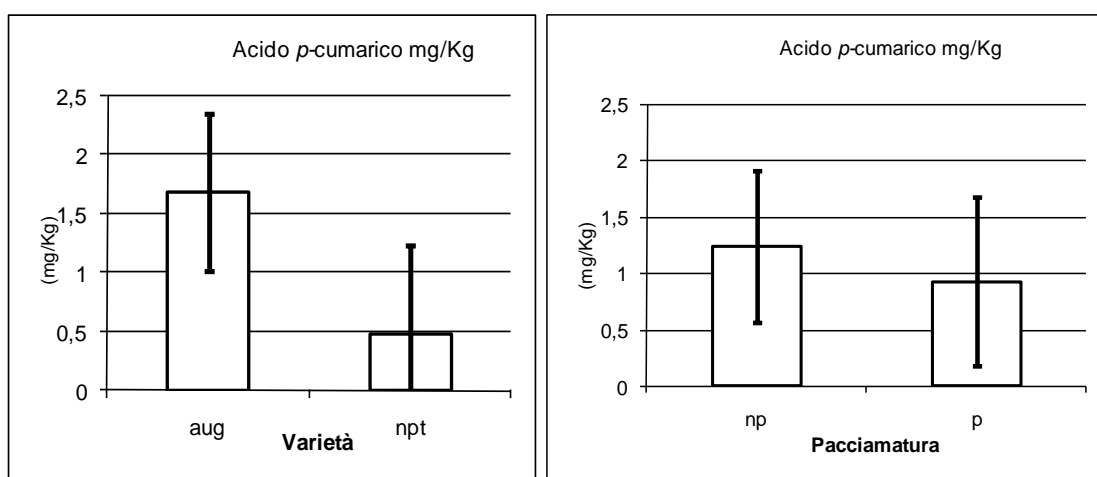


Figura 33: Variazione del contenuto di acido *p*-cumarico in relazione alla varietà e alla pacciamatura.

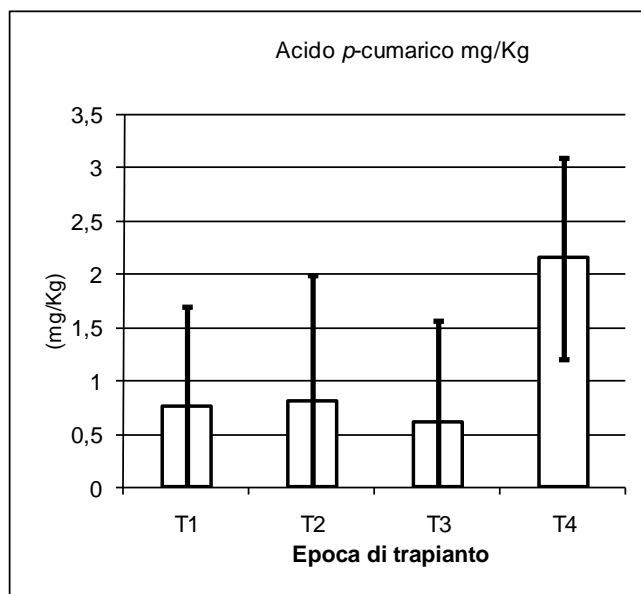


Figura 34: Variazione nel contenuto di acido *p*-cumarico in relazione all'epoca di trapianto.

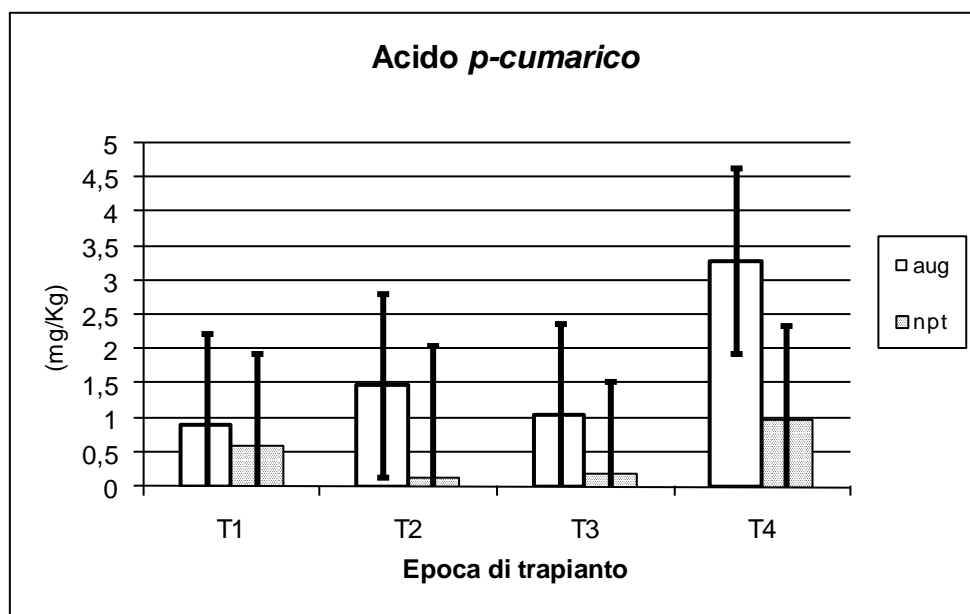


Figura 35: Variazione del contenuto di acido *p*-cumarico in relazione all'epoca di trapianto e alla varietà.

Acido ferulico

Secondo l'analisi della varianza (Tabella 11) nessuno dei fattori studiati è statisticamente significativo. I valori apparentemente più elevati sono stati registrati nella varietà AUG, nella pacciamatura e nell'epoca T4 (Figura 36, 37 e 38).

SORGENTE	DEVIANZA	GL	VARIANZA	RAPP-F	PROBABILITA'
EFFETTI PRINCIPALI					
TOTALE	754.112	45			
Blocchi	35.9083	2	17.9541	1.19	0.3189
Varieta	36.115	1	36.115	2.40	0.1329
Epoca	30.2443	3	10.0814	0.67	0.5784
Pacciamatura	2.32526	1	2.32526	0.15	0.6975
INTERAZIONI					
Varieta*epoca	31.3113	3	10.4371	0.69	0.5645
Varieta *pacciamatura	2.31246	1	2.31246	0.15	0.6983
Epoca*pacciamatura	42.3026	3	14.1009	0.94	0.4367
Varieta*epoca*pacciamatura	120.189	3	40.0628	2.66	0.0677
ERRORE	422.174	28	15.0776		

Tabella 11: Analisi della varianza per l'acido ferulico (i valori significativi sono in grassetto).

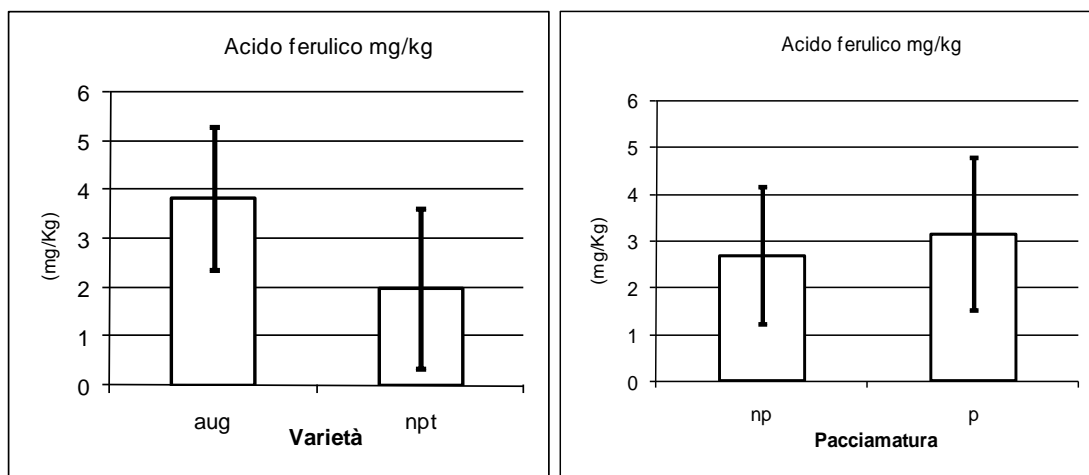


Figura 36: Variazione del contenuto di acido ferulico in relazione alla varietà e alla pacciamatura.

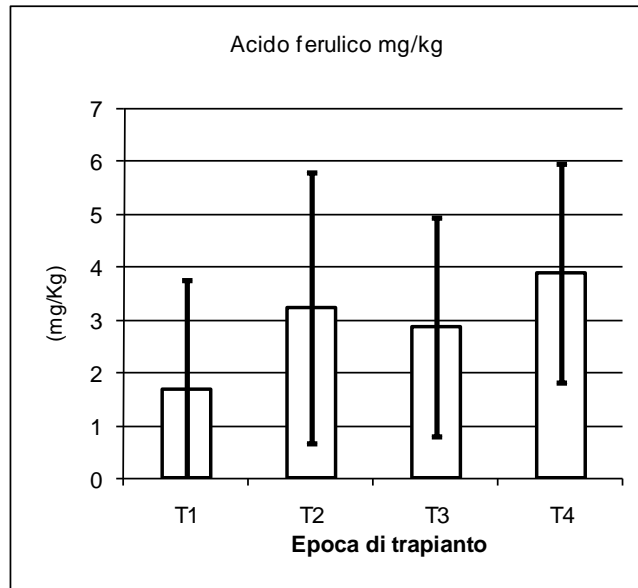


Figura 37: Variazione nel contenuto di acido ferulico in relazione all'epoca di trapianto.

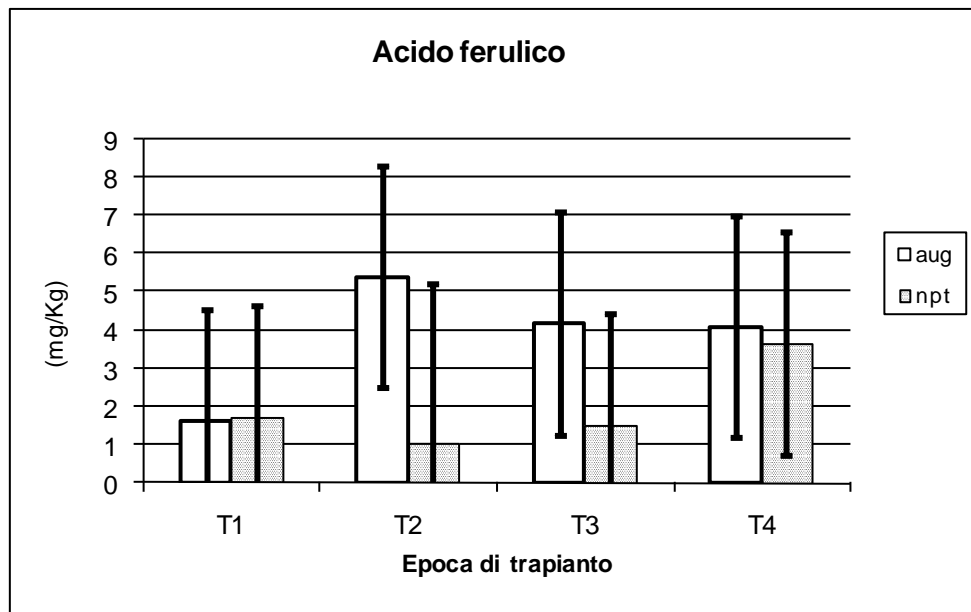


Figura 38: Variazione del contenuto di acido ferulico in relazione all'epoca di trapianto e alla varietà.

Acido cinnamico

Secondo l'analisi della varianza (Tabella 12) nessuno dei fattori studiati è statisticamente significativo (Figura 39, 40 e 41).

SORGENTE	DEVIANZA	GL	VARIANZA	RAPP-F	PROBABILITA'
EFFETTI PRINCIPALI					
TOTALE	0.252363	45			
Blocchi	0.0155963	2	0.00779813	1.42	0.2582
Varieta	0.0112686	1	0.0112686	2.05	0.1629
Epoca	0.0221482	3	0.00738273	1.35	0.2796
Pacciamatura	0.000168949	1	0.000168949	0.03	0.8620
INTERAZIONI					
Varieta*epoca	0.0244277	3	0.00814258	1.48	0.2402
Varieta *pacciamatura	0.00118664	1	0.00118664	0.22	0.6455
Epoca*pacciamatura	0.012792	3	0.00426399	0.78	0.5165
Varieta*epoca*pacciamatura	0.00620193	3	0.00206731	0.38	0.7704
ERRORE	0.153592	28	0.00548544		

Tabella 12: Analisi della varianza per l'acido cinnamico (i valori significativi sono in grassetto).

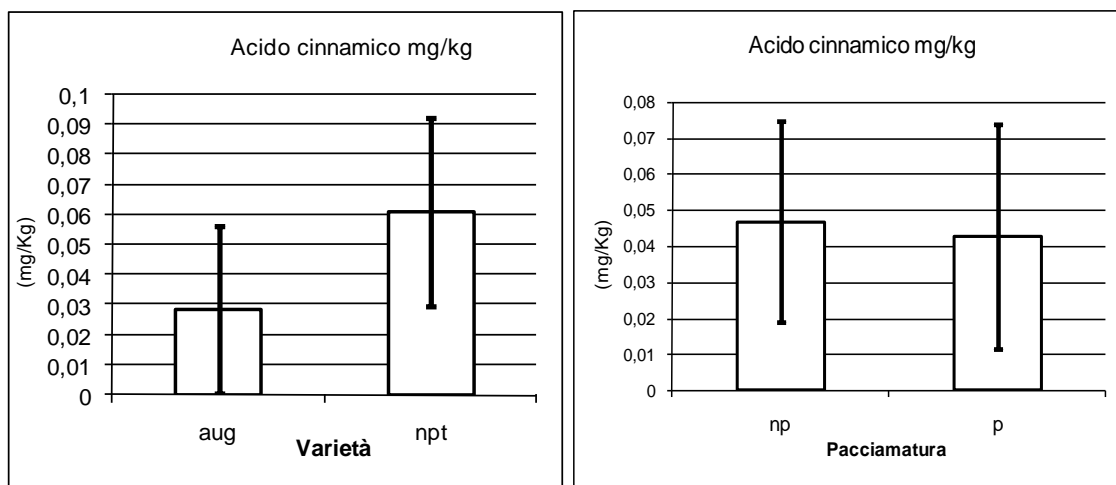


Figura 39: Variazione del contenuto di acido cinnamico in relazione alla varietà e alla pacciamatura.

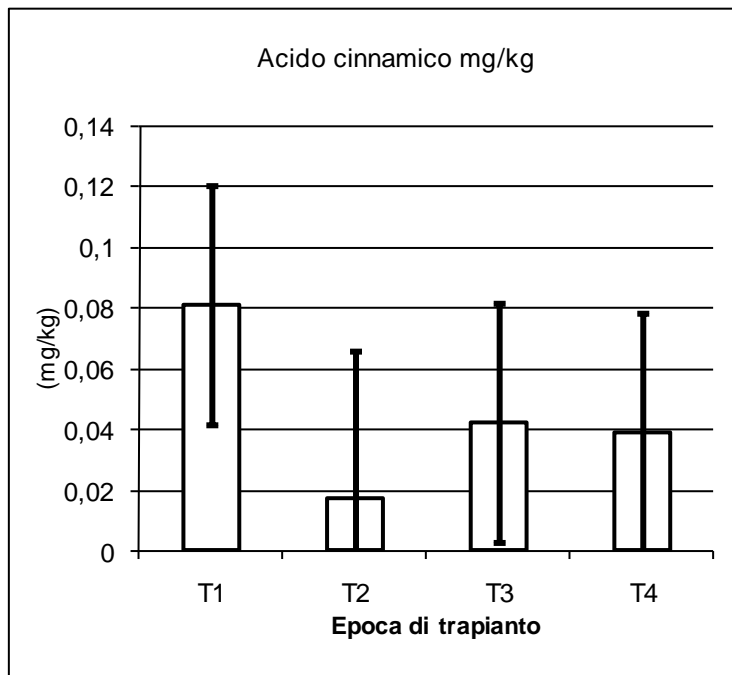


Figura 40: Variazione nel contenuto di acido cinnamico in relazione all'epoca di trapianto.

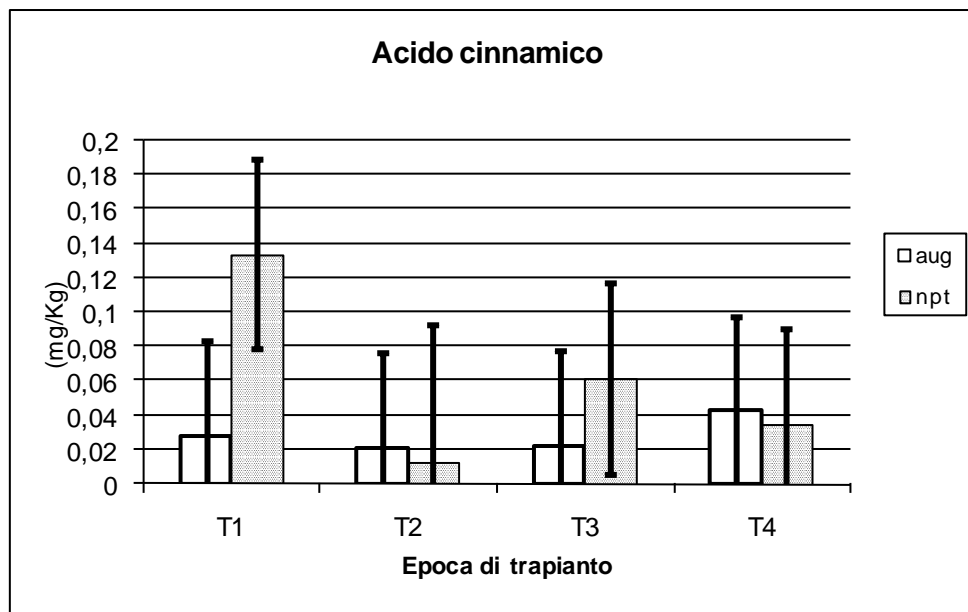


Figura 41: Variazione del contenuto di acido cinnamico in relazione all'epoca di trapianto e alla varietà.

Naringenina

Secondo l'analisi della varianza (Tabella 13) nessuno dei fattori studiati è statisticamente significativo. I valori apparentemente più elevati sono stati riscontrati nella varietà NPT, nella tesi pacciamata e nell'epoca T1 (Figura 42, 43 e 44).

SORGENTE	DEVIANZA	GL	VARIANZA	RAPP-F	PROBABILITA'
EFFETTI PRINCIPALI					
TOTALE	0.446469	45			
Blocchi	0.0246231	2	0.0123116	1.30	0.2884
Varieta	0.0230081	1	0.0230081	2.43	0.1303
Epoca	0.0286739	3	0.00955798	1.01	0.4033
Pacciamatura	0.00376774	1	0.00376774	0.40	0.5333
INTERAZIONI					
Varieta*epoca	0.0393933	3	0.0131311	1.39	0.2673
Varieta *pacciamatura	0.0191724	1	0.0191724	2.02	0.1658
Epoca*pacciamatura	0.0080813	3	0.00269377	0.28	0.8362
Varieta*epoca*pacciamatura	0.0244614	3	0.0081538	0.86	0.4727
ERRORE	0.265137	28	0.00946919		

Tabella 13: Analisi della varianza per la naringenina (i valori significativi sono in grassetto).

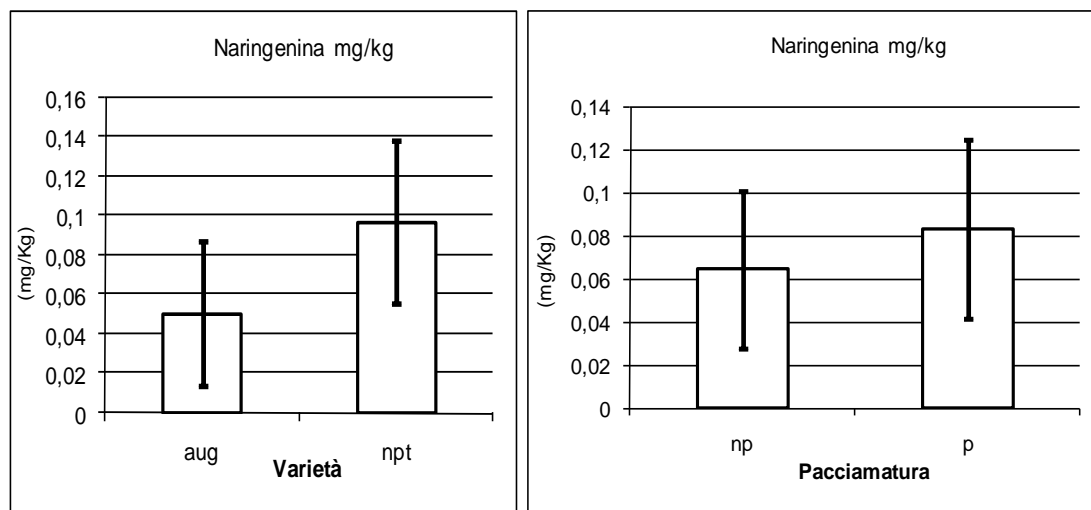


Figura 42: Variazione del contenuto di naringenina in relazione alla varietà e alla pacciamatura.

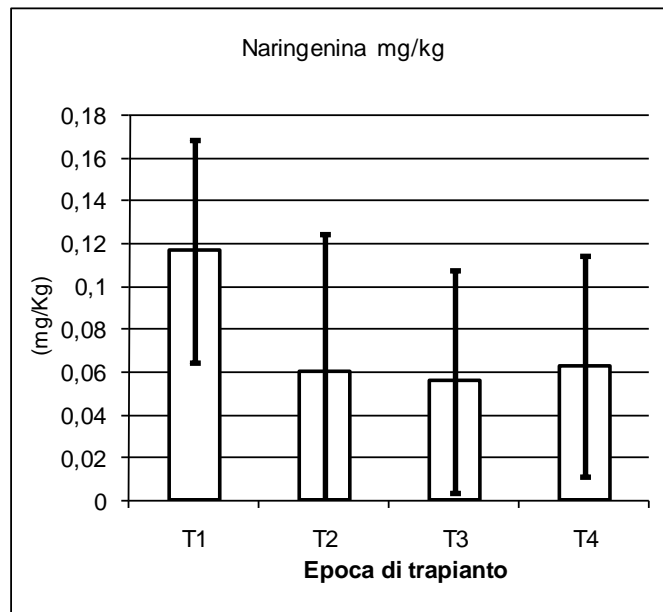


Figura 43: Variazione nel contenuto di naringenina in relazione all'epoca di trapianto.

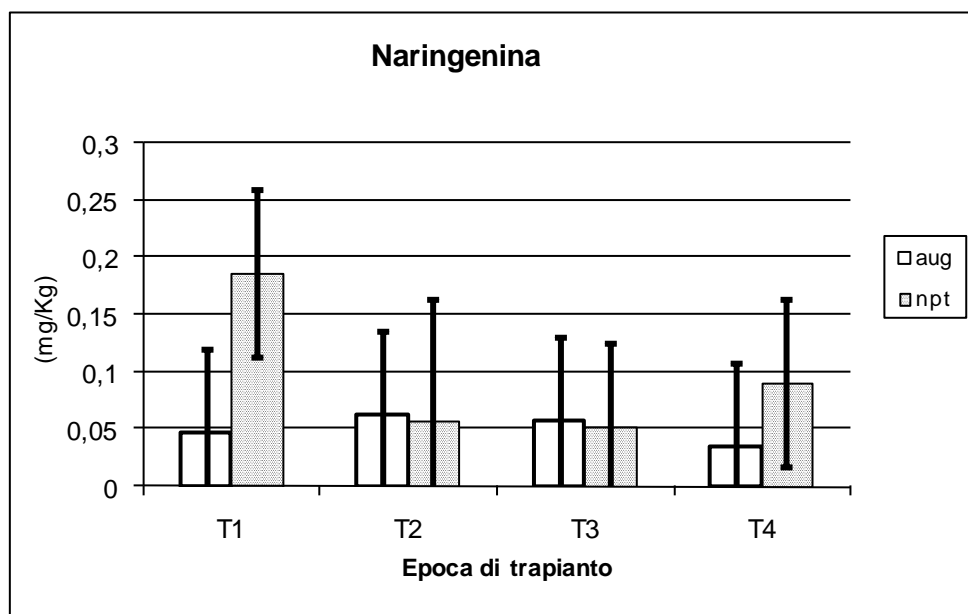


Figura 44: Variazione del contenuto di naringenina in relazione all'epoca di trapianto e alla varietà.

Rutina

Come si può notare dall'analisi della varianza (Tabella 14) l'unico effetto statisticamente significativo corrisponde alla pacciamatura con valori più alti nel non pacciamato rispetto al pacciamato. Per quanto riguarda gli altri fattori e le loro interazioni non ci sono differenze statisticamente significative ma i valori apparentemente più elevati sono stati riscontrati nella varietà AUG e nella seconda epoca di trapianto (Figure 45, 46 e 47).

SORGENTE	DEVIANZA	GL	VARIANZA	RAPP-F	PROBABILITA'
EFFETTI PRINCIPALI					
TOTALE	11.6106	45			
Blocchi	0.500887	2	0.250444	1.34	0.2775
Varietà	0.0649319	1	0.0649319	0.35	0.5600
Epoca	0.676916	3	0.225639	1.21	0.3245
Pacciamatura	1.38225	1	1.38225	7.41	0.0110
INTERAZIONI					
Varietà*epoca	0.370414	3	0.123471	0.66	0.5825
Varietà *pacciamatura	0.00404675	1	0.00404675	0.02	0.8840
Epoca*pacciamatura	1.44442	3	0.481473	2.58	0.0734
Varietà*epoca*pacciamatura	1.45807	3	0.486025	2.60	0.0715
ERRORE	5.22416	28	0.186577		

Tabella 14: Analisi della varianza per la rutina (i valori significativi sono in grassetto).

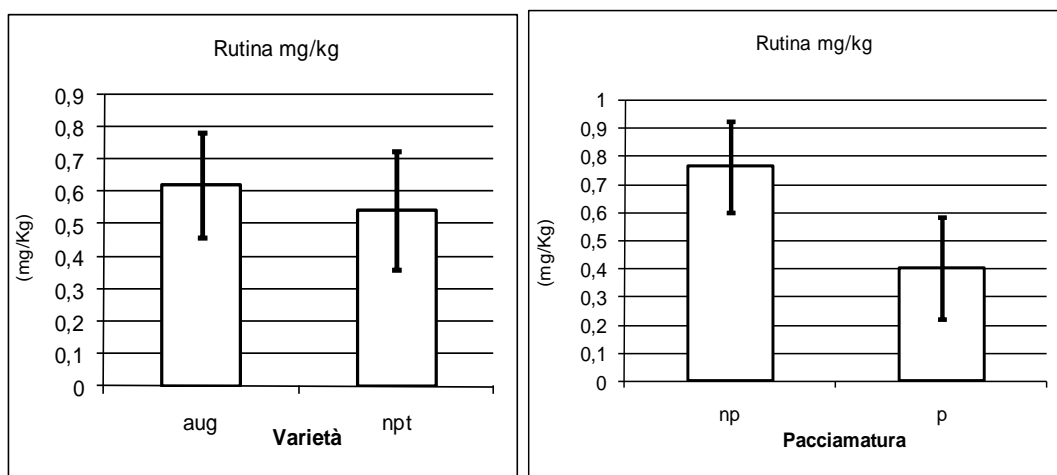


Figura 45: Variazione del contenuto di rutina in relazione alla varietà e alla pacciamatura.

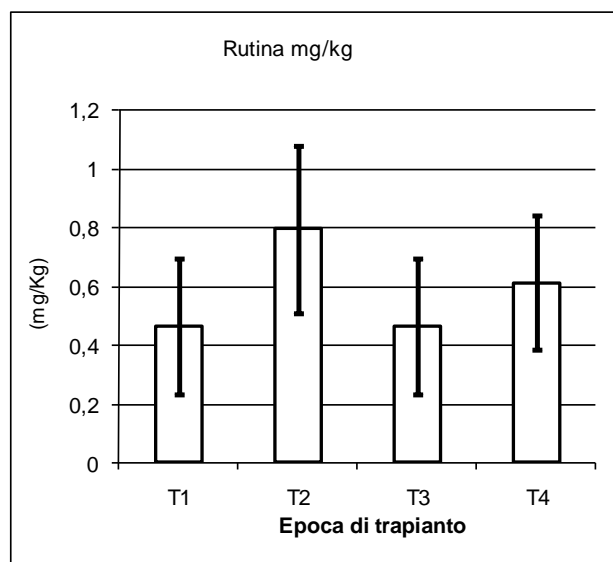


Figura 46: Variazione nel contenuto di rutina in relazione all'epoca di trapianto.

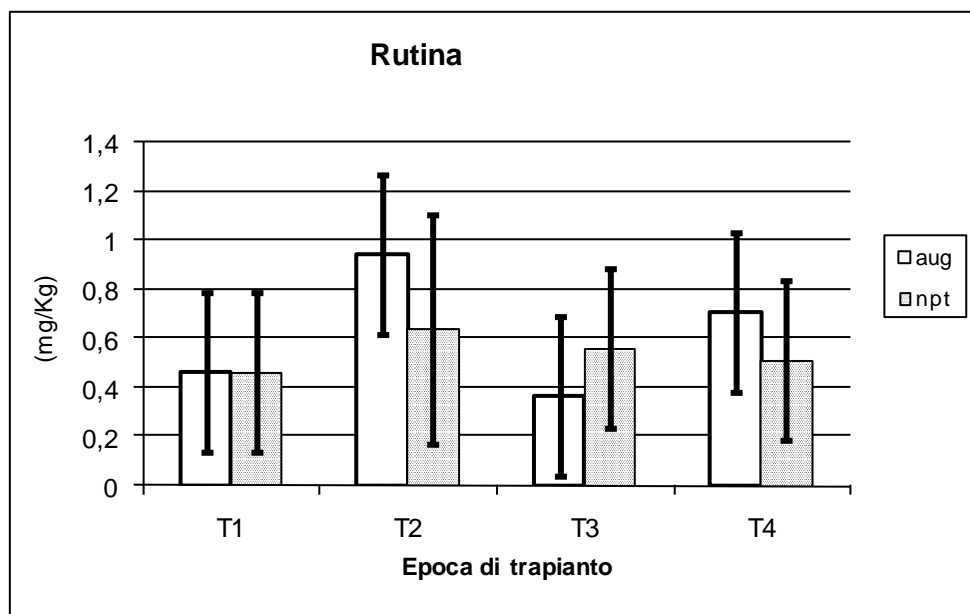


Figura 47: Variazione del contenuto di rutina in relazione all'epoca di trapianto e alla varietà.

4.5 Licopene e β -carotene

β -carotene rapportato al peso secco

L'analisi della varianza del β -carotene (Tabella 15) indica che tutti i fattori studiati sono statisticamente significativi. La sua concentrazione risulta maggiore nella varietà AUG coltivata senza pacciamatura (Figura 48 e 49) e nelle epoche di trapianto T3 e T4 (Figura 49). Inoltre risulta significativa l'interazione "epoca*varietà", che vede al variare dell'epoca una concentrazione di β -carotene costante in NPT e crescente in AUG.

SORGENTE	DEVIANZA	G.L	VARIANZA	RAPP. F	PROBABILITA'
EFFETTI PRINCIPALI					
TOTALE	137921,	44			
Blocchi	296,257	2	148,129	0,30	0,7450
Varietà	78867,3	1	78867,3	158,42	0,0000
Epoca	21606,8	3	7202,26	14,47	0,0000
Pacciamatura	4443,28	1	4443,28	8,92	0,0059
INTERAZIONI					
Varietà*epoca	9212,22	3	3070,74	6,17	0,0025
Varietà *pacciamatura	1237,72	1	1237,72	2,49	0,1265
Epoca*pacciamatura	927,715	3	309,238	0,62	0,6074
Varietà*epoca*pacciamatura	1371,06	3	457,02	0,92	0,4454
ERRORE	13441,9	27	497,849		

Tabella 15: Analisi della varianza per il contenuto di β -carotene rapportato al peso secco (i valori significativi sono in grassetto).

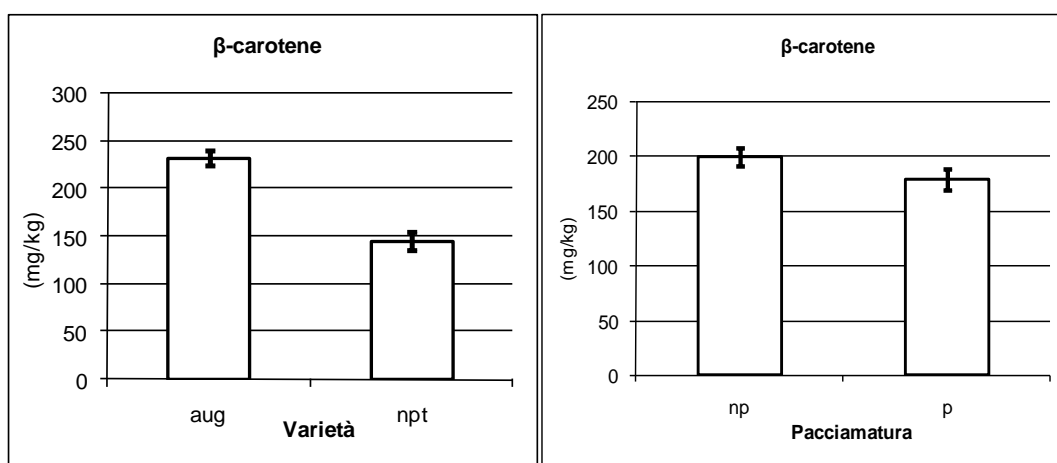


Figura 48: Variazione del contenuto di β -carotene in relazione alla varietà e alla pacciamatura.

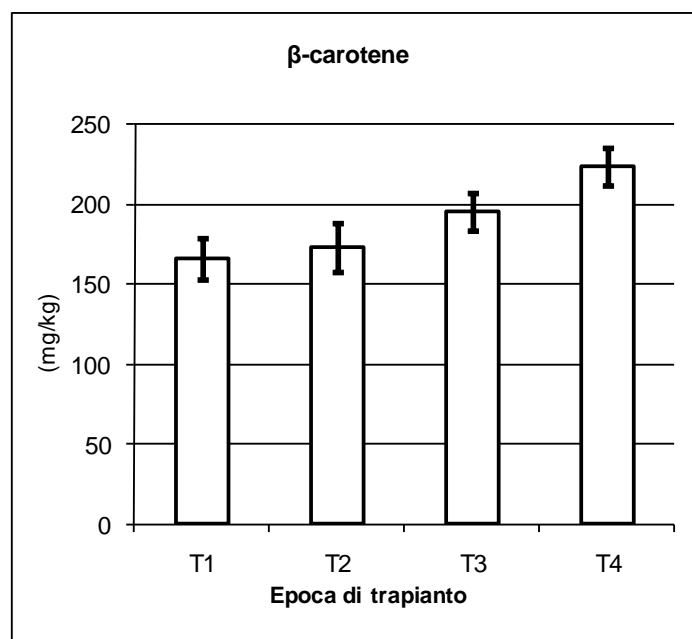


Figura 49: Variazione nel contenuto di β-carotene in relazione all'epoca di trapianto.

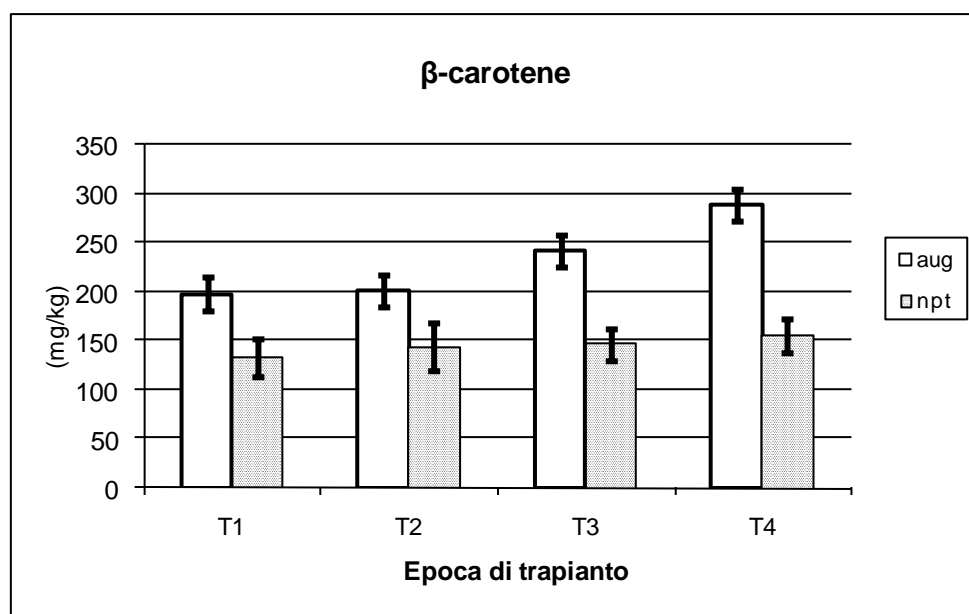


Figura 50: Variazione del contenuto di β-carotene in relazione all'epoca di trapianto e alla varietà.

Licopene rapportato al peso secco

L'analisi della varianza del licopene (Tabella 16) indica che tutti i fattori studiati sono statisticamente significativi e come per il β -carotene la sua concentrazione è maggiore nella varietà AUG, nella non pacciamatura e nell'epoca di trapianto T4 (Figure 51, 52 e 53). Inoltre risulta significativa l'interazione "epoca*varietà", che vede al variare dell'epoca una concentrazione di licopene costante in NPT e crescente in AUG.

SORGENTE	DEVIANZA	G.L	VARIANZA	RAPP. F	PROBABILITA'
EFFETTI PRINCIPALI					
TOTALE	4,47625E6	44			
Blocchi	3900,75	2	1950,38	0,08	0,9192
Varietà	1,71219E6	1	1,71219E6	74,18	0,0000
Epoca	1,5179E6	3	505968,	21,92	0,0000
Pacciamatura	145922,	1	145922,	6,32	0,0182
INTERAZIONI					
Varietà*epoca	213190,	3	71063,3	3,08	0,0443
Varierà *pacciamatura	24230,5	1	24230,5	1,05	0,3146
Epoca*pacciamatura	43383,9	3	14461,3	0,63	0,6041
Varietà*epoca*pacciamatura	37769,3	3	12589,8	0,55	0,6554
ERRORE	623166,	27	23080,2		

Tabella 16: Analisi della varianza per il licopene rapportato al peso secco (i valori significativi sono in grassetto).

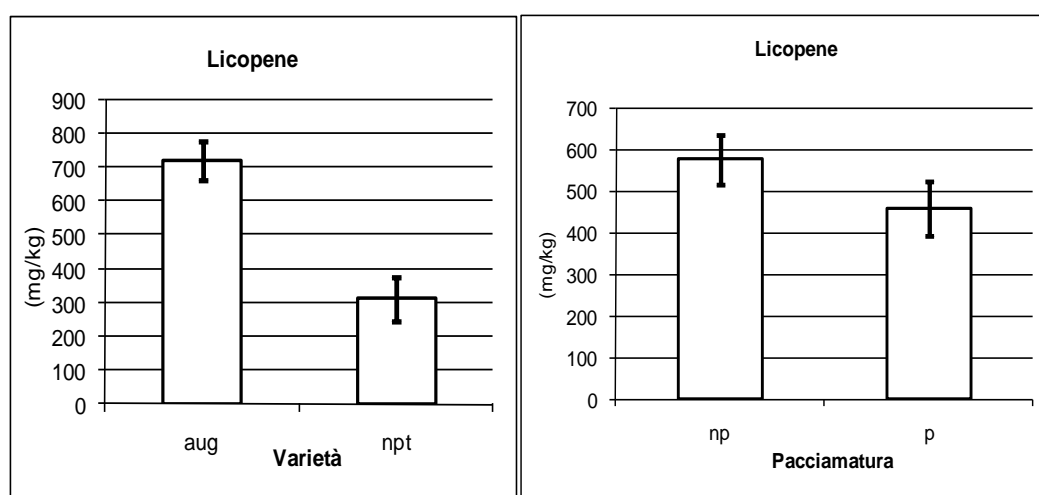


Figura 51: Variazione del contenuto di licopene in relazione alla varietà e alla pacciamatura.

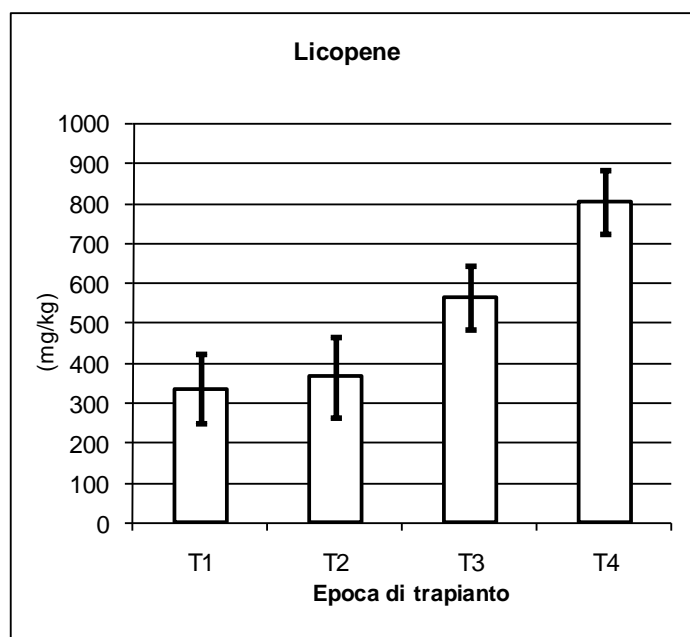


Figura 52: Variazione nel contenuto di licopene in relazione all'epoca di trapianto.

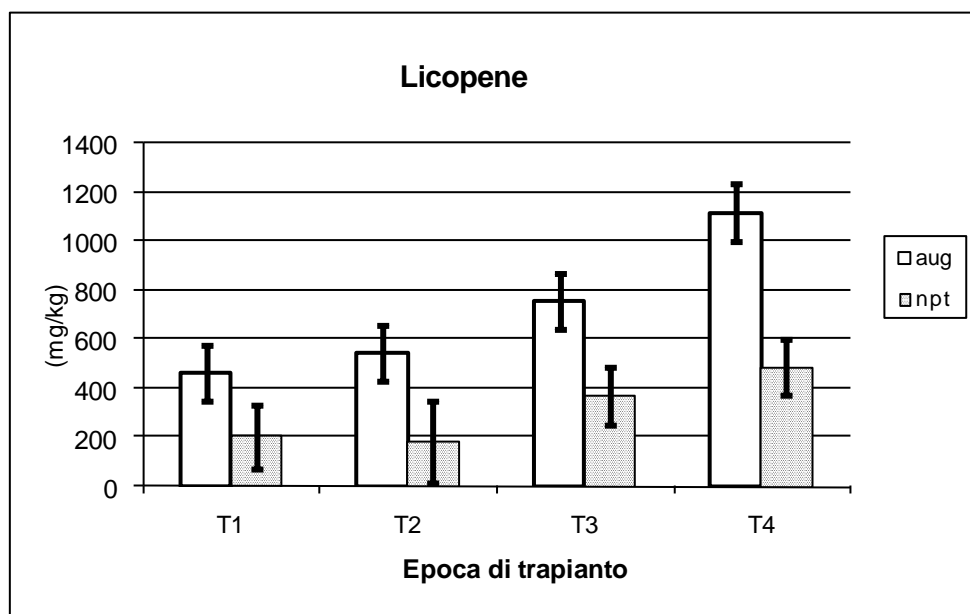


Figura 53: Variazione del contenuto di licopene in relazione all'epoca di trapianto e alla varietà.

β -carotene rapportato al peso fresco

Secondo l'analisi della varianza (Tabella 17) risultano statisticamente significativi i fattori varietà ed epoca di trapianto. La concentrazione del β -carotene è maggiore nella varietà AUG (Figura 54) e nell'epoca di trapianto T4 (Figure 55 e 56). Inoltre è apparentemente maggiore nella tecnica di pacciamata.

SORGENTE	DEVIANZA	GL	VARIANZA	RAPP-F	PROBABILITA'
EFFETTI PRINCIPALI					
TOTAL E	418.047	45			
Blocco	1.14244	2	0.571221	0.17	0.8460
Varietà	192.636	1	192.636	56.73	0.0000
Epoca	38.0732	3	12.6911	3.74	0.0224
Pacciamatura	2.89591	1	2.89591	0.85	0.3636
INTERAZIONI					
Varietà* epoca	22.0711	3	7.35704	2.17	0.1143
Varietà *pacciamatura	5.47368	1	5.47368	1.61	0.2147
Epoca *pacciamatura	23.0614	3	7.68713	2.26	0.1029
Varietà*epoca*pacciamtura	13.1796	3	4.39321	1.29	0.2959
ERRORE	95.0733	28	3.39548		

Tabella 17: Analisi della varianza per il contenuto di β -carotene rapportato al peso fresco (i valori significativi sono in grassetto).

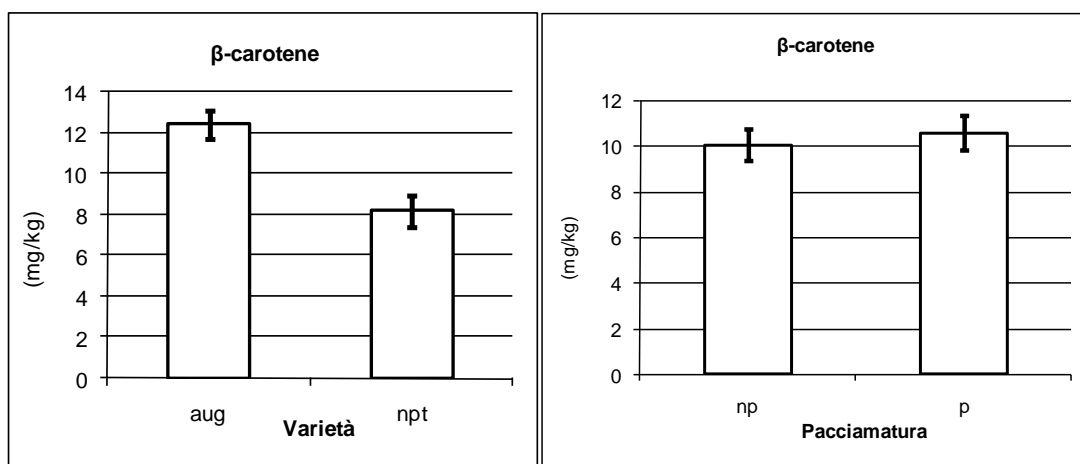


Figura 54: Variazione del contenuto di β -carotene in relazione alla varietà e alla pacciamatura.

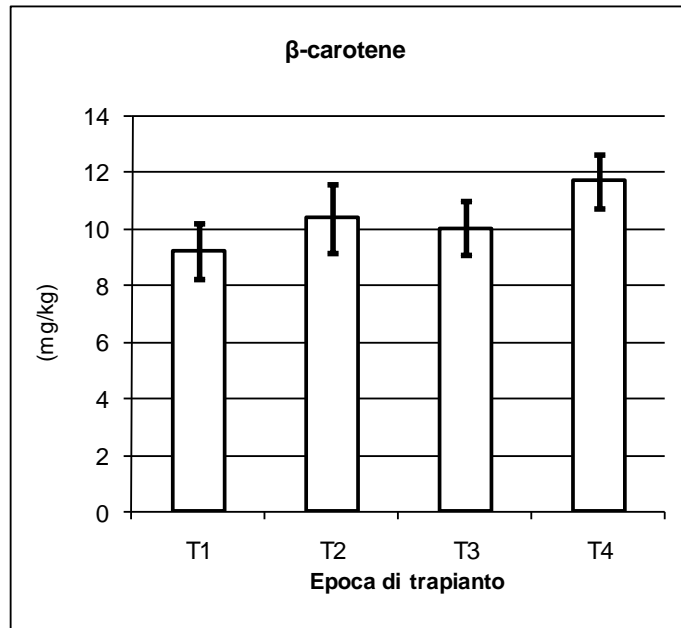


Figura 55: Variazione nel contenuto di β -carotene in relazione all'epoca di trapianto.

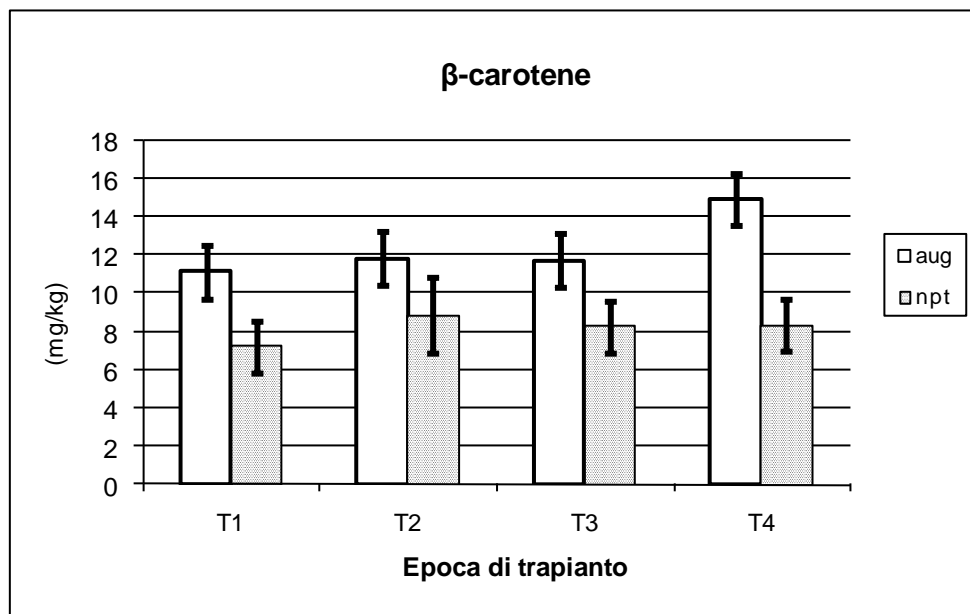


Figura 56: Variazione del contenuto di β -carotene in relazione all'epoca di trapianto e alla varietà.

Licopene rapportato al peso fresco

Secondo l'analisi della varianza (Tabella 18) risultano statisticamente significativi i fattori varietà, epoca di trapianto e l'interazione "varietà * epoca". Il licopene è maggiormente presente nella varietà AUG, (Figura 57) e nell'epoca di trapianto T4 (Figure 58 e 59) mentre risulta apparentemente più elevato nella coltivazione senza pacciamatura. Inoltre risulta significativa l'interazione "epoca*varietà", che vede al variare dell'epoca una concentrazione di licopene costante in NPT e crescente in AUG.

SORGENTE	DEVIANZA	G.L	VARIANZA	RAPP. F	PROBABILITA'
EFFETTI PRINCIPALI					
TOTALE	10363,8	44			
Blocchi	56,1228	2	28,0614	0,54	0,5879
Varietà	4196,95	1	4196,95	81,02	0,0000
Epoca	3380,38	3	1126,79	21,75	0,0000
Pacciamatura	138,467	1	138,467	2,67	0,1137
INTERAZIONI					
Varietà*epoca	582,993	3	194,331	3,75	0,0226
Varierà *pacciamatura	36,5679	1	36,5679	0,71	0,4082
Epoca*pacciamatura	176,644	3	58,8815	1,14	0,3519
Varietà*epoca*pacciamatura	60,1088	3	20,0363	0,39	0,7634
ERRORE	1398,65	27	51,8018		

Tabella18: Analisi della varianza per il contenuto di licopene rapportato al peso fresco (i valori significativi sono in grassetto).

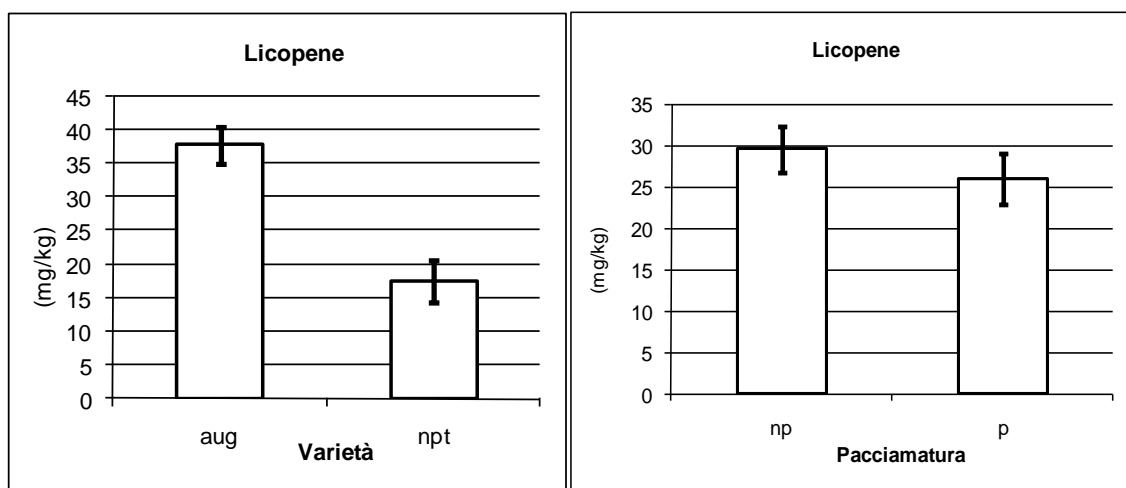


Figura 57: Variazione del contenuto di licopene in relazione alla varietà e alla pacciamatura.

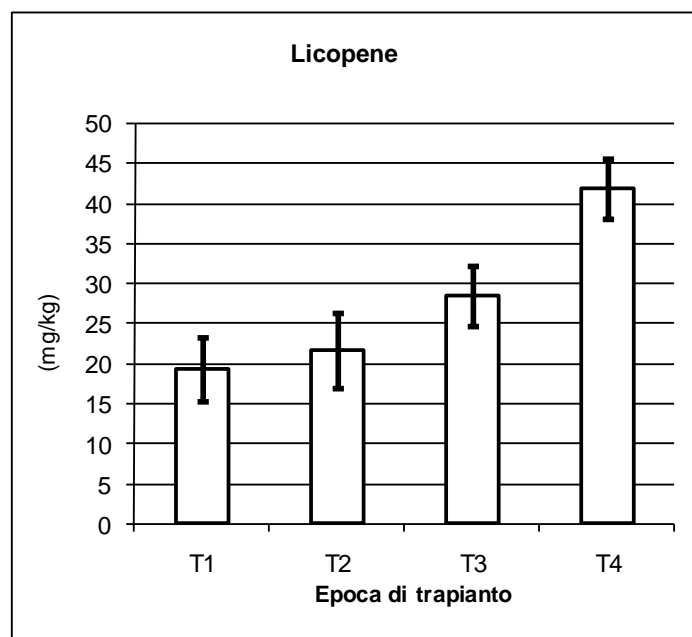


Figura 58: Variazione nel contenuto di licopene in relazione all'epoca di trapianto.

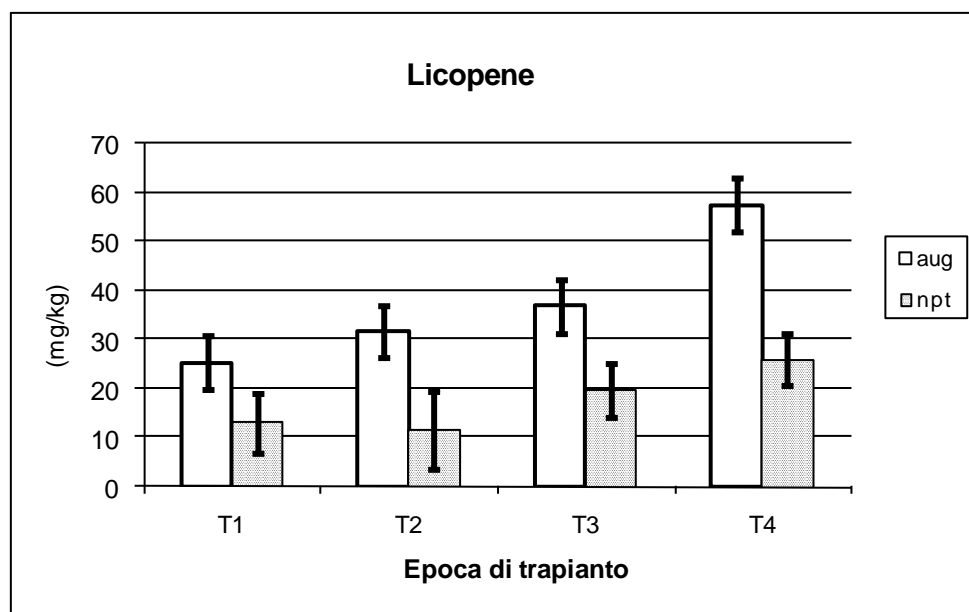


Figura 59: Variazione del contenuto di licopene in relazione all'epoca di trapianto e alla varietà.

4.6 Licopene e β -carotene estratti con SFE

β -carotene rapportato al peso secco

Secondo l'analisi della varianza (Tabelle 19) il fattore statisticamente significativo è la varietà. Il quantitativo di β -carotene è maggiore nella varietà AUG (Figure 60, 61 e 62).

SORGENTE	DEVIANZA	G.L	VARIANZA	RAPP. F	PROBABILITA'
EFFETTI PRINCIPALI					
TOTALE	237,071	15			
Varieta	121,829	1	121,829	26,74	0,0140
EPOCA	36,6604	3	12,2201	2,68	0,2196
Pacciamatura	1,72978	1	1,72978	0,38	0,5814
INTERAZIONI					
Varietà*epoca	49,5016	3	16,5005	3,62	0,1593
Varietà*pacciamatura	5,29726	1	5,29726	1,16	0,3599
Epoca*pacciamatura	8,38586	3	2,79529	0,61	0,6510
ERRORE	13,667	3	4,55565		

Tabella 19: Analisi della varianza per il β -carotene estratto in SFE rapportato al peso secco (i valori significativi sono in grassetto).

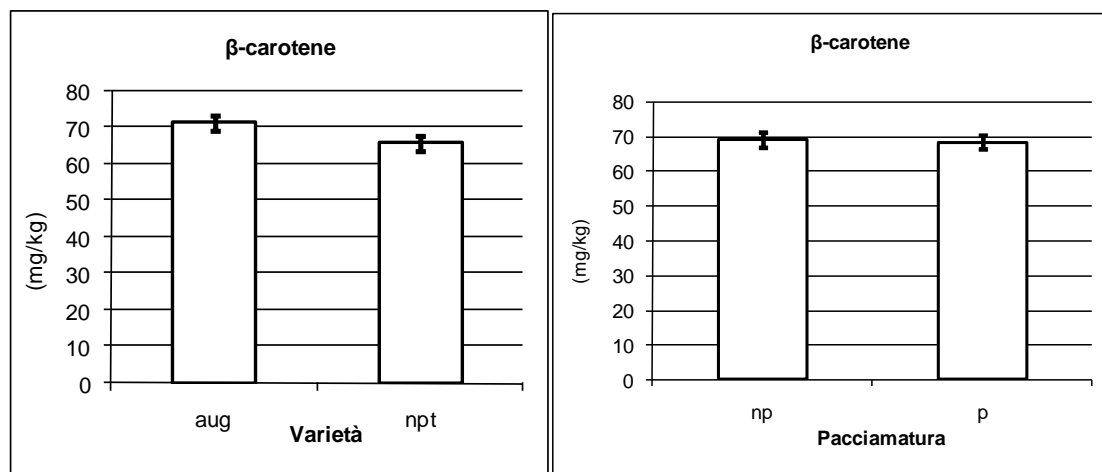


Figura 60: Variazione del contenuto di β -carotene in relazione alla varietà e alla pacciamatura.

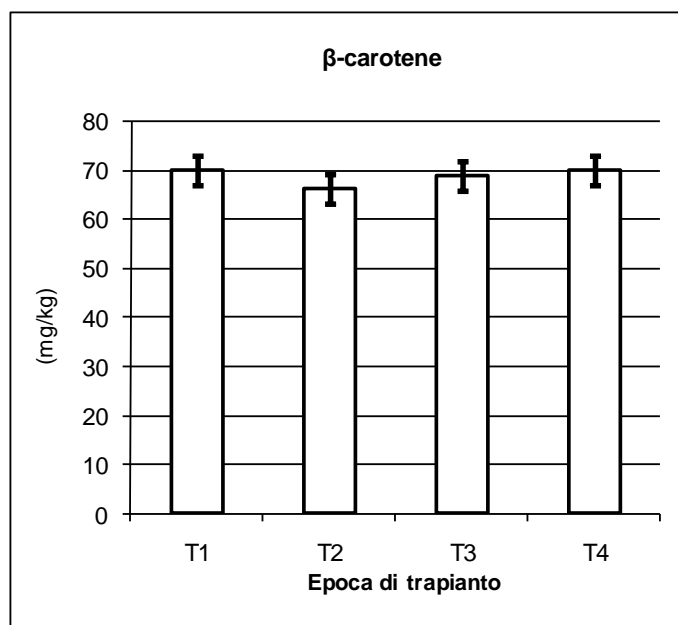


Figura 61: Variazione nel contenuto di β-carotene in relazione all'epoca di trapianto.

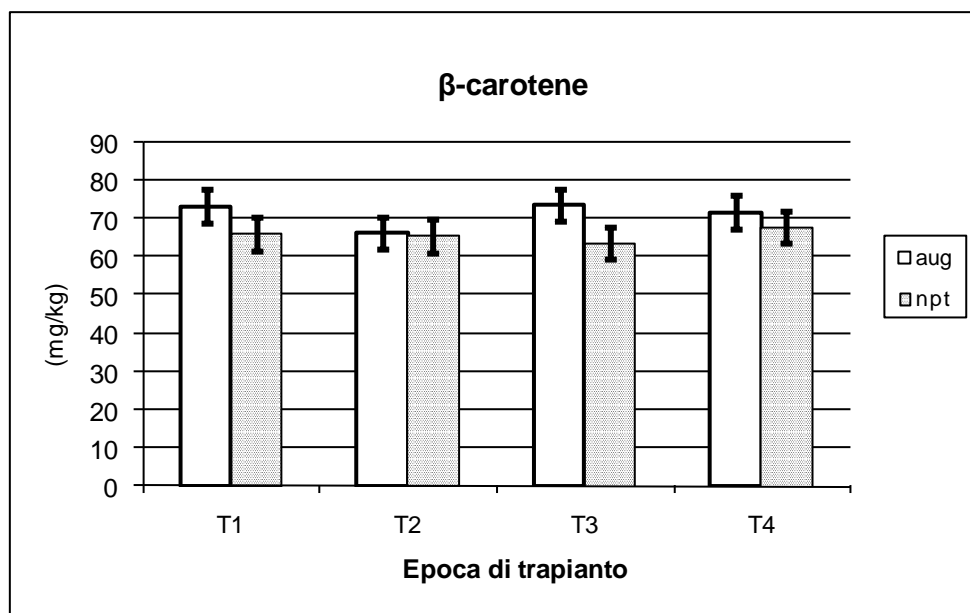


Figura 62: Variazione del contenuto di β-carotene in relazione all'epoca di trapianto e alla varietà.

Licopene rapportato al peso secco

Secondo l'analisi della varianza (Tabella 20) tutti i fattori studiati e le loro interazioni risultano statisticamente significative. Il quantitativo di licopene è maggiore nella varietà AUG, nel testimone non pacciamato (Figura 63) e nelle epoche di trapianto T1, T3 e T4 (Figure 64 e 65).

SORGENTE	DEVIANZA	G.L	VARIANZA	RAPP. F	PROBABILITA'
EFFETTI PRINCIPALI					
TOTALE	5211,21	15			
Varieta	2761,12	1	2761,12	560,95	0,0002
EPOCA	746,217	3	248,739	50,53	0,0046
Pacciamatura	376,214	1	376,214	76,43	0,0032
INTERAZIONI					
Varieta*epoca	703,087	3	234,362	47,61	0,0050
Varieta*pacciamatura	144,584	1	144,584	29,37	0,0123
Epoca*pacciamatura	465,218	3	155,073	31,50	0,0091
ERRORE	14,7666	3	4,92219		

Tabella 20: Analisi della varianza per il licopene estratto in SFE rapportato al peso secco (i valori significativi sono in grassetto).

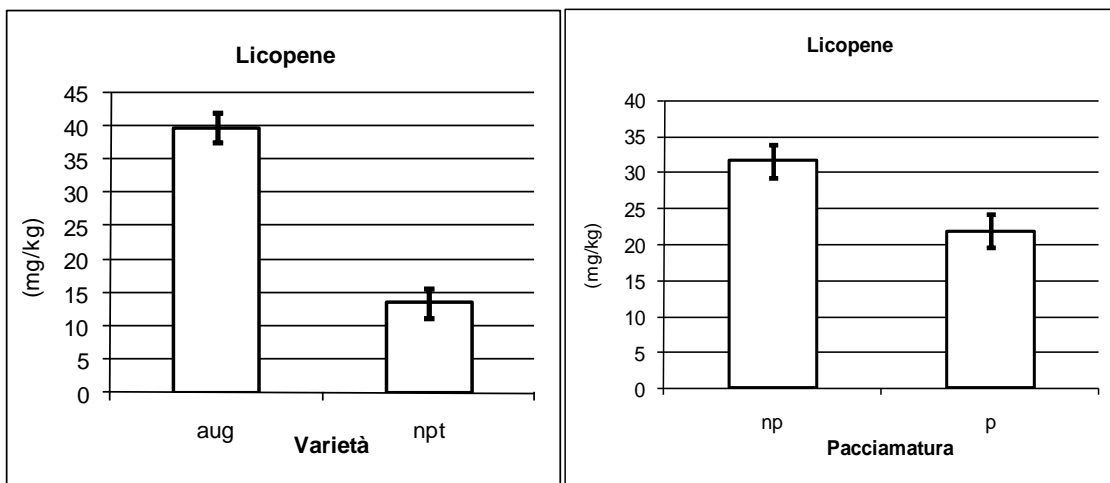


Figura 63: Variazione del contenuto di licopene in relazione alla varietà e alla pacciamatura.

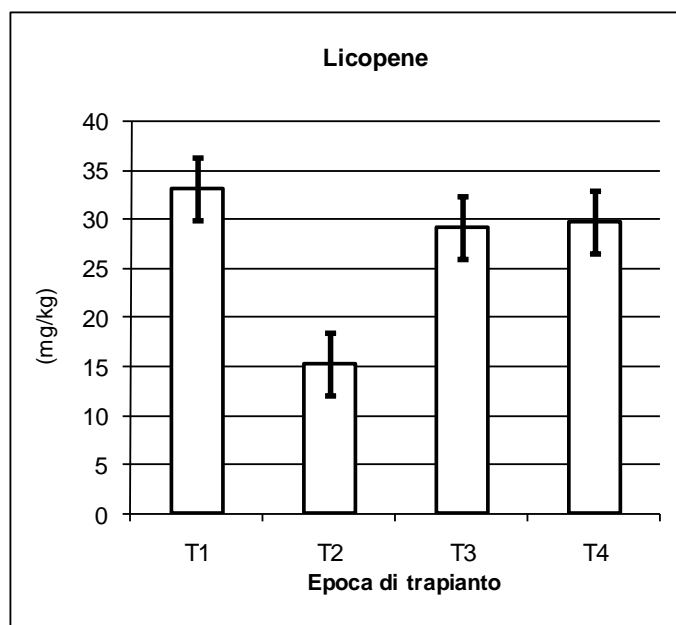


Figura 64: Variazione nel contenuto di licopene in relazione all'epoca di trapianto.

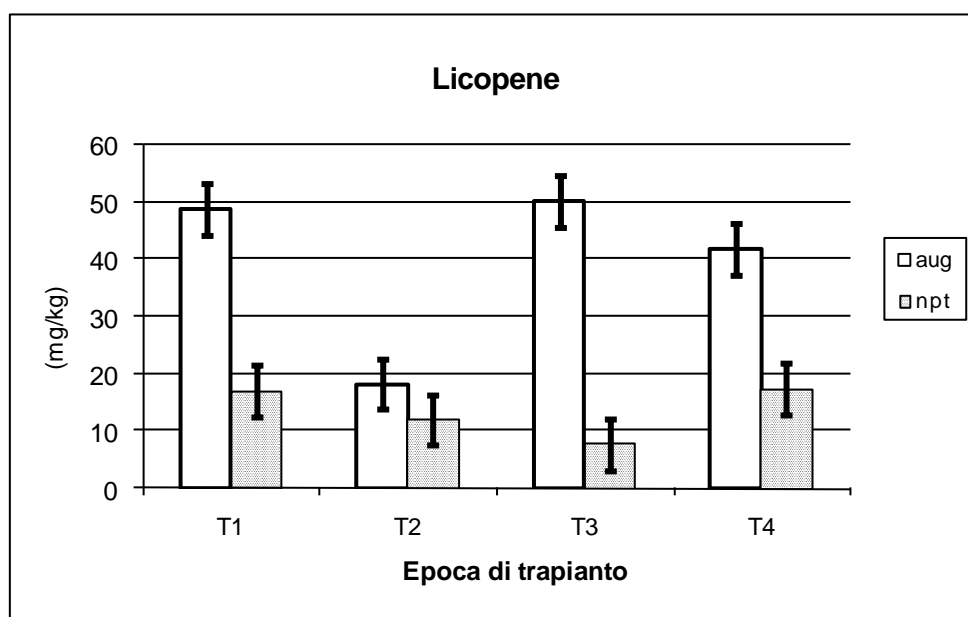


Figura 65: Variazione del contenuto di licopene in relazione all'epoca di trapianto e alla varietà.

β -carotene rapportato al peso fresco

Secondo l'analisi della varianza (Tabella 21) il fattore statisticamente significativo è la pacciamatura. Il quantitativo di β -carotene è maggiore nei pomodori coltivati con la tecnica della pacciamatura (Figura 66).

SORGENTE	DEVIANZA	G.L	VARIANZA	RAPP. F	PROBABILITA'
EFFETTI PRINCIPALI					
TOTALE	2,65614	15			
Varieta	0,000168259	1	0,000168259	0,00	0,9507
EPOCA	1,01598	3	0,338661	9,07	0,0515
Pacciamatura	1,22273	1	1,22273	32,74	0,0106
INTERAZIONI					
Varieta*epoca	0,0346191	3	0,0115397	0,31	0,8198
Varieta*pacciamatura	0,0639567	1	0,0639567	1,71	0,2819
Epoca*pacciamatura	0,206621	3	0,0688736	1,84	0,3139
ERRORE	0,112057	3	0,0373524		

Tabella 21: Analisi della varianza per il β -carotene estratto in SFE rapportato al peso fresco (i valori significativi sono in grassetto).

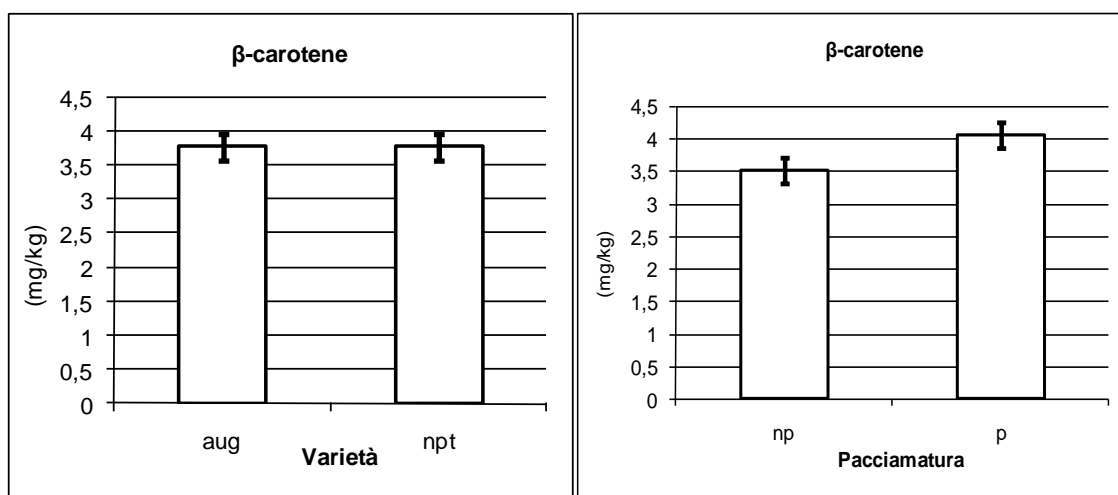


Figura 66: Variazione del contenuto di β -carotene in relazione alla varietà e alla pacciamatura.

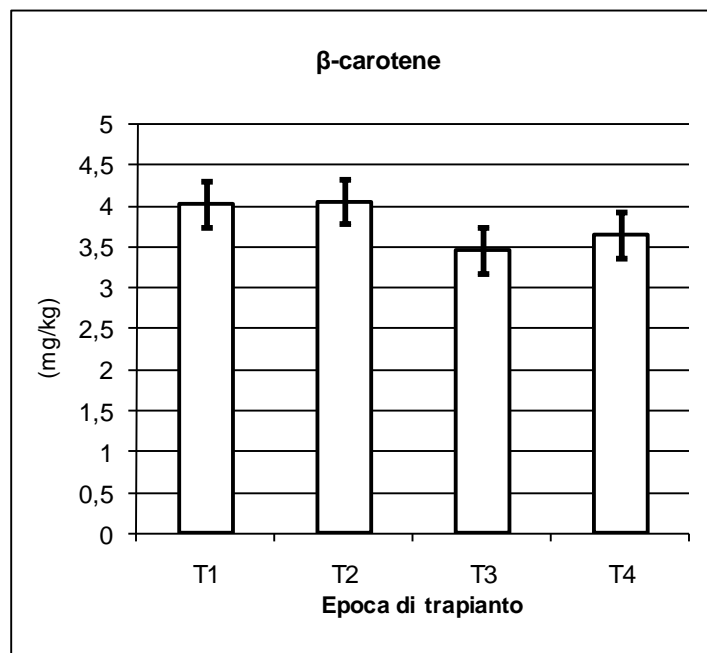


Figura 67: Variazione del contenuto di β-carotene in relazione all'epoca di trapianto.

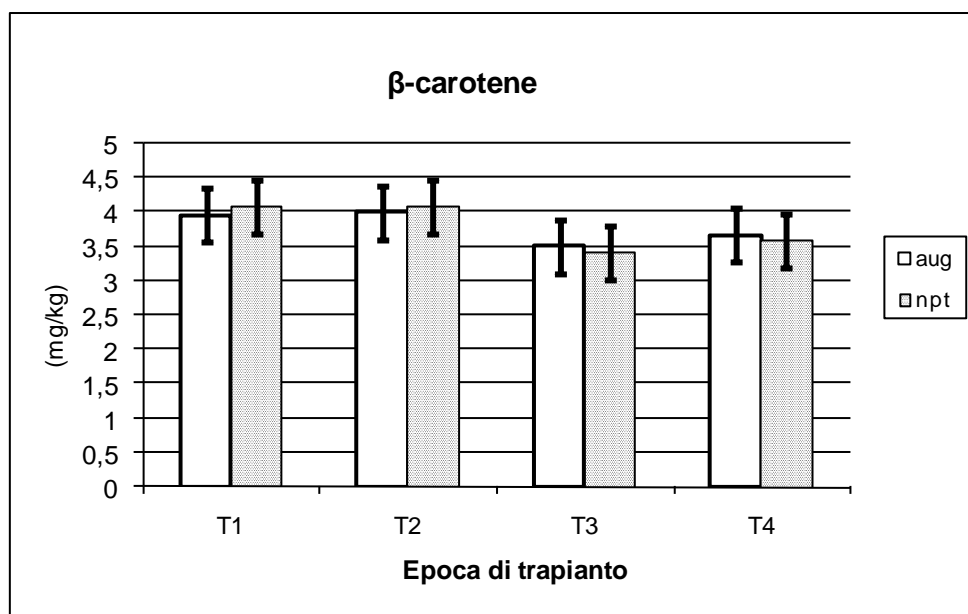


Figura 68: Variazione del contenuto di β-carotene in relazione all'epoca di trapianto e alla varietà.

Licopene rapportato al peso fresco

Secondo l'analisi della varianza (Tabella 22) i fattori studiati risultano tutti statisticamente significativi, inoltre anche le interazioni tra varietà ed epoca di trapianto e tra epoca di trapianto e pacciamatura risultano tali. La varietà AUG, il testimone non pacciamato e l'epoca di trapianto T1 risultano avere il quantitativo maggiore di licopene (Figure 69, 70 e 71).

SORGENTE	DEVIANZA	G.L	VARIANZA	RAPP. F	PROBABILITA'
EFFETTI PRINCIPALI					
TOTALE	11,4291	15			
Varieta	6,34294	1	6,34294	352,00	0,0003
EPOCA	1,61577	3	0,538591	29,89	0,0098
Pacciamatura	0,358816	1	0,358816	19,91	0,0210
INTERAZIONI					
Varietà*epoca	1,49153	3	0,497178	27,59	0,0110
Varietà*pacciamatura	0,11221	1	0,11221	6,23	0,0881
Epoca*pacciamatura	1,45372	3	0,484575	26,89	0,0114
ERRORE	0,0540595	3	0,0180198		

Tabella 22: Analisi della varianza per il licopene estratto in SFE rapportato al peso fresco (i valori significativi sono in grassetto).

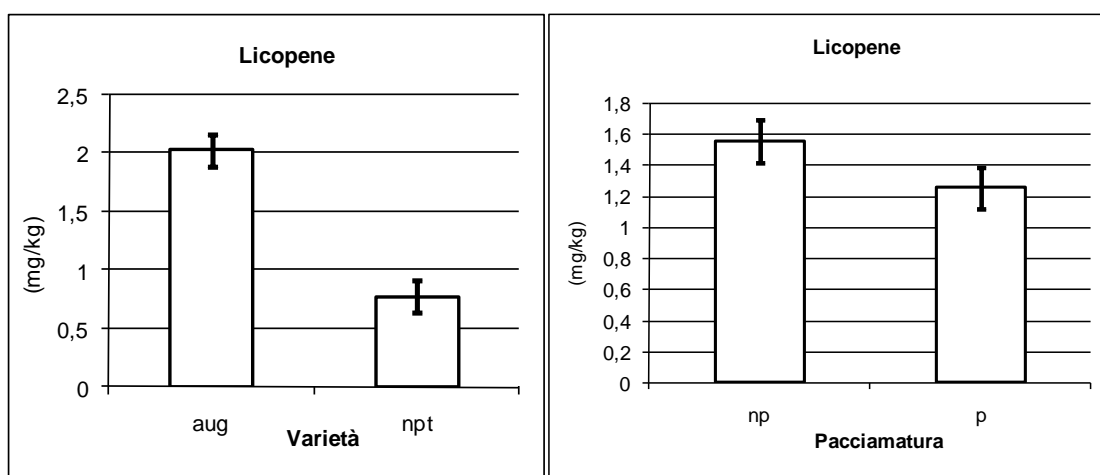


Figura 69: Variazione del contenuto di licopene in relazione alla varietà e alla pacciamatura.

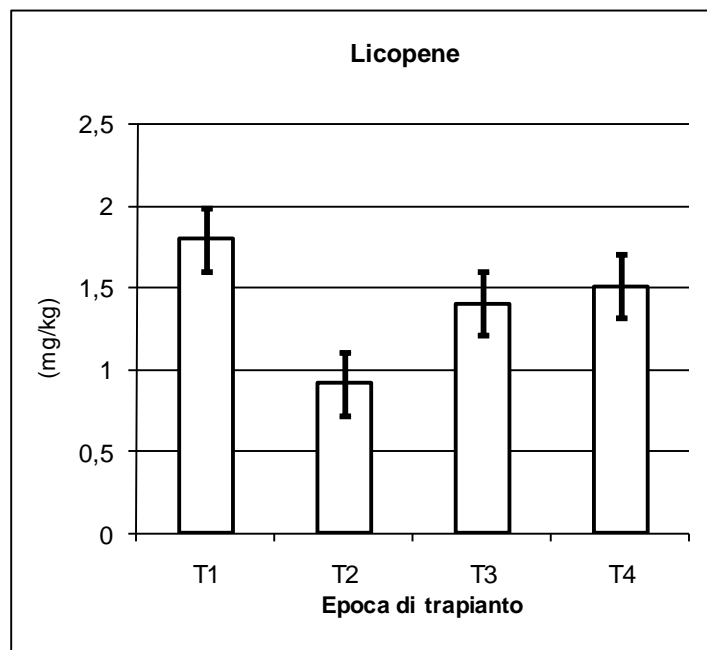


Figura 70: Variazione del contenuto di licopene in relazione all'epoca di trapianto.

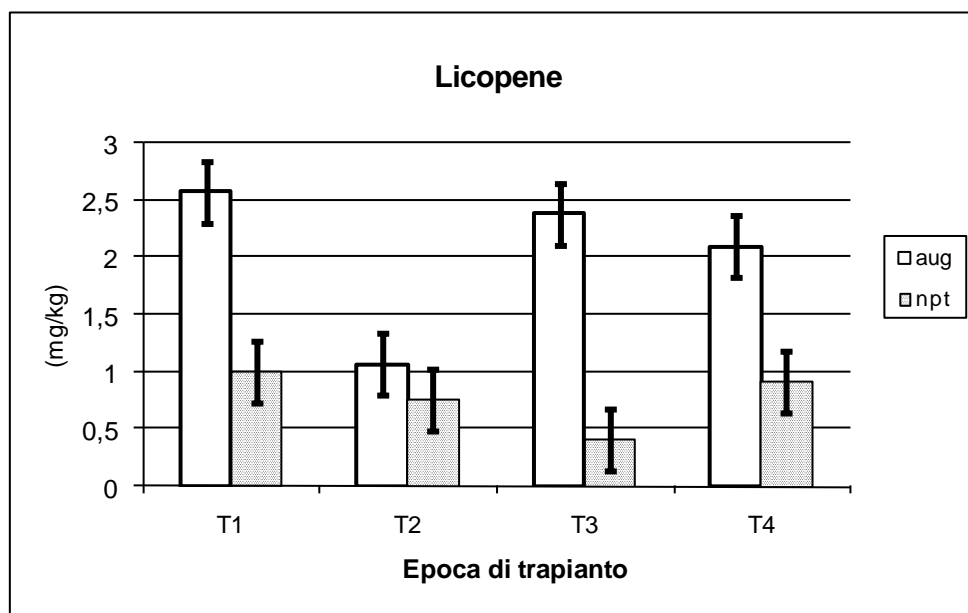


Figura 71: Variazione del contenuto di licopene in relazione all'epoca di trapianto e alla varietà.

4.7 Correlazione tra licopene e colore

Il colore è stato valutato prendendo in considerazione i parametri L, a, b. **L** indica la luminosità del campione e varia dal nero (0) al bianco (100); **a** indica il colore del campione nell'intervallo tra il verde e il rosso e **b** nell'intervallo tra il blu e il giallo.

Valore L

Secondo l'analisi della varianza (Tabella 23) risulta statisticamente significativo il fattore varietà. La luminosità è maggiore in AUG (Figura 72).

SORGENTE	DEVIANZA	G.L	VARIANZA	RAPP. F	P-Valori
EFFETTI PRINCIPALI					
TOTALE	574.246	45			
Blocchi	79.8771	2	39.9385	4.72	0.0171
Varietà	18.2909	1	18.2909	2.16	0.1527
Epoca	161.14	3	53.7135	6.35	0.0020
Pacciamatura	1.78858	1	1.78858	0.21	0.6493
INTERAZIONI					
Varietà*epoca	8.96905	3	2.98968	0.35	0.7872
Varietà *pacciamatura	0.294706	1	0.294706	0.03	0.8533
Epoca*pacciamatura	43.3073	3	14.4358	1.71	0.1886
Varietà*epoca*pacciamatura	1.77802	3	0.592672	0.07	0.9755
ERRORE	237.011	28	8.46467		

Tabella 23: Analisi della varianza per i valori di **L** ottenuti dall'analisi colorimetrica (i valori significativi sono in grassetto).

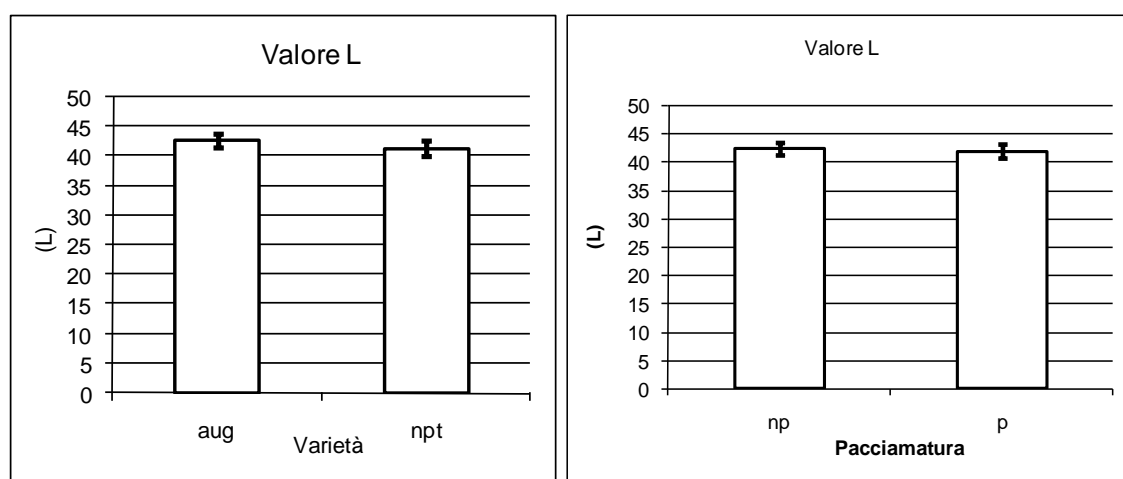


Figura 72: Variazione del contenuto del valore **L** in relazione alla varietà e alla pacciamatura.

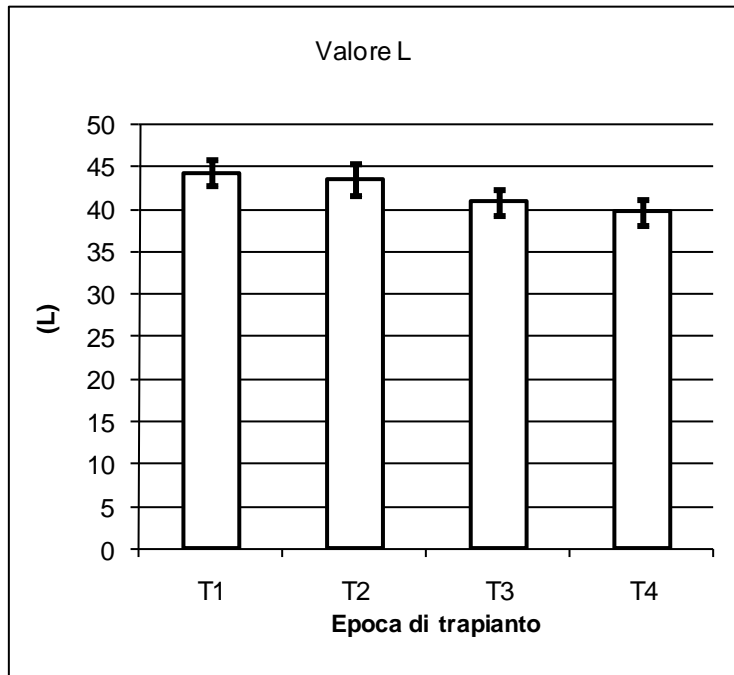


Figura 73: Variazione del valore **L** in relazione all'epoca di trapianto.

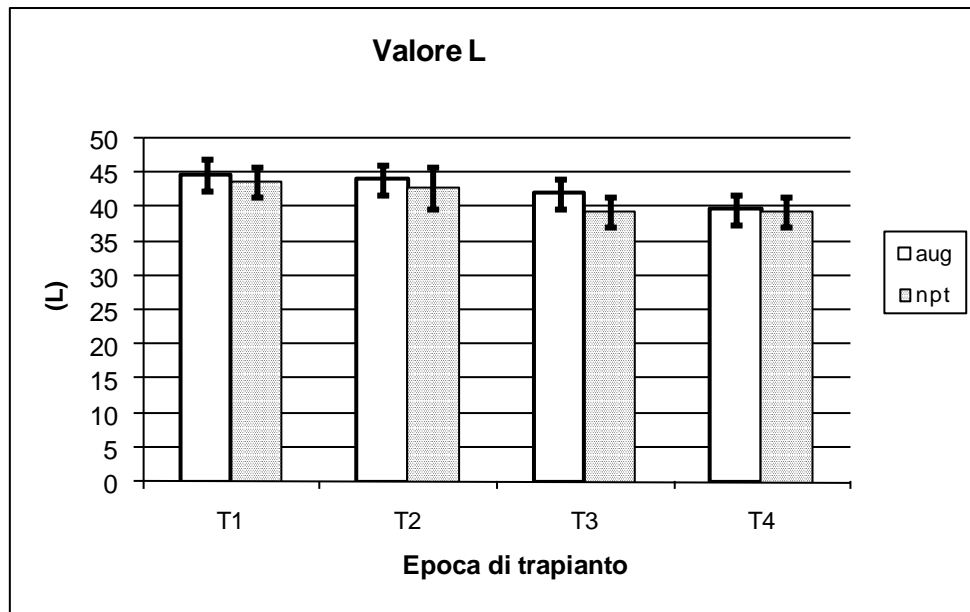


Figura 74: Variazione del valore **L** in relazione all'epoca di trapianto e alla varietà.

Valore a

Secondo l'analisi della varianza (Figura 24) i fattori statisticamente significativi sono l'epoca di trapianto e la pacciamatura. Questo valore è più elevato nei pomodori AUG e nella tesi pacciamata (Figura 75).

SORGENTE	DEVIANZA	G.L	VARIANZA	RAPP. F	P-Valori
EFFETTI PRINCIPALI					
TOTALE	636.126	45			
Blocchi	42.3702	2	21.1851	2.52	0.0984
Varietà	3.97188	1	3.97188	0.47	0.4974
Epoca	183.786	3	61.2618	7.29	0.0009
Pacciamatura	73.5615	1	73.5615	8.76	0.0062
INTERAZIONI					
Varietà*epoca	38.6795	3	12.8932	1.53	0.2273
Varietà *pacciamatura	9.75755	1	9.75755	1.16	0.2904
Epoca*pacciamatura	25.3288	3	8.44293	1.01	0.4052
Varietà*epoca*pacciamatura	14.2193	3	4.73977	0.56	0.6431
ERRORE	235.221	28	8.40074		

Tabella 24: Analisi della varianza per i valori di **a** ottenuti dall'analisi colorimetrica (i valori significativi sono in grassetto).

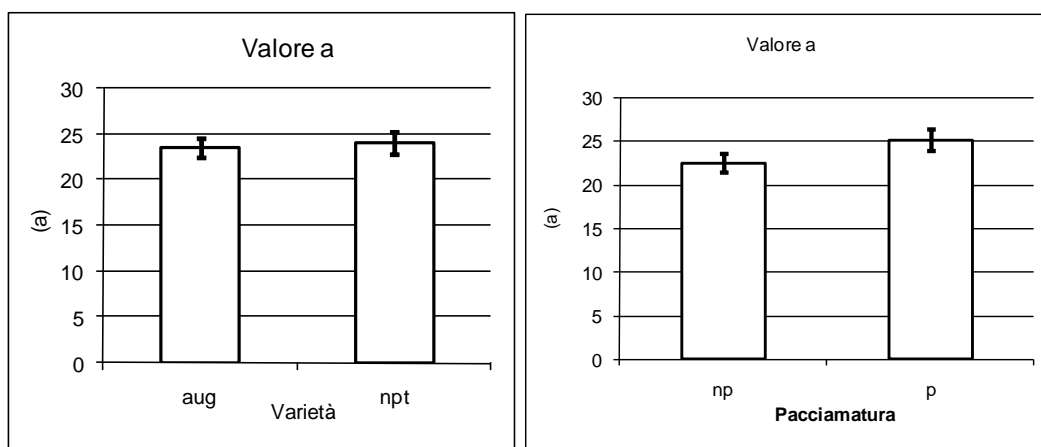


Figura 75: Variazione del contenuto del valore **a** in relazione alla varietà e alla pacciamatura,

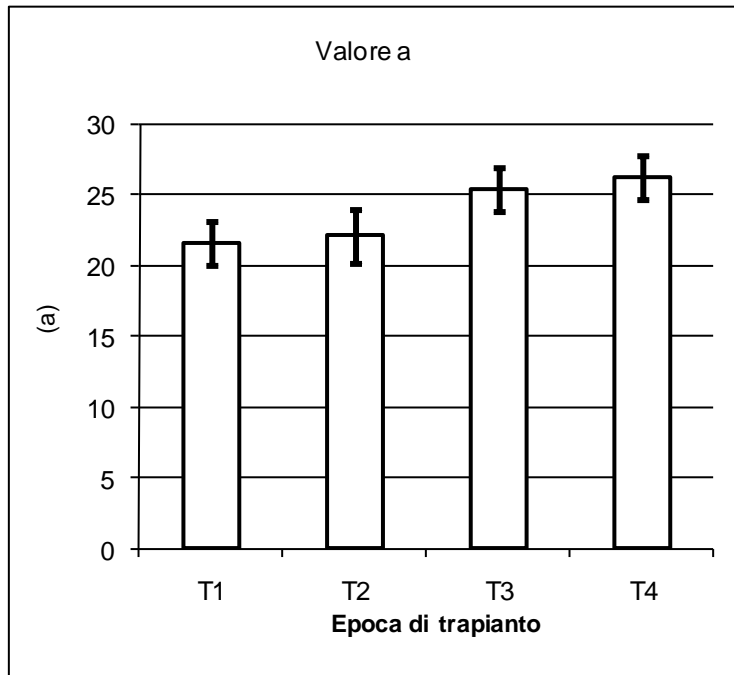


Figura 76: Variazione del valore **a** in relazione all'epoca di trapianto.

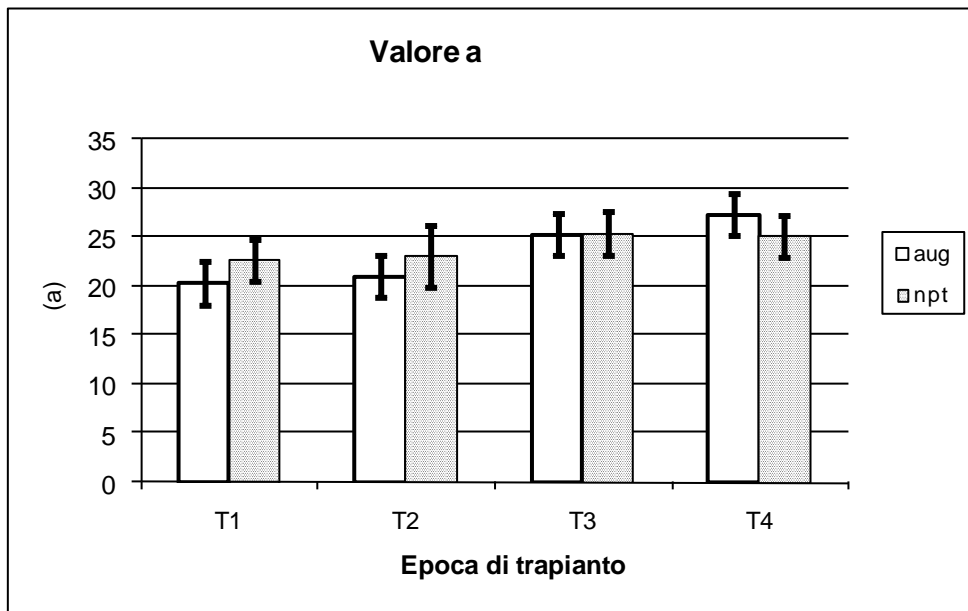


Figura 77: Variazione del valore **a** in relazione all'epoca di trapianto e alla varietà.

Valore b

Secondo l'analisi della varianza (Tabella 25) nessuno dei fattori risulta statisticamente significativo.

SORGENTE	DEVIANZA	G.L	VARIANZA	RAPP. F	P-Valori
EFFETTI PRINCIPALI					
TOTALE	1.13797	2	0.568987	0.06	0.9462
Blocchi	2.05843	1	2.05843	0.20	0.6578
Varietà	1.45587	3	0.485289	0.05	0.9861
Epoca	13.618	1	13.618	1.33	0.2592
Pacciamatura					
INTERAZIONI					
Varietà*epoca	0.0255089	1	0.0255089	0.00	0.9606
Varietà *pacciamatura	25.1338	3	8.37794	0.82	0.4959
Epoca*pacciamatura	15.8799	3	5.29329	0.52	0.6750
Varietà*epoca*pacciamatura	287.509	28	10.2682		
ERRORE	398.862	45			

Tabella 25: Analisi della varianza per i valori di **b** ottenuti dall'analisi colorimetrica (i valori significativi sono in grassetto).

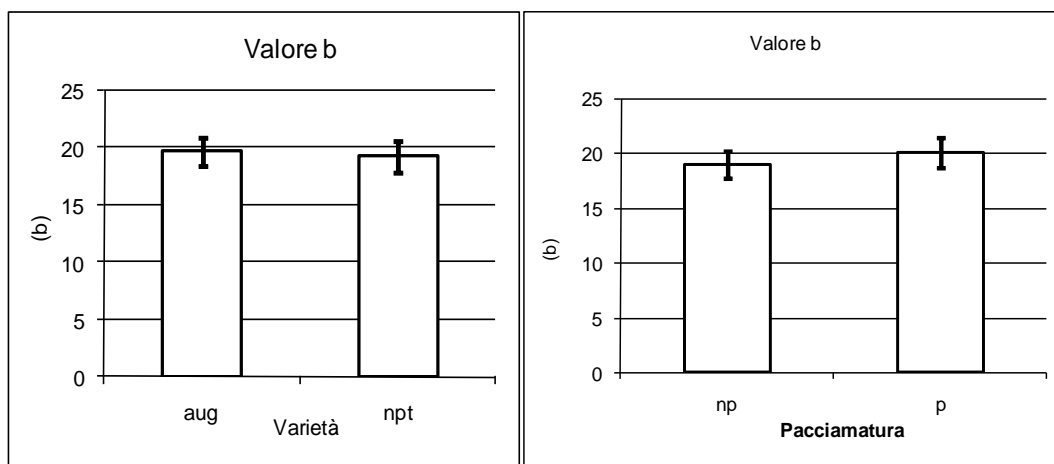


Figura 78: Variazione del contenuto del valore **b** in relazione alla varietà e alla pacciamatura.

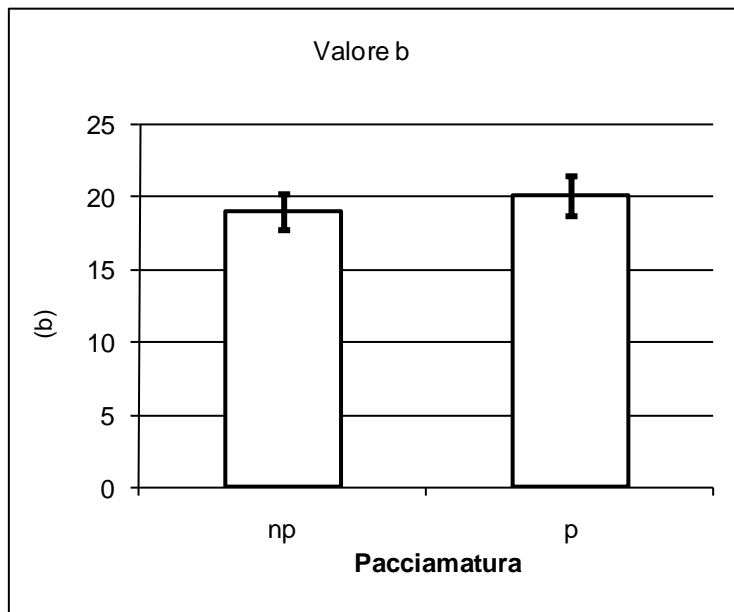


Figura 79: Variazione del valore **b** in relazione all'epoca di trapianto.

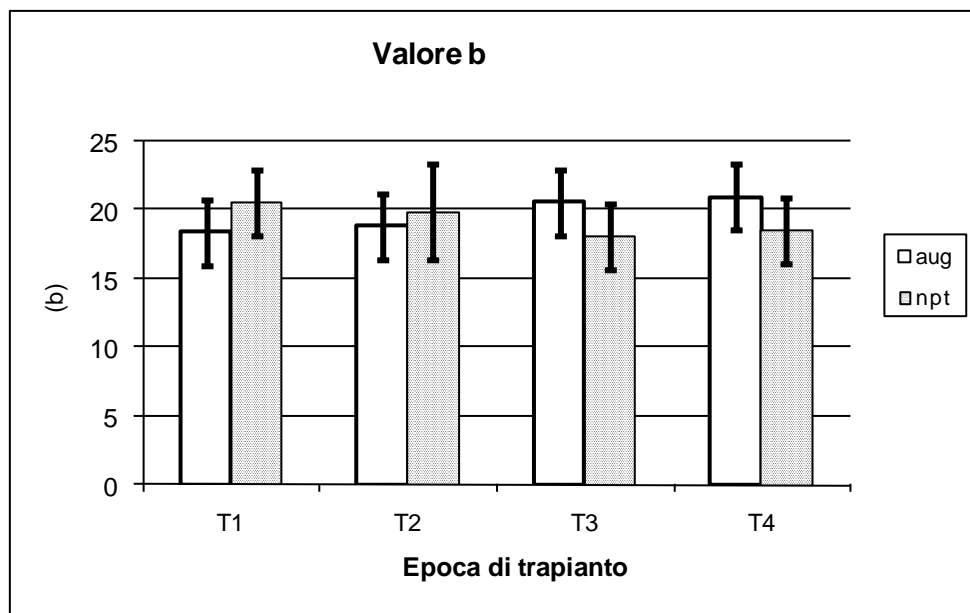


Figura 80: Variazione del valore **b** in relazione all'epoca di trapianto e alla varietà.

Correlando il valore di **a** con i valori di licopene ottenuti con estrazione chimica (rapportati entrambi su peso fresco) risulta che la correlazione è molto bassa, quindi non si può fare una previsione sul contenuto di licopene basandosi su questo dato colorimetrico.

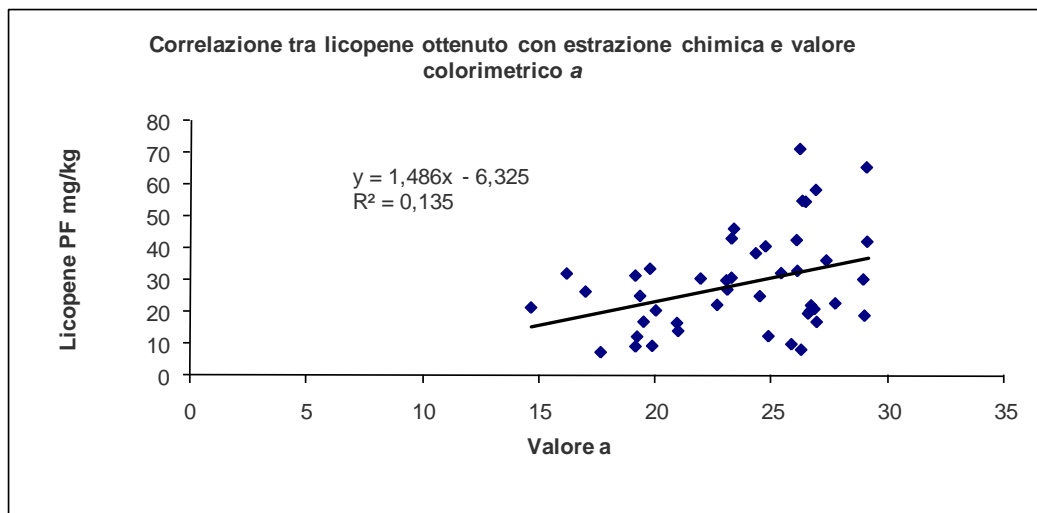


Figura 81: Correlazione tra licopene e valore colorimetrico **a**.

4.8 Confronto tra SFE ed estrazione chimica per il quantitativo di β -carotene

β -carotene rapportato al peso secco

Secondo l'analisi della varianza (Tabella 26) il modello risulta statisticamente significativo e i valori ottenuti sono giustificati al 47 %.

Coefficienti

Parametri	Valori	Probabilità
Intercetta	0.0600493	0.0000
Pendenza	0.0450746	0.0036

Analisi della varianza

Parametri	Devianza	G.L	Varianza	Rapp-F	Probabilità
Totale	0.000237071	15			
Modello	0.000110394	1	0.000110394	12.20	0.0036
Errore	0.000126677	14	0.00000904835		

Tabella 26: Coefficienti e analisi della varianza per la relazione tra i due metodi di estrazione del β -carotene (i valori significativi sono in grassetto).

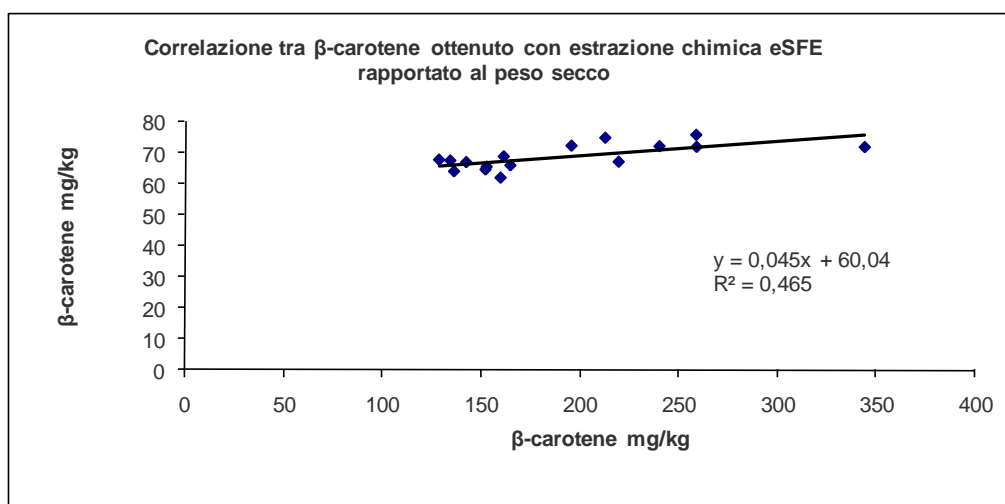


Figura 82: Il grafico riporta la correlazione tra il quantitativo di β -carotene ottenuto con estrazione chimica (in ascissa) e con SFE (in ordinata).

β-carotene rapportato al peso fresco

Secondo l'analisi della varianza (Tabella 27) il modello risulta statisticamente significativo e i valori ottenuti non sono correlati.

Coefficienti

Parametri	Valori	Probabilità
Intercetta	3.80619	0.0000
Pendenza	-0.00173306	0.9705

Analisi della varianza

Parametri	Devianza	G.L.	Varianza	Rapp-F	Probabilità
Totale	2.65614	15			
Modello	0.000269577	1	0.000269577	0.00	0.9705
Errore	2.65587	14	0.189705		

Tabella 27: Coefficienti e analisi della varianza per la relazione tra i metodi di estrazione del β-carotene (i valori significativi sono in grassetto).

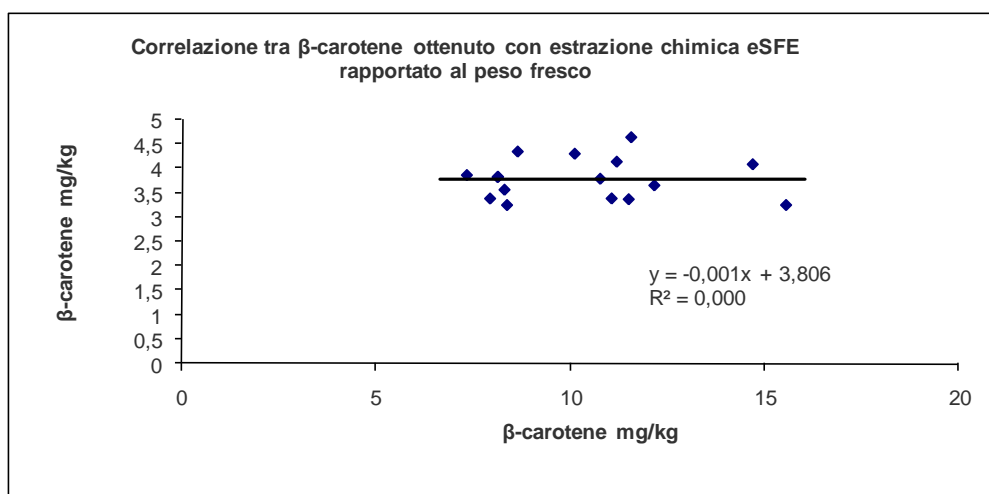


Figura 83: Il grafico riporta la correlazione tra il quantitativo di β-carotene ottenuto con estrazione chimica (in ascissa) e con SFE (in ordinata).

4.9 Confronto tra SFE ed estrazione chimica per il quantitativo di licopene

Licopene in rapporto al peso secco

Secondo l'analisi della varianza (Tabella 28) il modello risulta statisticamente significativo e i valori ottenuti sono giustificati al 36 %.

Coefficienti

Parametri	Valori	Probabilità
Intercetta	10.583	0.1490
Pendenza	0.0319939	0.0141

Analisi della varianza

Parametri	Devianza	G.L	Varianza	Rapp-F	Probabilità
Totale	5211.21	15			
Modello	1872.33	1	1872.33	7.85	0.0141
Errore	3338.88	14	238.492		

Tabella 28: Coefficienti e analisi della varianza per la relazione tra i metodi di estrazione del licopene (i valori significativi sono in grassetto).

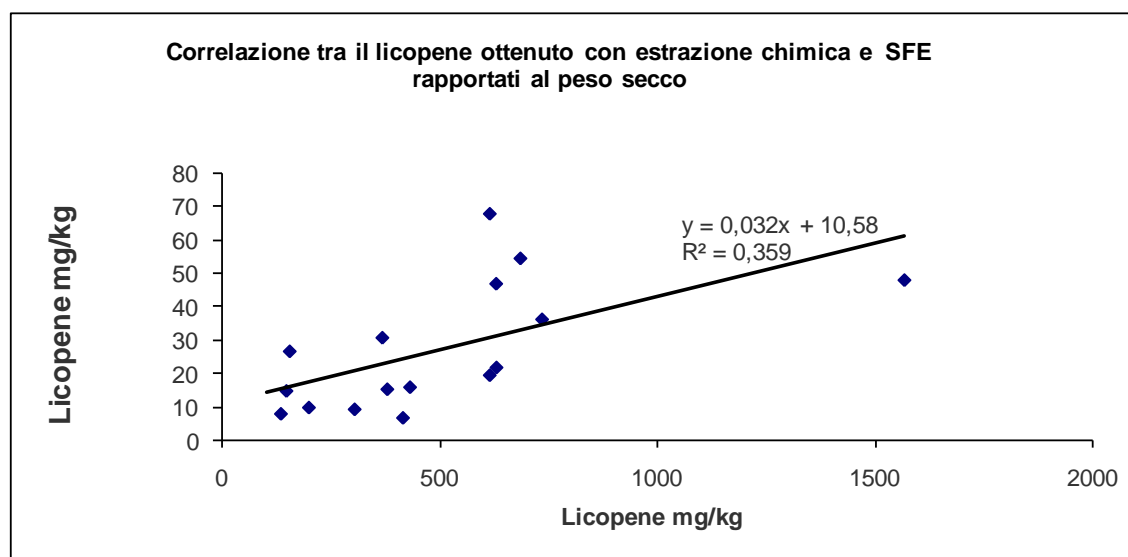


Figura 84: Il grafico riporta la correlazione tra il quantitativo di licopene ottenuto con estrazione chimica (in ascissa) e con SFE (in ordinata).

Licopene in rapporto al peso fresco

Secondo l'analisi della varianza (Tabella 29) il modello risulta statisticamente significativo e i valori ottenuti sono giustificati al 27 %.

Coefficienti

Parametri	Valori	Probabilità
Intercetta	0.627881	0.1305
Pendenza	0.0294718	0.0388

Analisi della varianza

Parametri	Devianza	G.L	Varianza	Rapp-F	Probabilità
Totale	11.4291	15			
Modello	3.09404	1	3.09404	5.20	0.0388
Errore	8.33502	14	0.595359		

Tabella 29: Coefficienti e analisi della varianza per la relazione tra i metodi di estrazione del licopene (i valori significativi sono in grassetto).

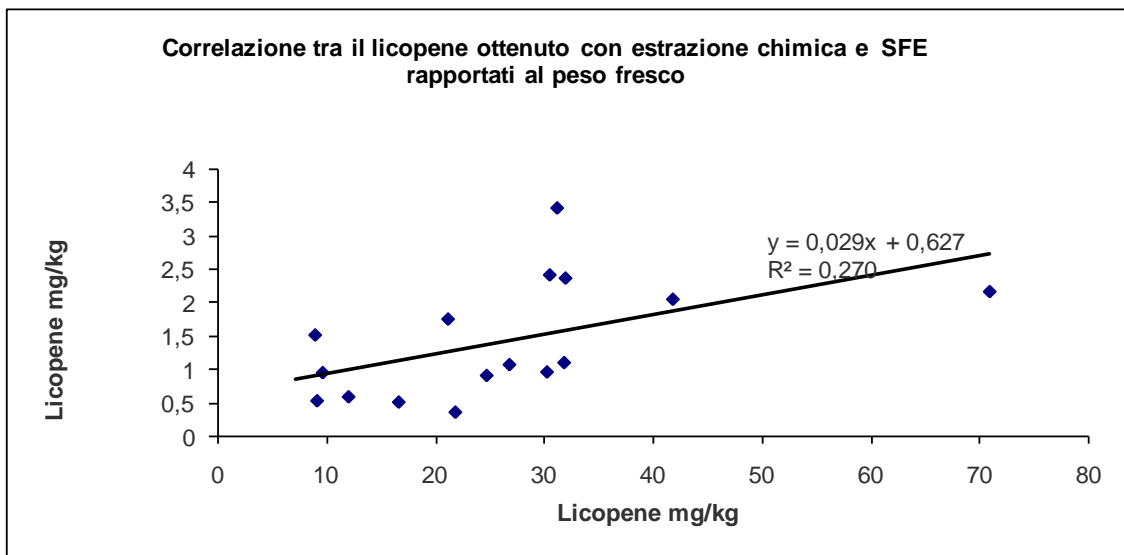


Figura 85: Il grafico riporta la correlazione tra il quantitativo di licopene ottenuto con estrazione chimica (in ascissa) e con SFE (in ordinata).

4.10 Confronto tra i quantitativi di β -carotene e licopene ottenuti con SFE

β -carotene e licopene rapportati al peso secco

Secondo l'analisi della varianza (Tabella 30) il modello risulta statisticamente significativo e i valori ottenuti sono giustificati al 86 %.

Coefficienti

Parametri	Valori	Probabilità
Intercetta	63.3765	0.0000
Pendenza	0.198418	0.0000

Analisi della varianza

Parametri	Devianza	G.L	Varianza	Rapp-F	Probabilità
Totale	237.071	15			
Modello	205.163	1	205.163	90.02	0.0000
Errore	31.9082	14	2.27916		

Tabella 30: Coefficienti e analisi della varianza per la relazione tra i quantitativi di licopene e β -carotene ottenuti con SFE (i valori significativi sono in grassetto).

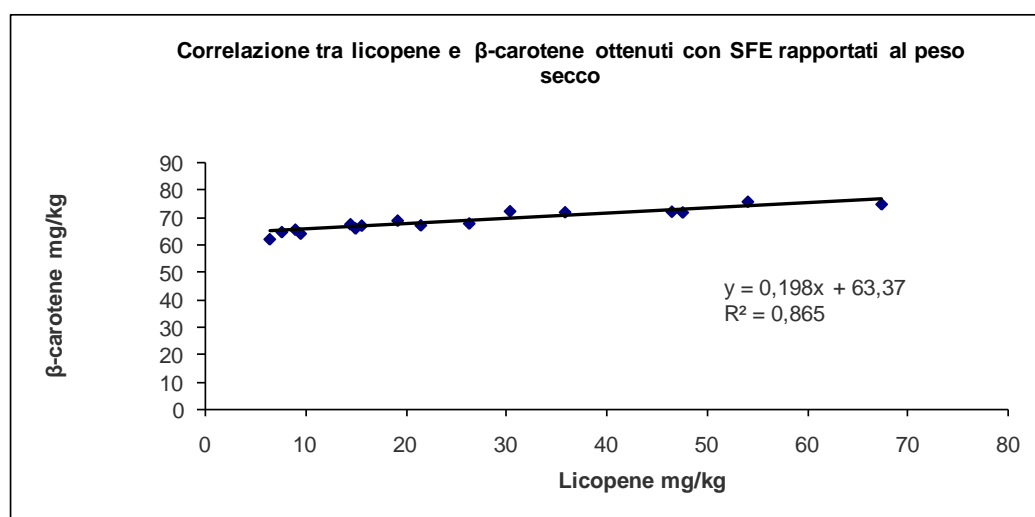


Figura 86: Il grafico rappresenta la correlazione tra i quantitativi di licopene e β -carotene ottenuti con SFE.

β-carotene e licopene rapportati al peso fresco

Secondo l'analisi della varianza (Tabella 31) il modello risulta statisticamente significativo e i valori ottenuti non sono correlati.

Coefficienti

Parametri	Valori	Probabilità
Intercetta	3.86349	0.0000
Pendenza	-0.0536191	0.6817

Analisi della varianza

Parametri	Devianza	G.L	Varianza	Rapp-F	Probabilità
Totale	2.65614	15			
Modello	0.0328586	1	0.0328586	0.18	0.6817
Errore	2.62328	14	0.187377		

Tabella 31: Coefficienti e analisi della varianza per la relazione tra quantitativo di licopene e β-carotene ottenuti con SFE (i valori significativi sono in grassetto) .

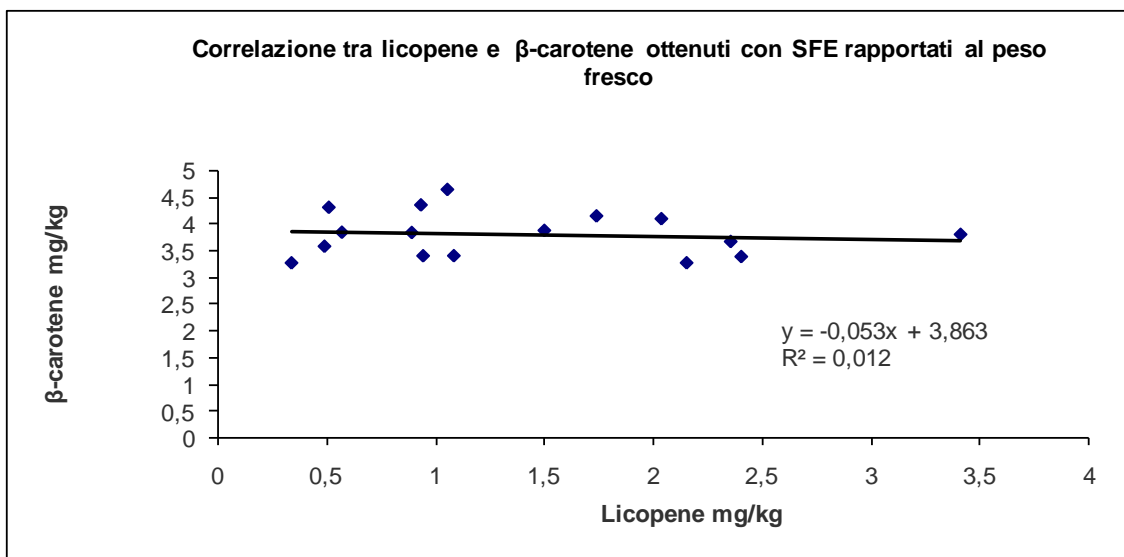


Figura 87: Il grafico rappresenta la correlazione tra i quantitativi di licopene e β-carotene ottenuti con SFE.

4.11 Confronto fra i quantitativi di β -carotene e licopene ottenuti con estrazione chimica

β -carotene e licopene rapportato al peso secco

Secondo l'analisi della varianza (Tabella 32) il modello risulta statisticamente significativo e i valori ottenuti sono giustificati al 70 %.

Coefficienti

Parametri	Valori	Probabilità
Intercetta	113.255	0.0000
Pendenza	0.147779	0.0000

Analisi della varianza

Parametri	Devianza	G.L	Varianza	Rapp-F	Probabilità
Totale	137921.	44			
Modello	97754.6	1	97754.6	104.65	0.0000
Errore	40166.5	43	934.104		

Tabella 32: Coefficienti e analisi della varianza per la relazione tra quantitativo di licopene e β -carotene ottenuti con estrazione chimica (i valori significativi sono in grassetto).

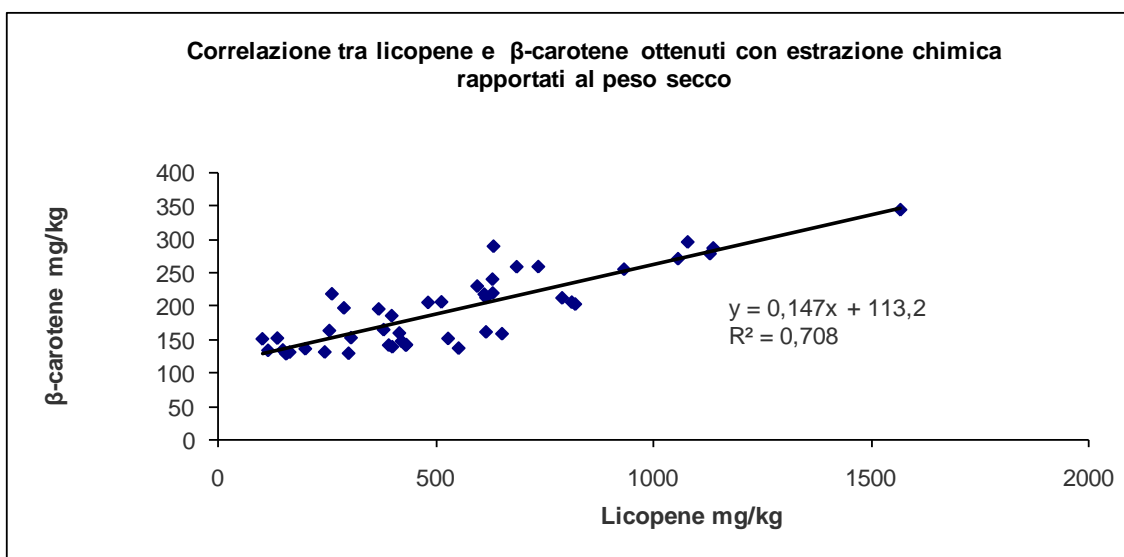


Figura 88: Il grafico rappresenta la correlazione tra i quantitativi di licopene e β -carotene ottenuti con estrazione chimica.

β -carotene e licopene rapportato al peso fresco

Secondo l'analisi della varianza (Tabella 33) il modello risulta statisticamente significativo e i valori ottenuti sono giustificati al 46 %.

Coefficienti

Parametri	Valori	Probabilità
Intercetta	7.23588	0.0000
Pendenza	0.117616	0.0000

Analisi della varianza

Parametri	Devianza	G.L	Varianza	Rapp-F	Probabilità
Totale	307.709	44			
Modello	143.37	1	143.37	37.51	0.0000
Errore	164.34	43	3.82185		

Tabella 33: Coefficienti e analisi della varianza per la relazione tra quantitativo di licopene e β -carotene ottenuti con estrazione chimica (i valori significativi sono in grassetto).

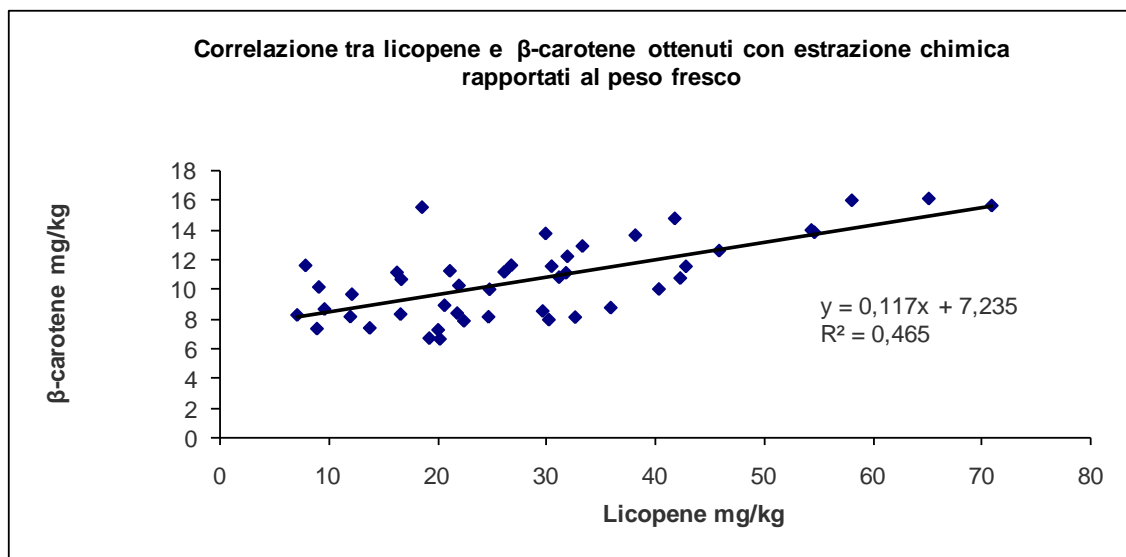


Figura 89: Il grafico rappresenta la correlazione tra i quantitativi di licopene e β -carotene ottenuti con estrazione chimica.

5. DISCUSSIONE

Le prove condotte sulla messa a punto delle metodiche analitiche hanno consentito di definire delle metodologie analitiche idonee ad identificare in maniera precisa alcuni composti funzionali nella complessa matrice del pomodoro. Le metodiche messe a punto sono state poi impiegate per la valutazione dell'effetto sulla qualità di pomodoro in funzione di fattori agronomici quali pacciamatura, epoca di trapianto e varietà. I risultati hanno consentito di far emergere che solo alcuni composti funzionali tra quelli presi in considerazione sono stati influenzati dai fattori sopra citati. Per quanto riguarda gli acidi fenolici solo l'acido *p*-cumarico si è differenziato dagli altri riportando valori medi più elevati nella varietà AUG (1.7 mg/kg p.f.) rispetto ad NPT (0.5 mg/kg p.f.) e a conferma di quanto riscontrato in una prova analoga realizzata l'anno precedente (Zanovello, 2010). Inoltre il contenuto medio di acido *p*-cumarico nelle due varietà (1.01 mg/kg p.f.) insieme a quello dell'acido ferulico (2.9 mg/kg p.f.) sono risultati più elevati rispetto agli altri acidi considerati. In riferimento all'effetto della varietà, i valori più elevati di tali composti sono stati riscontrati nella varietà AUG ad eccezione degli acidi cinnamico e clorogenico che però sono meno influenti in quanto presentano valori medi nelle due varietà ridotti (rispettivamente di 0.03 e 0.67 mg/kg p.f.). Per quanto riguarda l'effetto della pacciamatura, anche se non significativo, pare dare i valori più elevati per tutti gli acidi fenolici ad eccezione dell'acido *p*-cumarico. Infine nelle diverse epoche di trapianto si sono ottenuti valori apparentemente differenti per tutti gli acidi fenolici. In riferimento ai flavonoidi, la rutina si è differenziata con valori più elevati nella varietà AUG. La tesi non pacciamata ha riportato valori apparentemente più elevati rispetto al pacciamata. Il dato è probabilmente riconducibile ad un maggiore stress al quale sono stati sottoposti i pomodori non pacciamati rispetto ai pacciamati poiché questo stato determina una maggiore produzione di antiossidanti come la rutina. Anche il licopene, altro importantissimo antiossidante del pomodoro, viene prodotto maggiormente nel testimone non pacciamato. In riferimento ai carotenoidi, sia licopene che β -carotene si sono differenziati e hanno riportato valori più elevati nella varietà AUG e nella quarta epoca di trapianto.

Il genotipo appare essere il fattore condizionante la maggior parte dei parametri oggetto di studio. Ad eccezione della rutina e del licopene, i composti considerati sono risultati quantitativamente maggiori nei pomodori pacciamati e presentano valori

apparentemente differenti nelle quattro epoche di trapianto. Questi risultati sono dovuti a fattori non gestibili con tecniche agronomiche in quanto la loro produzione è influenzata da complesse vie biosintetiche.

Per quanto riguarda la relazione tra SFE ed estrazione chimica per il quantitativo di β -carotene, i valori ottenuti con queste due metodiche di estrazione sono correlati ma non danno gli stessi risultati probabilmente perché i valori dell'estrazione chimica hanno un'ampia variabilità (8-15 mg/kg p.f.) rispetto ai valori ottenuti con SFE (3-4.5 mg/kg p.f.). Anche per il licopene vale lo stesso discorso ed è da imputarsi all'elevata variabilità dei valori ottenuti mediante estrazione chimica (10-70 mg/kg p.f.) rispetto all'SFE (0.8-3.3 mg/kg p.f.). I minori valori e la bassa variabilità in riferimento al quantitativo dei carotenoidi estratti mediante SFE sono dovuti a limiti della strumentazione utilizzata, in quanto questa permette una valutazione qualitativa ma non un'accurata analisi quantitativa. Tale strumentazione non consente l'utilizzazione di grossi quantitativi di campione (come avviene a livello industriale) con conseguenti perdite di estratto durante la procedura. La relazione tra i quantitativi di licopene e β -carotene ottenuti con le due metodiche di estrazione è elevata se si prendono in esame i valori rapportati al peso secco e come ci si aspettava tale correlazione è risultata più bassa se rapportati al peso fresco. Il basso contenuto di licopene estratto chimicamente rispetto ai più alti valori (30-200 mg/kg p.f.) riportati in bibliografia (Vasapollo G., *et al.*, 2004) potrebbero essere dovuti alla degradazione che gli estratti hanno subito in seguito ad esposizione alla luce e alla temperatura ambientale durante la procedura di estrazione.

6. CONCLUSIONI

Le metodiche analitiche per acidi fenolici liberi e i flavonoidi sono risultate attendibili per l'applicazione alle tesi di pomodoro considerate. La metodica di estrazione dei carotenoidi richiede ulteriori semplici miglioramenti per limitare la degradazione dei composti come la protezione del campione dalla luce (estrazione al buio) e l'utilizzo di basse temperature (estrazione in ghiaccio).

Per quanto riguarda la metodica messa a punto per l'SFE, questa è risultata apprezzabile per scopi analitici ma applicabile prevalentemente a livello industriale dove può essere una reale alternativa all'utilizzo di tecniche convenzionali che prevedono l'utilizzo di solventi tossici e difficilmente gestibili.

La varietà di pomodoro che ha dato i migliori risultati a livello di composti funzionali considerati è AUG. Lo stesso vale per la tesi pacciamata. Quindi la tecnica della pacciamatura permette oltre che una maggiore resa di coltivazione anche una migliore produzione di composti considerati. Essendo composti importanti dal punto di vista salutistico per le proprietà antiossidanti e dal punto di vista economico per lo sfruttamento dei carotenoidi come coloranti, potrebbe essere particolarmente vantaggioso utilizzare varietà ad alto contenuto di questi composti funzionali e gestire la coltura con tecniche agronomiche adeguate come dimostrato in questa tesi.

BIBLIOGRAFIA

Amadei G., "Il pomodoro", Gruppo enimont, Milano, (1990).

Beckman E.J., "Supercritical and-near critical CO₂ in green chemical synthesis and processing", J. Supercrit. Fluids, 22, 121-191, (2004).

Beatriz Diaz R., Andrès M., Hermania D., "Supercritical CO₂ Extraction and Purification of Compounds with Antioxidant Activity", J. Agric. Food. Chem 54, 2441-2496, (2006).

Boileau A.C., Merchen N.R., Wasson K., Atkinson C.A., Erdman J.W., Jr., J.Nutr 129, 1176, (1999).

Budavari S ., "The Merck Index", 13 Ed. Merck & Co., Inc, Whitehouse Station NJ, Usa, (2000).

Cabras P., Martelli A.; "Chimica degli alimenti", 8:174-180, Edizione Piccin, (2000).

Cadoni M.R., De Giorgi E., Medda G., "Supercritical CO₂ extraction of lycopene and β -carotene from ripe tomatoes", Dyes and Pigment 44, 27-32 (2000).

Capasso F., De Pasquale R., Grandolini G., Mascolo N., "Farmacognosia: Farmaci Naturali, Loro preparazione Ed Impiego Terapeutico", Springer, 246-248, (2002).

Capilla, V., Blasco M., Subirates, S., "Nutraceutical products", State of the art book on SF technology, Ainia, 18:235-253 (2004).

Collins A.R.; Harrington V., "Antioxidants; not the only reason to eat fruit and vegetables". Phytochem.Rev., 335, 256-265, (2003).

Ghiselli A., Serafini M, Natella F, Scaccini C, "Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical review and experimental data. *Free Radical Biol. Med.*, 29, 1106-1114, (2000).

Halliwell B., "How to characterize a biological antioxidant", *Free Radical Res. Commun.*, 9, 1-32 (1990).

Jeong W.S., Kong A.N., "Biological properties of monomeric and polymeric catechins: Green tea catechins and procyanidins", *Pharm. Biol.*, 42, 84-93 (2004).

Lenucci M.S., Cadinu D., Taurino M., Piro G., D'alessandro G., "Antioxidant composition in cherry and high pigment tomato cultivars". *J. Agric. Food Chem.*, 54, 2606-2613, (2006).

Lin C.H., Chen B.H., "Determinations of carotenoids in tomato juice by liquid chromatography". *J. Of Chromatography*, 1012, 103-109 (2003).

Luthria D.L., Mukhopadhyay S., Krizek D.T. "Content of total phenolics and phenolic acids in tomato, fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation". *J Food Compos Anal* 19, 771-777, (2006).

Maffei M., "Biochimica vegetale", pp. 293-294, Edizioni Piccin, (1998).

Marzi V., "Pomodoro. Coltivazioni erbacee", Pàtron Editore, Bologna, (2001).

Mau, J.L. Lin H.C., Chen C.C. "Antioxidant properties of several medicinal mushrooms" *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6072-6077, (2002).

Mau J.L., Ko P.T., Chyau C.C. "Aroma characterization and antioxidant activity of supercritical carbon dioxide extracts from *Terminalia catappa* leaves". *Food Res. Int.*, 36, 97-104, (2003).

Obied H.K., Allen M.S., Bedgood D.R., Prenzler P.D., Robards K., Stockmann R. "Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste", *J. Agric. Chem.*, 531 823-837, (2005).

Raffo A., La Malfa G., Fogliano V., Quaglia G., "Seasonal variations in antioxidant components of cherry tomatoes". *J Food Comp Anal* 19, 11-19. (2003).

Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W. "Phenolic compounds and their role in oxidative process in fruits" *Food. Chem.*, 66, 401-436, (1999).

Salisbury F.B., "Fisiologia vegetale" Editrice Zanichelli, 14, 219-235, (1994).

Shahidi F., Naczk M., "Food phenolics; Source, Chemistry, Effects, Applications", Technomic Pub. Co., Lancaster, PA, (1995).

Siviero P., Silvestri G., "La coltivazione del pomodoro da industria", Edizioni L'informatore Agrario, Verona (1991).

Tesi R., "Colture protette e ortoflorovivaismo", Edizioni Edagricole, 8, 139 (1987).

Tesi R., "Principi di orticoltura e ortaggi d'Italia" Edizioni Edagricole, 13, 2-77, (1994).

Ummihan T., Mitsuru S., Motonobu G., Kiro H., "Extraction of Lycopene from Tomato Skin with Supercritical Carbon Dioxide: Effect of Operating Conditions and Solubility Analysis", *J. Agric. Chem.*, 54, 5604-5610, (2006).

Vasapollo G., Longo L., Rescio L., Ciurlia L., "Innovative supercritical CO₂ extraction of lycopene from tomato in the presence of vegetables oil as-co-solvent", *J. Of Supercritical Fluids* 29, 87-96 (2004).

Xu F., Xu Q.Z., "Plant nutriomics in China-an overview". *Annual of Botany*, 98, 473-482, (2006).

Youdim K.A., Spencer J.P.E., Schroeter H., Rice-Evans C., “Dietary flavonoids as potential neuroprotectants”, Biol. Chem., 383, 503-519, (2002).

Zanovello M., “Variazione del contenuto in acidi fenolici in pomodoro da industria”, Tesi di laurea magistrale in scienze e tecnologie alimentari, (2010).

Siti internet consultati

www.agraria.org

www.istat.it

www.inran.it

www.separeco.it

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio mia madre, mio padre e mia sorella Katia per l'affetto e il supporto. Tutti i miei amici tra cui in cima alla lista cito Danielo Danieli e a seguire Letiz, Bomber, Franz, Alan, Uzio, Cognac, Diego, Clod, Ra, Logico, Antonio, Raskal, Charras, Best, Dillo, Federico (mi sarai utile), Agri Rock, tutta la gente della festa della triennale su a Cirè (siete troppi e non ricordo i nomi) tutti i trentini (brutta razza) soprattutto la gente di Cadine (REGNA!) e la comunità di Ubuntu (grazie per il supporto).

Per la realizzazione della tesi (e non solo), ringrazio sentitamente Silvia Santagata e la sua passione e dedizione per il lavoro. Mi auguro che un giorno la gente come te sia alla guida delle nostre Università!! Un grazie anche a Carlo Nicoletto per i consigli e per la sua grande competenza (la stessa cosa che ho detto a Silvia vale anche per te!!).

Infine un ringraziamento vivissimo alla mia musica, che mi ha insegnato che *“...un uomo che non molla è un gigante tra i più bassi...”* (Alchimie.No.Strane *et al.*, 2010).