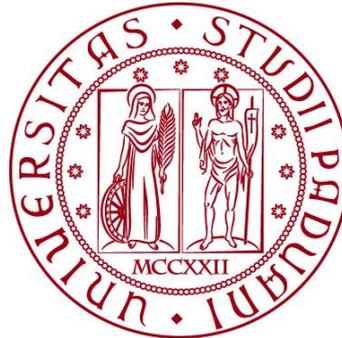


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Scienze Naturali



ELABORATO DI LAUREA

Analisi di alcuni parametri chimici e biochimici in *Solanum lycopersicum* (pomodoro) in relazione a diverse tecniche di coltivazione

**Tutor: Prof.ssa Paola Irato
Dipartimento di Biologia**

Laureanda: Alessia Battistin

1177210

ANNO ACCADEMICO: 2021/2022

INDICE

1. Introduzione.....	4
1.1. Tipi di agricoltura.....	5
1.1.1. Permacoltura.....	5
1.1.2. Agricoltura biologica.....	6
1.1.3. Agricoltura convenzionale e commerciale.....	6
1.2. Pomodoro.....	6
1.3. Antiossidanti.....	7
1.3.1. Acido ascorbico.....	8
1.3.2. Ascorbato perossidasi.....	8
1.3.3. Glutazione perossidasi.....	9
1.3.4. Catalasi.....	9
1.4. Contenuto d'acqua.....	9
1.5. Contenuto di sodio.....	9
1.6. Organolettico.....	10
2. Scopo della tesi.....	11
3. Materiali e metodi.....	12
3.1. Coltivazione dei pomodori.....	12
3.2. Dosaggio dell'acido ascorbico.....	12
3.3. Dosaggio dell'ascorbato perossidasi.....	13
3.4. Preparazione del campione.....	14
3.5. Dosaggio della glutazione perossidasi.....	14
3.6. Dosaggio della catalasi.....	15
3.7. Dosaggio delle proteine totali.....	16
3.8. Contenuto d'acqua.....	17
3.9. Contenuto di sodio.....	17
3.10. Test organolettico.....	18
3.11. Analisi statistica.....	18

4. Risultati	19
4.1. Contenuto di acido ascorbico.....	19
4.2. Attività dell'ascorbato perossidasi.....	20
4.3. Attività della glutazione perossidasi.....	20
4.4. Attività della catalasi.....	21
4.5. Contenuto d'acqua.....	22
4.6. Contenuto di sodio.....	23
4.7. Valutazione del test organolettico.....	24
5. Discussione e conclusione	27
6. Bibliografia	31

1. INTRODUZIONE

La pratica agricola è stata ridefinita tra gli anni '50 e '60 grazie allo sviluppo di nuovi macchinari, la produzione di nuove varietà di prodotti, fertilizzanti sintetici e altri prodotti chimici. In questo modo il settore agricolo ha potuto ampliare le produzioni per garantire cibo sufficiente per tutta la popolazione mondiale, attualmente in aumento, e sopperire le conseguenti esigenze del mercato a causa di una domanda sempre crescente di prodotti. Questa tecnica di coltivazione, definita come pratica agricola convenzionale, ha buone rese, ma ha un controllo limitato sull'uso del suolo, infatti, l'uso intensivo del suolo e l'applicazione di pesticidi e fertilizzanti chimici ha incrementato l'impatto negativo sulle risorse naturali e sulla biodiversità (Khush, 2001; Rapa et al., 2021). Queste due risorse sono di essenziale importanza per l'agricoltura, poiché sono necessarie per la corretta funzionalità fisiologica delle piante e il loro sfruttamento intensivo costringerà le industrie a un'espansione agricola che minaccerà ancor di più gli equilibri ambientali e la biodiversità (Behrman et al., 2015; Newbold et al., 2015; Kehoe et al., 2017; Ortiz et al., 2020). Tutto ciò, inoltre, provoca ingenti danni ambientali come distruzione dell'habitat e inquinamento, fattori che influenzano direttamente anche la biodiversità, infatti, si stima che nei siti di coltivazione la ricchezza di specie sia in media inferiore del 40% rispetto alla vegetazione primaria (Newbold et al., 2015). Grazie alla sensibilizzazione delle persone riguardo il cambiamento climatico legato all'inquinamento, viene posta più attenzione alla modalità di produzione dei prodotti e alla loro qualità, andando, quindi, a selezionare cibo prodotto in modo più sostenibile, considerato, inoltre, più sano e più nutriente rispetto alla produzione convenzionale (Mditshwa et al., 2017). Recenti studi, infatti, affermano che una dieta basata su cibi provenienti da un'agricoltura simbiotica, come quella biologica e soprattutto permacultura, hanno potenziali benefici che riducono il rischio di sviluppare la sindrome metabolica e altri disturbi correlati (Turrone et al., 2021). Questo grazie alla presenza di una quantità elevata di antiossidanti che vanno a degradare molecole instabili, come le ROS (specie reattive dell'ossigeno) le quali causano alterazioni a livello molecolare (DNA, lipidi e proteine), che si

riflettono poi a diversi disturbi di tipo cardiovascolare, neurologico e tumorale nell'uomo. Uno stile di vita malsano che prevede una dieta povera di antiossidanti provenienti da fonti vegetali, animali e minerali può, infatti, aumentare il rischio di queste malattie (Gupta & Sharma, 2006; Sen & Chakraborty, 2011).

1.1 TIPI DI AGRICOLTURA

1.1.1 PERMACULTURA

La permacultura fu ideata da Bill Mollison e David Holmgren nel 1970 in Australia, dove svilupparono la pratica della permacultura. Il termine permacultura contiene tre concetti: permanente, agricoltura e cultura. Essa si concentra soprattutto sullo sviluppo dell'interazione tra comunità e agricoltura: è, infatti, un tipo di agricoltura realizzata per produzioni locali in autosufficienza. È stata progettata sulla base di osservazioni dei processi naturali, in modo da produrre cibo in modo sostenibile, rispettando gli ecosistemi naturali e la biodiversità, riducendo in questo modo l'impatto ambientale (Mollison & Holmgren, 2021). I principi su cui si basa la permacultura sono 12:

1. Osservare e interagire
 2. Catturare e immagazzinare energia
 3. Ottenere una resa
 4. Applicare l'autoregolamentazione e accettare il feedback
 5. Usare e valorizzare le fonti di energia rinnovabile
 6. Non produrre rifiuti
 7. Progettare dai modelli ai dettagli
 8. Integrare anziché separare
 9. Usare soluzioni piccole e lente
 10. Usare e valorizzare la diversità
 11. Usare i bordi e valorizzare il marginale
 12. Creatività per usare e rispondere al cambiamento
- (Holmgren, 2002).

1.1.2 AGRICOLTURA BIOLOGICA

L'agricoltura biologica è un metodo di coltura certificato e normalizzato dal Regolamento del Consiglio Europeo (CE) N. 834/2007 che mira a ridurre l'impatto ambientale. Con questa normativa viene promosso l'uso responsabile delle risorse naturali come energia, acqua e suolo e il mantenimento della biodiversità e degli equilibri ecologici, vietando, quindi, l'uso di pesticidi sintetici, ormoni della crescita, antibiotici, moderne tecniche di ingegneria genetica, fertilizzanti chimici o fanghi di depurazione i quali, invece, alterano gli ecosistemi naturali e le interazioni che si instaurano tra i vari organismi presenti nell'ambiente, anche circostante al terreno agricolo (Reganold & Wachter, 2016; Rapa et al., 2021).

1.1.3 AGRICOLTURA CONVENZIONALE E COMMERCIALE

L'agricoltura convenzionale comprende l'uso di prodotti chimici, quali pesticidi, insetticidi, fungicidi, ecc., che vanno ad alterare il ciclo naturale degli ecosistemi, in quanto vengono contaminati suolo e acqua, compromettendo la vita e/o lo sviluppo di diverse specie animali e vegetali (Aktar, 2009). Nonostante ciò, questo metodo di agricoltura si è notevolmente diffuso perché permette la produzione di grandi quantità di prodotti, sempre più richiesti per via dell'aumento della densità demografica mondiale (Godfray et al., 2010).

1.2 POMODORO

Il pomodoro, il cui nome scientifico è *Solanum lycopersicum*, appartiene alle Solanaceae e fu inserito da Linneo nel 1753 nel genere *Solanum*. Questa famiglia contiene più di 3000 specie, tra cui si trovano anche altre piante con una certa rilevanza commerciale, come patata, melanzana, peperone, petunia e tabacco (Bai & Lindhout, 2007).

La specie selvatica di pomodoro era originaria delle Ande ed è stata importata in Europa nel XVI secolo. Oggi ha un'importanza economica mondiale grazie alle sue caratteristiche nutritive, in quanto contiene nutrienti importanti come licopene, con funzioni antitumorali, beta-carotene, vitamina

C e alle sue proprietà antiossidanti (Paduchuri et al., 2010; Raiola et al., 2014).

Le Solanacee consistono in erbe, arbusti, alberi o rampicanti; le foglie sono alterne e spirali, spesso appaiate con entrambe le foglie sullo stesso lato del fusto, in genere profondamente lobate o pennato-composte, da intere a serrate e penninervie. Fiori in genere bisessuali e attinomorfi, con 5 sepali connati e persistenti, che si espandono durante la maturazione del frutto. I petali sono anch'essi 5, connati, che formano una corolla rotata campanulata e distintamente plicata. Gli stami sono generalmente 5, i cui filamenti sono adnati alla corolla, le antere biloculari e deiscenti, talvolta aderenti l'una all'altra. Carpelli in genere 2, connati, l'ovario è supero, da intero a profondamente lobato, in genere con placentazione assile e 2 loculi; lo stigma è bilobato (Judd et al., 2016). Il frutto è una bacca e può essere semplice, multiplo, aggregato o accessorio. Il frutto semplice è definito come un'ovaia matura comprendente i tessuti del carpello, in parte o nella sua totalità, quello multiplo è formato da ovaie mature di molti fiori raggruppati insieme, quello aggregato da diverse ovaie mature in un unico fiore, disposte sulla superficie di un unico ricettacolo e, infine, quello accessorio si sviluppa dai tessuti che circondano l'ovario (Coombe, 1976; Razdan & Mattoo, 2007). I semi sono endospermi e spesso appiattiti. (Simpson, 2010; Judd et al., 2016).

1.3 ANTIOSSIDANTI

In seguito a stress, la pianta produce specie reattive dell'ossigeno, le ROS, le quali comprendono molecole molto reattive come l'anione superossido (O_2^-), il radicale ossidrile ($OH\cdot$) e anche il perossido di idrogeno (H_2O_2). Queste molecole sono molto dannose per le cellule, in quanto possono portare alla distruzione ossidativa della cellula, reagendo con lipidi cellulari, proteine e DNA, alterando o bloccando la loro attività biologica. Per evitare la formazione delle ROS, gli organismi vegetali (e anche animali) hanno sviluppato sistemi di difesa, attuati mediante l'impiego di antiossidanti enzimatici e non enzimatici (Asada, 1999; Irato et al., 2007; Mhamdi et al., 2010; Sahoo et al., 2017).

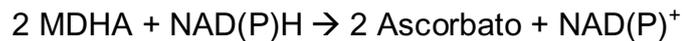
1.3.1 ACIDO ASCORBICO

L'ascorbato (AsA), comunemente chiamato anche Vitamina C, è il donatore di elettroni utilizzato dall'ascorbato perossidasi; esso viene ossidato da ossigeno, superossido, ossigeno singoletto e H₂O₂ nel radicale monodeidroascorbato (MDHA) (Smirnoff, 2000). L'acido ascorbico viene ridotto secondo varie reazioni (Asada, 1999):

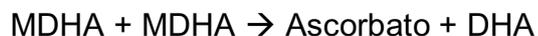
- tramite ferredossina ridotta, dove il radicale MDHA viene ridotto direttamente prima della sua sproporzione spontanea da parte della ferredossina fotoridotta (redFd)



- mediante l'enzima MDHA-reduttasi

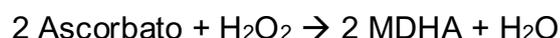


- con sproporzionamento spontaneo di MDHA, dove vengono prodotti simultaneamente deidroascorbato (DHA) e ascorbato



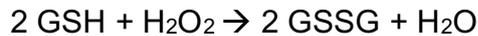
1.3.2 ASCORBATO PEROSSIDASI

L'ascorbato perossidasi (APX; EC 1.11.1.11) è un enzima con gruppo eme presente in tutti gli organismi fotosintetici, comprese le alghe eucariotiche, ed è in grado di metabolizzare le ROS in modo da controllare l'impatto che queste molecole reattive possono avere sulle strutture cellulari e le loro funzioni (Asada, 1999; Shigeoka et al. 2002; Anjum et al., 2016). Esso utilizza due molecole di ascorbato per ridurre l'H₂O₂ in H₂O, con la contemporanea generazione di due molecole di monodeidroascorbato (MDHA), che è un radicale con una vita breve (Noctor, 1998; Yadav et al., 2015):



1.3.3 GLUTATIONE PEROSSIDASI

La glutatione perossidasi (GPX; EC 1.11.1.9) è un enzima antiossidante che catalizza la riduzione di perossido di idrogeno (H₂O₂) ossidando il GSH (Hoque et al., 2008), secondo la reazione:



1.3.4 CATALASI

La catalasi (CAT; EC 1.11.1.6) è un enzima tetramerico contenente un gruppo eme ed è presente in tutti gli organismi aerobici; ha la funzione di degradare rapidamente specie reattive dell'ossigeno, come l'H₂O₂, convertendole in H₂O e O₂, secondo la formula:



Essa catalizza la reazione di dismutazione senza richiedere alcun riducente. (Deisseroth & Dounce 1970; Dounce 1983; Zamocky et al., 2008; Anjum et al., 2016).

1.4 CONTENUTO D'ACQUA

L'essiccamento del prodotto utilizzando il forno è il metodo più comune e la durata dell'essiccazione può variare a seconda delle temperature prescelte. In genere si utilizza una temperatura che va dai 70°C ai 105°C con tempistiche variabili, a seconda delle caratteristiche del prodotto da essiccare, fino a completa secchezza dello stesso (Karathanos, 1999).

1.5 CONTENUTO DI SODIO

La pianta di pomodoro per crescere e riprodursi correttamente ha bisogno di dodici nutrienti detti "essenziali", i quali vengono suddivisi in:

- macronutrienti, necessari in grandi quantità, tra cui troviamo azoto (N), fosforo (P), potassio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), zolfo (S)

- micronutrienti, necessari in piccole quantità, tra i quali ci sono boro (B), ferro (Fe), manganese (Mn), rame (Cu), zinco (Zn) e molibdeno (Mo)

Questi nutrienti vengono assorbiti dal suolo tramite le radici della pianta e spesso in agricoltura, per avere produzioni ottimali, vengono aggiunti sotto forma di fertilizzanti (Sainju et al., 2003). Nel suolo, inoltre, possono essere presenti ioni inorganici non essenziali, anche in quantità tossiche; uno tra i più rilevanti per la coltivazione è il sodio (Na^+), il quale si sta espandendo in varie aree nel mondo. Esso causa alterazioni di tipo osmotico e ionico che provocano una riduzione della crescita. Le piante evitano i problemi relativi allo stress salino utilizzando dei trasportatori coinvolti nell'assorbimento e distribuzione di sodio, infatti, esse cercano di evitare l'accumulo eccessivo di sodio nei tessuti fotosintetici traslocandolo in altri tessuti, come i germogli (Maathuis, 2007). Il frutto di pomodoro, invece, contiene quantità di sodio molto basse (Zhang & Blumwald, 2001).

1.6 TEST ORGANOLETTICO

È un test usato per definire le proprietà del prodotto, quali il contenuto di zuccheri, aromi, acidità, ecc., mediante la valutazione di più persone, in genere esperti, che individualmente ne valutano le caratteristiche in base al proprio parere personale. Grazie a questo tipo di test si può avere un'idea generale della qualità del campione, il quale verrà poi rapportato o con un prodotto simile o con uno standard (Ana et al., 2017).

2. SCOPO DELLA TESI

A causa della rapida crescita dell'attività agricola e industriale negli ultimi anni sta aumentando l'inquinamento ambientale, soprattutto di metalli pesanti e pesticidi, andando, così, a minacciare e a danneggiare l'ecosistema naturale (Chin, 2010; Ali et al., 2019; Alengebawi et al., 2021). Per diversi decenni i pesticidi sono stati utilizzati in modo massiccio per migliorare la produzione e la qualità dei prodotti, evitando l'infestazione da parassiti e avere una conseguente resa maggiore; ciò ha portato al loro bioaccumulo nelle catene alimentari, oltre a lasciare residui nel suolo, nell'aria e nell'acqua; questi rimangono dispersi nell'ambiente per lungo tempo, provocando effetti anche cancerogeni sull'uomo (Noyes et al., 2009; Lefrancq et al., 2013; Özkara et al., 2016; Alengebawi et al., 2021).

Recenti studi affermano che un'agricoltura simbiotica, la quale preserva le naturali interazioni che si instaurano tra piante e organismi presenti nel suolo (come batteri e miceti), porta alla produzione di prodotti più sani con quantità e varietà maggiori di metaboliti che portano beneficio per la salute, essendo coltivati in modo sostenibile senza l'utilizzo di sostanze sintetiche (Turroni et al., 2021).

Lo scopo di questo lavoro di tesi è stato quello di mettere a confronto tecniche colturali diverse, quali permacultura, agricoltura biologica e convenzionale, analizzando i frutti di pomodoro della specie *Solanum lycopersicum*, per valutare se effettivamente un diverso metodo di coltivazione porta ad avere proprietà diverse dei prodotti. È stato scelto il pomodoro perché è uno degli ortaggi più consumati al mondo e, inoltre, ha una certa rilevanza per quanto riguarda il suo potere nutritivo: è ricco di licopene, beta-carotene, flavonoidi, vitamina C e altri antiossidanti, per questo il consumo di pomodoro può ridurre in modo significativo il rischio di sviluppare il cancro, soprattutto a livello intestinale (Sainju et al., 2003; Raiola et al., 2014).

Più in particolare, in questo studio, sono state determinate le attività di tre enzimi antiossidanti: ascorbato perossidasi, glutatione perossidasi e catalasi; oltre a queste, è stata determinata la quantità di acido ascorbico, di acqua e di sodio contenuta.

3. MATERIALI E METODI

3.1 COLTIVAZIONE DEI POMODORI

I pomodori sono stati coltivati a Treviso con metodologie differenti, quali permacultura, agricoltura biologica e convenzionale, un frutto, invece, è stato comprato in una grossa catena di supermercati con un basso costo, non dichiarato biologico (agricoltura commerciale), di cui non si conosce la provenienza; questo per avere un ulteriore confronto con pomodori prodotti con metodi industriali. I frutti venivano conservati a +4°C e utilizzati nell'arco di pochi giorni, oppure conservati a -80°C.

3.2 DOSAGGIO ACIDO ASCORBICO

La concentrazione di acido ascorbico (AsA) è stata determinata seguendo il metodo di Keller e Schwager (1977).

Sono stati prelevati 0,5 g di campione a cui sono stati aggiunti 20 mL di soluzione di estrazione, preparata sciogliendo 5 g di acido ossalico e 0,75 g di EDTA in 1 L d'acqua MilliQ, e omogenato tutto utilizzando il Polytron. La soluzione è stata poi centrifugata per 10 minuti a 10.000 rpm a 4°C in centrifuga Beckman J2-21. È stato quindi prelevato 1 mL di supernatante, al quale sono stati aggiunti 5 mL di DCPIP; il colore della soluzione diventava rosa acceso ed è stata determinata l'assorbanza tramite spettrofotometro UV-VIS a 520 nm. In seguito, è stata aggiunta una goccia di soluzione AsA e la soluzione è diventata trasparente; è stata determinata nuovamente l'assorbanza a 520 nm. Anche la soluzione di DCPIP è stata misurata alla stessa lunghezza d'onda. È stata fatta la curva standard con concentrazioni note di AsA seguendo la stessa procedura. La concentrazione di acido ascorbico è stata determinata utilizzando la formula:

$$[E_0 - (E_1 - E_2)] \times V/W \times V_1 \times 1.000$$

Dove:

W = peso del campione prelevato

V1 = volume del supernatante prelevato

V = volume totale della miscela.

Il valore $[E_0 - (E_1 - E_2)]$ è stimato dalla curva standard.

3.3 DOSAGGIO DELL'ASCORBATO PEROSSIDASI

L'attività dell'ascorbato perossidasi è stata saggiata seguendo il metodo di Nakano e Asada (1981). È stato preparato il tampone fosfato 0,1 M a pH 7,5 con 0,5 mM di EDTA e 1 mM di acido ascorbico; 2 mL di questo composto vengono aggiunti ai 3 g di tessuto di pomodoro. Il tutto viene omogeneizzato con l'uso del Polytron e, in seguito, centrifugato a 15.000 rpm a 5°C per 15 minuti con centrifuga Beckman J2-21. Il supernatante così ottenuto corrisponde all'estratto enzimatico, 0,5 mL dei quali verranno aggiunti alla miscela di reazione in una cuvetta al quarzo insieme a 1,5 mL di tampone fosfato 0,1 M a pH 7, 0,5 mL di acido ascorbico 0,25 mM, 0,1 mL di EDTA 3 mM, 0,2 mL di acqua MilliQ e infine 0,2 mL di H₂O₂ 6 mM, per un totale di 3 mL. La cuvetta è stata poi agitata ed è stato registrato il decremento di assorbanza a 290 nm per 1 minuto, ogni 10 secondi con uno spettrofotometro UV-1800PC con il programma "Kinetics". Con i dati raccolti sono stati effettuati i calcoli utilizzando il coefficiente di estinzione noto di 2,8 mmol⁻¹ · cm⁻¹, secondo la formula:

$$U_{APX/mL} = [(A_i - A_f)/2,8] \times 1 \times (V_{totale}/V_{campione}) \times 1.000$$

Dove:

A_i = media assorbanza iniziale

A_f = media assorbanza finale

2,8 = coefficiente di estinzione mmol⁻¹ · cm⁻¹ di acido ascorbico

1 = tempo che intercorre tra la prima e l'ultima misura di assorbanza (in minuti)

1.000 = fattore di conversione da mmoli a moli

In seguito, è stato effettuato il dosaggio delle proteine totali con il metodo Lowry (Lowry et al., 1951), i cui risultati sono stati rapportati con l'attività dell'enzima.

3.4 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE PER L'ATTIVITÀ DI GPX E CAT

Al campione veniva aggiunto il tampone di omogeneizzazione pari a quattro volte il peso dello stesso. Il tampone Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, Saccarosio 0,5 M e KCl 0,15 M, veniva preparato giornalmente. Per omogenare veniva utilizzato sempre il Polytron a 20.000 rpm fino a quando non si fosse sciolto tutto il campione. Il materiale ottenuto veniva trasferito in provette da centrifuga Beckman (per rotore JA-21) e centrifugate per 50 minuti a 20.000 rpm alla temperatura di 4°C con centrifuga Beckman J2-21. In seguito, veniva prelevato il supernatante e veniva messo in provette di vetro immerse nel ghiaccio. Con questo estratto si proseguiva, poi, con i test della glutatione perossidasi, catalasi e dosaggio delle proteine totali.

3.5 DOSAGGIO DELLA GLUTATIONE PEROSSIDASI

L'attività della glutatione perossidasi è stata determinata seguendo il metodo di Livingstone et al. (1992).

Per stabilire l'attività della glutatione perossidasi veniva preparata giornalmente la stock solution contenente NADPH 0,15 mM, GSH 2,5 mM, NaN_3 1,25 mM, GSH-reduttasi 1,25 U e controllata a 340 nm dove doveva risultare superiore a 1,2106; la soluzione doveva essere mantenuta in ghiaccio al buio. Anche il perossido di idrogeno veniva preparato giornalmente, diluendo 2,8 μL di H_2O_2 madre al 30% in 10 mL di H_2O MilliQ, controllata a 240 nm. Dopo aver impostato il programma con la lunghezza d'onda a 340 nm e il relativo tempo di registrazione dei dati, ogni minuto per 5 minuti, si procedeva con la preparazione del bianco, dove si inseriva in

una cuvetta di vetro da 1 mL, 800 μ L di stock solution, 100 μ L di tampone di omogeneizzazione e, infine, 100 μ L di H₂O₂, il tutto veniva chiuso con parafilm, agitato e inserito velocemente nello strumento. Per il dosaggio dell'attività della GPX dei vari campioni, si sostituiva il tampone di omogeneizzazione con il supernatante e si procedeva ugualmente. Per i calcoli è stata usata la formula:

$$U_{\text{GPX}} / \text{mL} = [(A_i - A_f) / \Delta t / 6,22] \times 1.000 / V_{\text{campione}}$$

Dove:

A_i = media dell'assorbanza iniziale del campione - media dell'assorbanza iniziale del bianco

A_f = media dell'assorbanza finale del campione - media dell'assorbanza finale del bianco

Δt = tempo intercorrente tra l'assorbanza iniziale e quella finale espresso in minuti

6,22 = coefficiente di estinzione del NADPH

L'attività enzimatica è stata rapportata al contenuto di proteine totali ottenuto con il metodo di Lowry (Lowry et al., 1951).

3.6 DOSAGGIO DELLA CATALASI

L'attività della catalasi è stata determinata seguendo il metodo di Livingstone et al. (1992).

Per determinare l'attività della catalasi, è stato preparato il tampone fosfato 50 mM, pH 7,5 diluendo in 100 mL totali 4 mL di soluzione stock A di NaH₂PO₄ · H₂O 0,2 M e 21 mL di soluzione stock B di Na₂HPO₄ · 12H₂O 0,2 M. Giornalmente, veniva preparato il perossido di idrogeno 50 mM, diluendo 34 μ L di H₂O₂ madre (30%) in 10 mL di H₂O MilliQ. Il titolo dell'H₂O₂ veniva controllato con lo spettrofotometro a 240 nm. In seguito, veniva impostato nel programma la lunghezza d'onda a 240 nm, la quale doveva essere misurata per 1 minuto, ogni 10 secondi. Nella cuvetta al quarzo da 3 mL venivano aggiunti tampone fosfato 50 mM e supernatante, per un totale di

2 mL e poi 1 mL di H₂O₂, chiusa con il parafilm, agitata e velocemente inserita nello strumento. Per la parte di calcolo è stata usata la formula:

$$U_{\text{CAT}}/\text{mL} = [(A_i - A_f)/40] \times 1 \times (V_{\text{totale}}/V_{\text{campione}}) \times 1.000$$

Dove:

A_i = media assorbanza iniziale

A_f = media assorbanza finale

40 = coefficiente di estinzione mM di H₂O₂

1 = tempo che intercorre tra la prima e l'ultima misura di assorbanza (in minuti)

1.000 = fattore di conversione da mmoli a moli

L'attività enzimatica è stata rapportata al contenuto di proteine totali ottenuto con il metodo di Lowry (Lowry et al., 1951).

3.7 DOSAGGIO DELLE PROTEINE TOTALI SECONDO IL METODO DI LOWRY ET AL. (1951)

Per il dosaggio delle proteine totali sono state preparate le soluzioni A contenente Na₂CO₃ 2% e NaOH 0,1 N e la soluzione B con CuSO₄ · 5H₂O 0,5% e citrato di sodio 1%; dopo di che devono essere preparate giornalmente le soluzioni C con 25 mL di soluzione A e 0,5 mL di soluzione B e D con 1,36 mL di H₂O e 1 mL di FOLIN. Utilizzando l'albumina, preparata con 1 mg di albumina per mL di acqua deionizzata, è stata fatta la retta di taratura con concentrazioni note e crescenti di albumina, necessaria per la normalizzazione. Nelle provette numerate precedentemente, è stato messo un quantitativo di H₂O e di campione (o tampone di omogeneizzazione per la preparazione dei bianchi) per un volume totale di 200 µL, in seguito è stato aggiunto in tutte le provette 1 mL di soluzione C, agitate con il Vortex e atteso 10 minuti affinché avvenisse la reazione. Passato il tempo di reazione, sono stati aggiunti 100 µL di soluzione D in tutte le provette. Passati i 30 minuti sono state effettuate le

misurazioni allo spettrofotometro a 750 nm. Tutti i dosaggi sono stati effettuati in doppio. La formula utilizzata per i calcoli è la seguente:

$$\text{mg/mL} = 0,001 [(y - a)/b]/\text{mL campione}$$

Dove:

y = assorbanza – bianco

a e b = ricavati dall'equazione della retta di taratura

3.8 CONTENUTO D'ACQUA

Per il contenuto d'acqua sono stati fatti sette test su pomodori grandi e piccoli, dove venivano tagliati i pomodori a pezzi ed essiccati a 50°C fino a perdita completa d'acqua, poi trasferiti in una giara contenente gel di silice, anch'esso essiccato, e infine pesati. È stata poi calcolata la percentuale d'acqua contenuta nei pomodori tramite la formula:

$$\% \text{H}_2\text{O} = 100 \times [(P_f - P_s)/P_f]$$

Dove:

P_f = peso del pomodoro fresco

P_s = peso del pomodoro secco

3.9 CONTENUTO SODIO

Per il dosaggio del sodio, sono stati centrifugati i campioni di pomodori grandi e piccoli in provette da centrifuga Beckman per rotore JA-20 a 20.000rpm per 10 minuti con centrifuga Beckman J2-21. Con il supernatante ottenuto è stato determinato il contenuto di sodio nei diversi campioni tramite l'utilizzo dello Ion-Meter GLP 22 Crison, collegato ai relativi elettrodi del Na⁺ e di riferimento. Sono state eseguite sette misurazioni per campione.

Prima, è stato tarato lo strumento preparando soluzioni contenenti sale e aggiustatore di forza ionica in concentrazioni note.

3.10 TEST ORGANOLETTICO

È stato effettuato un test organolettico grazie alla collaborazione di quattro persone, di cui tre Chef, i quali hanno assaggiato le varie tipologie di pomodori al buio con metodo incrociato, in modo che non si influenzassero a vicenda. Gli sono stati forniti pomodori grandi e piccoli tagliati a pezzi, per un totale di otto assaggi a testa. I parametri richiesti erano esame tattile (durezza, succosità, farinosità, polposità), olfattivo (odore, aroma) e gustativo (salato, acido, dolce, amaro, umami, astringente); dovevano inserire un punteggio che andava da 0 a 5 a seconda di ciò che percepivano assaggiando il pomodoro.

3.11 ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il programma Primer; mediante l'analisi della varianza a una via sono state determinate le differenze statistiche e, per quelle risultate significative, con $p < 0.05$, è stato eseguito il test di Student-Newman-Keuls.

4. RISULTATI

Per valutare la differenza tra diverse tecniche di coltura, ho condotto un test organolettico e ho analizzato alcuni parametri chimici e biochimici, in relazione soprattutto alle proprietà antiossidanti.

4.1 CONTENUTO DI ACIDO ASCORBICO

Un'analisi da me eseguita è stata quella della determinazione di acido ascorbico, comunemente noto come vitamina C. È evidente una differenza statisticamente significativa tra tutti i gruppi sperimentali. Il valore maggiore è stato determinato nel gruppo convenzionale, con una diminuzione pari al 16,27% per biologico, 27% per permacultura e 42% nel commerciale.

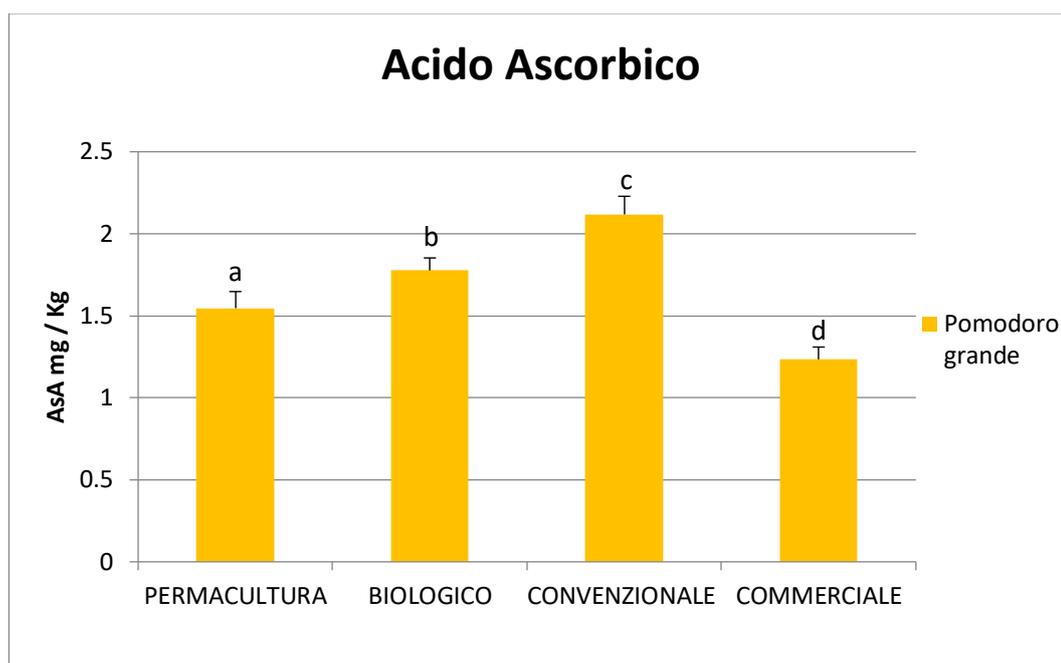


Fig. 1: concentrazione di acido ascorbico nei frutti di pomodoro grandi coltivati nelle quattro modalità. In ordinata è riportata la concentrazione di vitamina C (mg/Kg) i cui valori sono espressi come media \pm DS; in ascissa i quattro metodi di coltura. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p < 0,05$) tra le diverse tecniche di coltura.

4.2 ATTIVITÀ DELL'ASCORBATO PEROSSIDASI

L'ascorbato perossidasi è l'enzima che va a ridurre l'acido ascorbico per trasformare le ROS in molecole meno reattive: nella figura 2 viene mostrata l'attività di questo enzima nei pomodori grandi. Si può osservare che l'attività più alta è presente nel convenzionale e nella permacultura mentre nel biologico e commerciale vi è una riduzione statisticamente significativa di circa i 2/3.

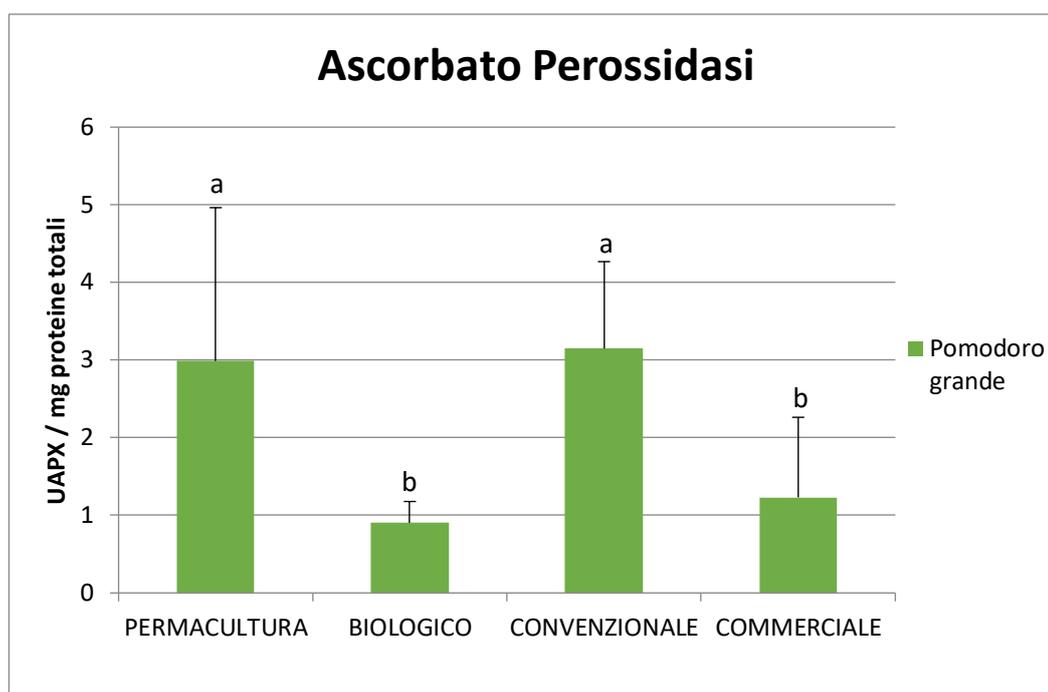


Fig. 2: attività dell'ascorbato perossidasi nei frutti di pomodoro grandi coltivati nelle quattro modalità. In ordinata è riportata l'attività dell'ascorbato perossidasi (U_{APX}/mg proteine totali) i cui valori sono espressi come media \pm DS; in ascissa i quattro metodi di coltura. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p < 0,05$) tra le diverse tecniche di coltura.

4.3 ATTIVITÀ DELLA GLUTATIONE PEROSSIDASI

L'attività enzimatica della glutazione perossidasi nei pomodori grandi è riportata in figura 3. Non è presente alcuna differenza statisticamente significativa, probabilmente a causa dell'elevata variabilità tra i diversi

campioni analizzati e di conseguenza l'alta deviazione standard. Apparentemente sembrerebbe essere presente una maggiore attività nel biologico, che si riduce di quasi il 50% nelle altre tecniche di coltivazione.

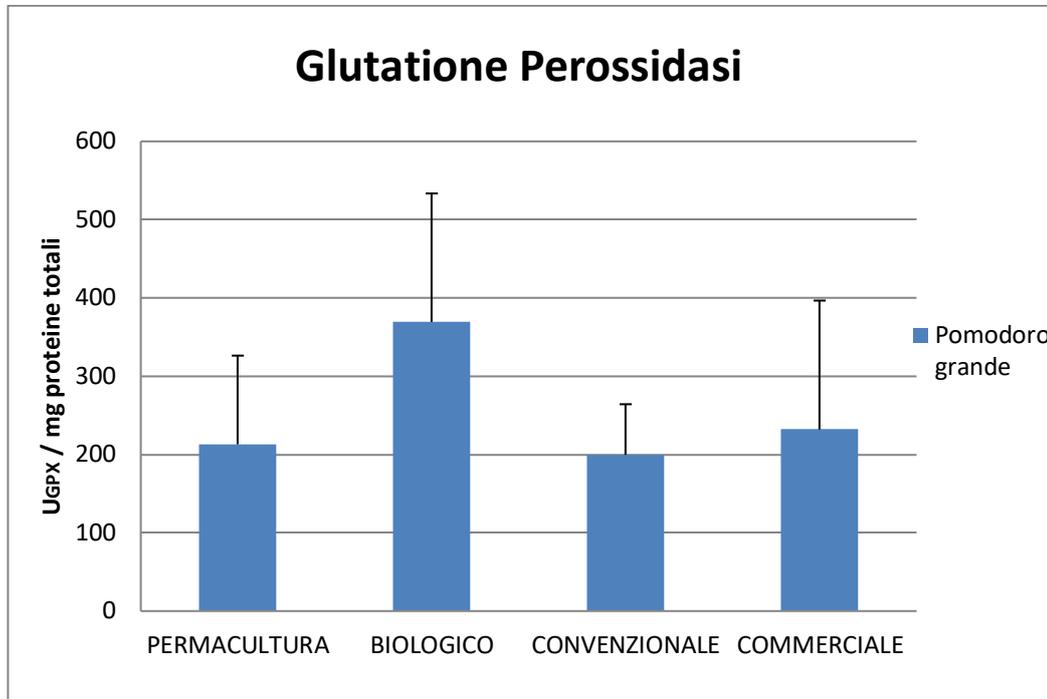


Fig. 3: attività della glutazione perossidasi nei frutti di pomodoro grandi coltivati nelle quattro modalità. In ordinata è riportata l'attività della glutazione perossidasi (U_{GPX}/mg proteine totali) i cui valori sono espressi come media \pm DS; in ascissa i quattro metodi di coltura. La mancanza delle lettere indica che non sono presenti differenze statisticamente significative ($p < 0,05$) tra le diverse tecniche di coltura.

4.4 ATTIVITÀ DELLA CATALASI

È stato eseguito anche il dosaggio della catalasi, ma le attività determinate di questo enzima erano talmente basse da non permettere alcuna analisi affidabile successiva, né analisi statistica.

4.5 CONTENUTO D'ACQUA

Il test di essiccamento è stato eseguito sia in pomodori grandi sia in quelli piccoli. Dalla figura 4 si può vedere che nel pomodoro commerciale è contenuta una percentuale d'acqua maggiore rispetto agli altri metodi colturali, sia per il pomodoro grande che per quello piccolo. Si hanno valori che si aggirano attorno al 96% per quelli grandi e al 94% per quelli piccoli. Tra tutte e quattro le tecniche colturali, il pomodoro biologico e convenzionale, sia piccolo che grande, sono statisticamente uguali. Riguardo le altre colture, invece, permacultura e commerciale hanno valori differenti pari al 2% circa sia per i pomodori piccoli che quelli grandi, mentre il pomodoro grande della permacultura è statisticamente uguale al pomodoro grande del convenzionale.

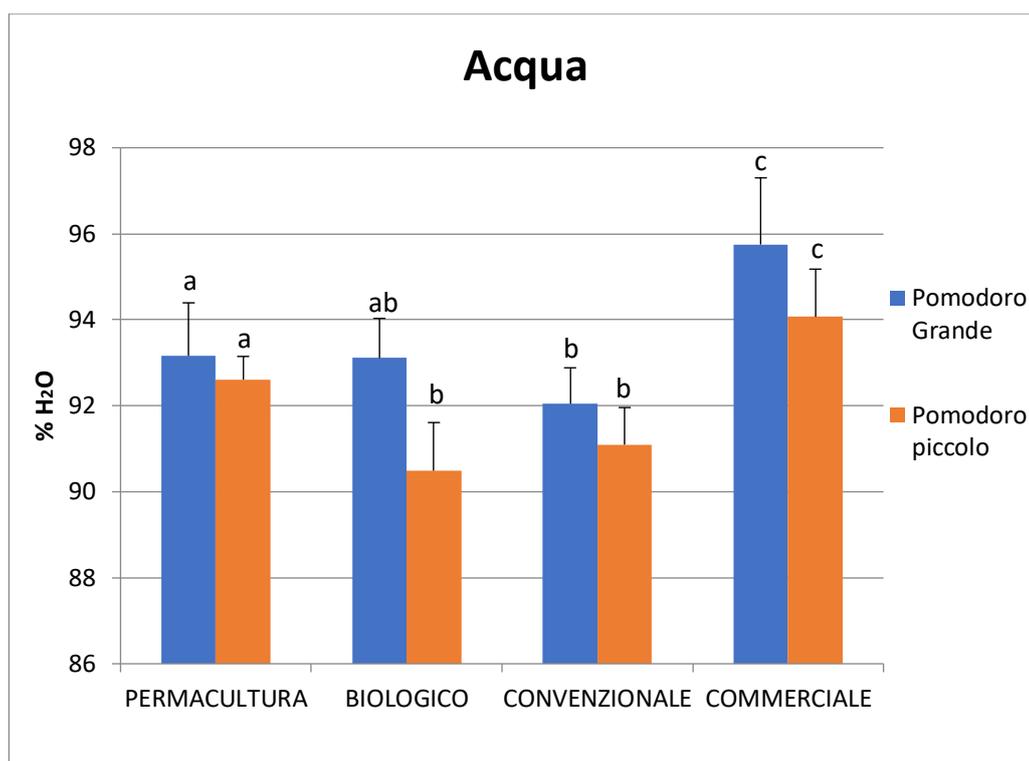


Fig. 4: percentuale di acqua nei frutti di pomodoro coltivati nelle quattro modalità; sono presenti sia pomodori grandi che pomodori piccoli. In ordinata è riportata la percentuale d'acqua (% H₂O) i cui valori sono espressi come media \pm DS; in ascissa i quattro metodi di coltura. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p < 0,05$) tra le diverse tecniche di coltura.

4.6 CONTENUTO DI SODIO

Per determinare il contenuto di sodio sono stati utilizzati sia pomodori piccoli che grandi e dalla figura 5 si può notare subito una grande variabilità: i pomodori grandi mostrano un contenuto di sodio molto basso, sotto a 1 mM/g, eccetto per il biologico che ha valori 20 volte superiori. È presente una valenza statisticamente significativa tra i gruppi dei pomodori piccoli, con contenuto di sodio molto maggiore rispetto a quelli grandi: il convenzionale ne contiene di più, mentre il commerciale ha una concentrazione di sodio inferiore del 33%; permacultura e biologico, invece, contengono quantità minori, pari a circa il 79% rispetto al convenzionale per il biologico e circa 71% per permacultura.

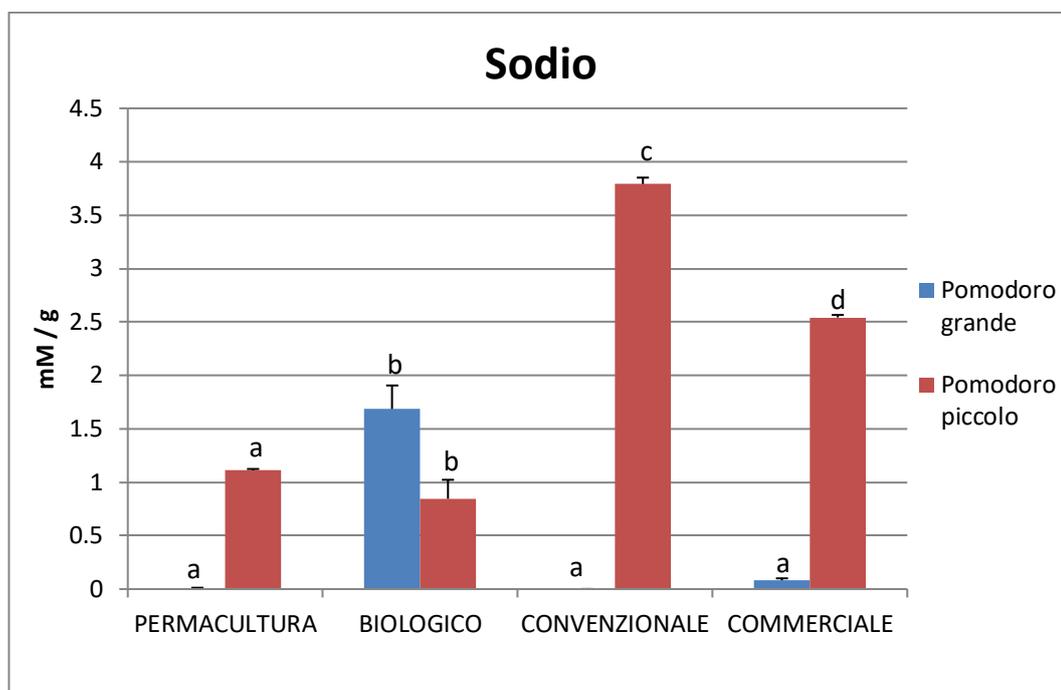


Fig. 5: concentrazione di sodio nei frutti di pomodoro coltivati nelle quattro modalità; sono presenti sia pomodori grandi che pomodori piccoli. In ordinata è riportata la concentrazione di Na⁺ (mM/g) i cui valori sono espressi come media ± DS; in ascissa i quattro metodi di coltura. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative (p<0,05) tra le diverse tecniche di coltura.

4.7 VALUTAZIONE DEL TEST ORGANOLETTICO

Nel test organolettico sono stati valutati sia pomodori piccoli che grandi di tutti e quattro i tipi di agricoltura da quattro persone esterne al progetto, le quali hanno assegnato un voto da 0 a 5, che corrisponde ai valori riportati in ascissa dei grafici 6 e 7. La figura 6 mostra i punteggi ottenuti dall'assaggio del pomodoro piccolo: si nota sotto la voce "aroma" un valore maggiore nel biologico rispetto sia agli altri gruppi, sia rispetto alle altre proprietà analizzate e "durezza" del pomodoro per la permacultura rispetto alle altre tecniche colturali. Al contrario, i valori più bassi si osservano sotto la voce "acido" che riguarda il pomodoro commerciale, e "amaro" che riguarda il biologico e il commerciale. Si notano differenze notevoli di valori nel commerciale rispetto alle altre tecniche colturali per quanto riguarda "odore", "aroma", "salato" e "dolce". Possiamo, inoltre, notare l'assenza di punteggio che ritroviamo in "farinosità" per il pomodoro commerciale e in "astringente" per biologico e commerciale.

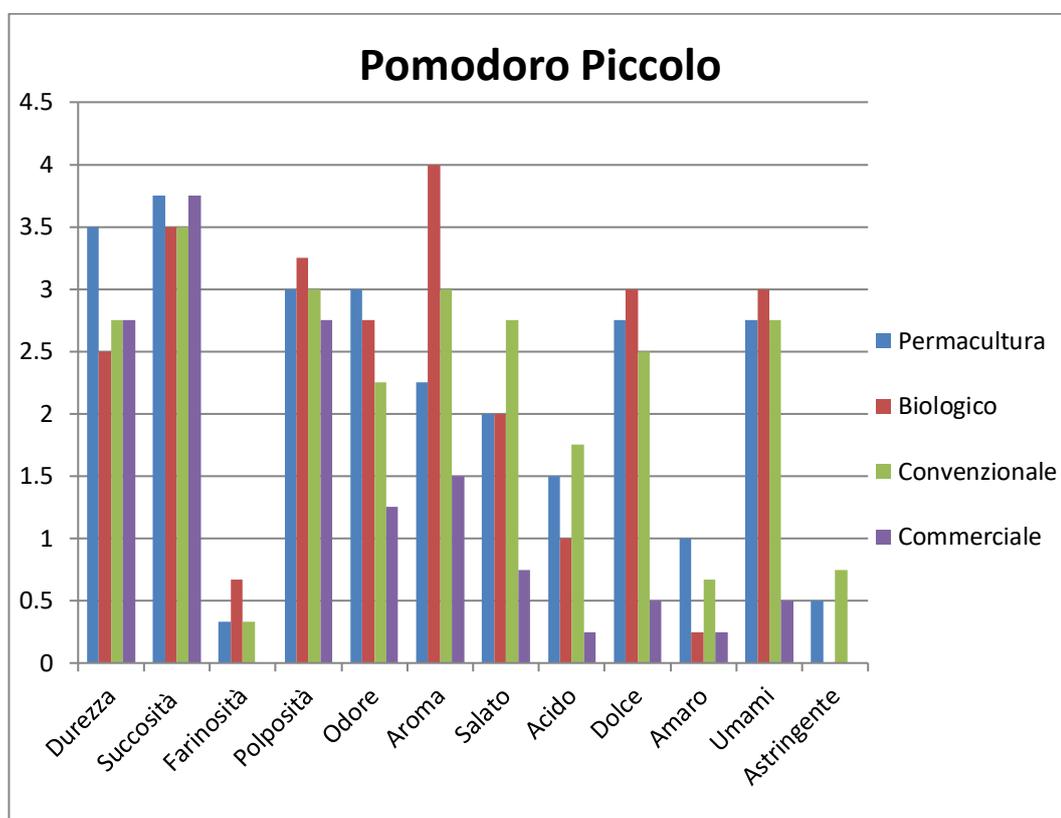


Fig. 6: test organolettico nei frutti di pomodoro piccolo coltivati nelle quattro modalità. In ordinata è riportato il punteggio assegnato al frutto i cui valori

sono espressi come media; in ascissa le varie caratteristiche analizzate. I quattro colori diversi rappresentano le diverse tecniche di coltura.

Nella figura 7 vengono illustrati i punteggi del pomodoro grande e si osservano valori, in genere, simili tra i tipi di agricoltura. Si notano valori bassi in “amaro” e “astringente” con assenza di punteggio per permacultura in “amaro” e valori molto bassi per biologico e convenzionale, mentre sotto la voce “astringente” i valori nulli riguardano permacultura, convenzionale e commerciale; il biologico ha valori molto bassi. Inoltre, si distinguono valori bassi rispetto gli altri metodi colturali anche per il convenzionale in “umami”, “acido”, “farinosità”, “durezza” e “salato”, insieme al pomodoro commerciale. Si osserva un valore maggiore in “farinosità” per il pomodoro commerciale, sempre rispetto ai diversi tipi di coltura. I valori più alti vengono osservati in “succosità” e la “polposità”, dove le quattro tecniche colturali si assomigliano in termini di punteggio.

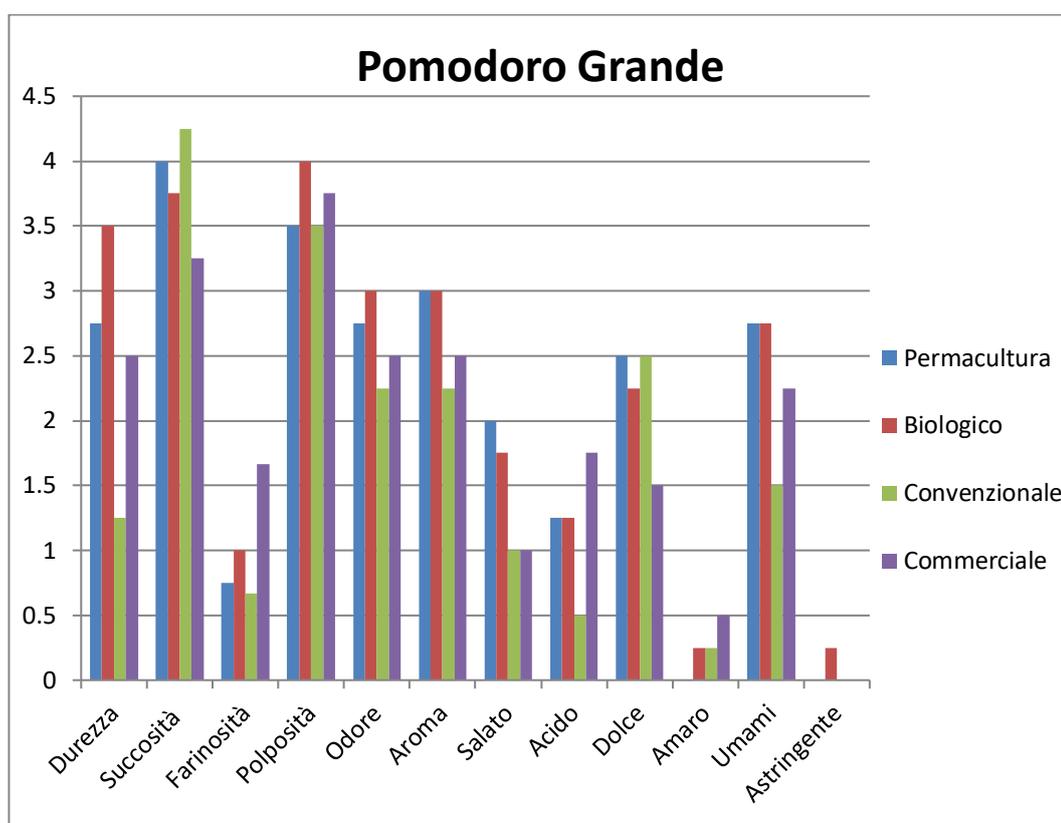


Fig. 7: test organolettico nei frutti di pomodoro grande coltivati nelle quattro modalità. In ordinata è riportato il punteggio assegnato al frutto i cui valori

sono espressi come media; in ascissa le varie caratteristiche analizzate. I quattro colori diversi rappresentano le diverse tecniche di coltura.

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

In questo elaborato di tesi è stata valutata la differenza tra i frutti di pomodoro coltivati con tipologie di agricoltura diverse. Sono stati scelti alcuni parametri che potessero essere confrontabili tra loro e correlati con i benefici che potevano portare. La presenza di antiossidanti abbondanti potrebbe rispecchiare una qualità maggiore del prodotto, in quanto questi sono fondamentali per la dieta perché riducono la probabilità che si sviluppino diverse malattie nell'uomo (Sen & Chakraborty, 2011; Turroni et al., 2021). Mettendo in relazione le tecniche di agricoltura analizzate, si potrebbe dimostrare quale prodotto sia più sano per la salute, in base al loro contenuto di antiossidanti. In questo lavoro, sono stati analizzati antiossidanti sia enzimatici, quali APX e GPX, sia non enzimatici, come AsA.

Dai dati ottenuti si può considerare che il contenuto di acido ascorbico varia leggermente tra le tipologie di coltura: si può notare che permacultura, biologico e convenzionale hanno dei valori simili; il commerciale, invece, ha un contenuto più basso. La differenza di contenuto di AsA tra il pomodoro commerciale e gli altri tre tipi di coltura potrebbe essere dovuta al fatto che non si conosce la provenienza del pomodoro commerciale e le relative condizioni di crescita, comportando così una diversa concentrazione di vitamina C. Inoltre, si prospettava un contenuto maggiore di acido ascorbico nella permacultura e nel biologico, piuttosto che nel convenzionale, come riportato nello studio di Pandey et al. (2016) dove è stata analizzata la concentrazione di acido ascorbico nelle foglie di piante di basilico (*Ocimum basilicum* L.), le quali sono state rifornite di tipologie di fertilizzanti diversi; dallo studio risulta che le piante con fertilizzanti chimici hanno concentrazioni di vitamina C inferiori rispetto a quelle con concimi naturali.

L'acido ascorbico è un substrato che viene utilizzato dall'APX e anche da altri enzimi, come l'ascorbato perossidasi, il quale ha un ruolo nella crescita cellulare (Kato & Esaka, 1999); per questo motivo non può essere fatta una correlazione tra i dati ottenuti dalla concentrazione di acido ascorbico e l'attività dell'ascorbato perossidasi. Per quanto concerne l'attività dell'APX

si osservano valori elevati di attività dell'enzima in permacultura e convenzionale, mentre attività bassa in biologico e commerciale, con uguale significatività statistica tra i relativi due gruppi colturali. Sarà necessario ripetere questo test al fine di verificare i valori ottenuti per l'APX incrociandoli con determinazioni di attività enzimatiche di altri enzimi che possono usare la stessa molecola come substrato, ad esempio i diversi enzimi POD (EC 1.11.1.11) che fanno sempre parte delle perossidasi (van Doorn & Ketsa, 2014).

L'attività della glutatione perossidasi è statisticamente uguale nei diversi gruppi, nonostante questo, però, si può notare una certa similarità tra permacultura, convenzionale e commerciale, mentre si ha una maggiore attività nel biologico. Si attendeva una differenza tra biologico e permacultura rispetto a convenzionale e commerciale in termini di attività enzimatica. In studi futuri sarà necessario approfondire questo parametro.

La percentuale d'acqua nel pomodoro commerciale è maggiore rispetto ai pomodori coltivati a Treviso, infatti, i pomodori del supermercato tendono ad essere più acquosi rispetto a quelli coltivati in casa o da produzione locale e non industriale. I valori di permacultura e biologico sono molto simili nei pomodori grandi, mentre per quelli piccoli si nota una differenza maggiore.

La concentrazione di sodio è molto diversa in relazione alle varietà di pomodoro e tra tipi di coltura: in genere il contenuto di Na^+ è maggiore nei pomodori piccoli, con valori più alti in quelli convenzionale e commerciale, rispetto a quelli grandi che sono molto più bassi, eccetto per il biologico. In studi futuri si potrebbe standardizzare le condizioni di raccolta dei pomodori delle varie tipologie di coltura, misurando il grado di maturazione del frutto; in questo modo si possono analizzare prodotti con caratteristiche molto simili e che hanno subito condizioni meteorologiche analoghe: questo perché la pioggia potrebbe aver dilavato le sostanze disciolte nel terreno, andando a compromettere il contenuto di sodio nel frutto. Pomodori con diversi gradi di maturazione, quindi, potrebbero contenere concentrazioni di Na^+ differenti.

Nel test organolettico del pomodoro piccolo si può osservare che le tipologie di coltura hanno punteggi, in genere, simili. Si evidenzia che nel pomodoro commerciale il valore è più basso rispetto alle altre colture, eccetto in “succosità”, infatti, nel test del contenuto d’acqua il commerciale contiene una percentuale maggiore. Nella voce “salato” si osserva un valore alto nel convenzionale e, confrontando i risultati ottenuti nel test del sodio, si riscontra un livello di concentrazione di Na^+ più alto contenuto nello stesso pomodoro; questa coincidenza di dati potrebbe confermare che la quantità di sale è maggiore e si percepisce anche a livello gustativo.

Anche nel pomodoro grande i punteggi ottenuti sono simili tra i diversi metodi colturali. Si osserva che sotto le voci “aroma” e “umami” i punteggi assegnati sono maggiori per permacultura e biologico rispetto a convenzionale e commerciale, dimostrando che una coltivazione naturale porta ad avere un frutto con più sapore. Nella voce “succosità” si notano valori elevati per tutti i gruppi colturali, ad indicare un contenuto d’acqua elevato in tutti i pomodori: il pomodoro commerciale, però, ha ottenuto un punteggio più basso rispetto agli altri; nel test del contenuto d’acqua da me condotto, si osserva una percentuale elevata nel commerciale, questa differenza può essere dovuta a una percezione sensoriale soggettiva da parte degli assaggiatori. Nel parametro “salato” si notano valori bassi per convenzionale e commerciale, mentre alti per permacultura e biologico: nel test del contenuto di sodio si possono osservare concentrazioni relativamente alte nel biologico, mentre concentrazioni quasi nulle in convenzionale, commerciale e permacultura; la differenza riscontrata nel pomodoro di permacultura può essere dovuta ad una sensibilità gustativa soggettiva degli assaggiatori.

I risultati presentati in questa tesi sono preliminari e suggeriscono che in studi futuri sia necessario effettuare procedure in modo più sistematico. Innanzitutto, effettuare un’analisi dell’acqua con cui vengono irrigate le piante, in relazione anche con il contenuto di sodio.

Anche un’analisi del suolo, considerando le interazioni micorriziche o batteriche, potrebbe dare ulteriori e importanti informazioni, tutto questo

influenza molto l'apporto di nutrienti che arriva alla pianta e potrebbe portare a delle variazioni in quantità di antiossidanti. Oltre a queste tecniche di coltivazione si potrebbe aggiungere anche altri metodi come la coltivazione idroponica o in serra.

Analizzate le condizioni di partenza, si potrebbero effettuare test in diverse condizioni sperimentali, per esempio sotto stress di tipo salino o idrico o luminoso, per osservare se variano nel contenuto di antiossidanti, d'acqua e di sodio.

6. BIBLIOGRAFIA

- Aktar M. W., Sengupta D., Chowdhury A., (2009)** Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, 2, 1-12.
- Alengebawi A., Abdelkhalek T. S., Qureshi S. R., Wang M., (2021)** Heavy metals and pesticides toxicity in agricultural soil and plants: ecological risks and human health implications. *Toxics*, 9, 42.
- Ali H., Khan E., Ilahi I., (2019)** Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: environmental persistence, toxicity, and bioaccumulation. *Journal of Chemistry*, 2019, 14.
- Ana A., Subekti S., Hamidah S., Komariah K., (2017)** Organoleptic test patisserie product based on consumer preference. *1st Annual Applied Science and Engineering Conference*, 180, 012294.
- Anjum N. A., Sharma P., Gill S. S., Hasanuzzaman M., Khan E. A., Kachhap K., Amal M.A., Thangavel P., Devi G. D., Vasudhevan P., Sofo A., Khan N. A., Misra A. N., Lukatkin A. S., Singh H. P., Pereira E., Tuteja N., (2016)** Catalase and ascorbate peroxidase - representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 19002–19029.
- Asada K., (1999)** The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Reviews Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 50, 601–39.
- Bai Y., Lindhout P., (2007)** Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? A review. *Annals of Botany*, 100, 1085–1094.
- Behrman K. D., Juenger T. E., Kiniry J. R., Keitt T. H., (2015)** Spatial land use trade-offs for maintenance of biodiversity, biofuel, and agriculture. *Landscape Ecol*, 30, 1997-1999.
- Chin, N. P., (2010)** Environmental toxins: Physical, social, and emotional. *Breastfeeding Medicine*, 5, 223-224.
- Coombe B. G., (1976)** The development of fleshy fruits. *Annual Reviews Plant Physiology*, 27, 507-28.

Deisseroth A., Dounce A. L., (1970) Catalase: physical and chemical properties mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiological Review*, 50, 3.

Dounce A. L., (1983) A proposed mechanism for the catalytic action of catalase. *Journal of theoretical biology*, 105, 553-567.

Godfray H. C. J., Beddington J. R., Crute I. R., Haddad L., Lawrence D., Muir J. F., Pretty J., Robinson S., Thomas S. M., Toulmin C., (2010) Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science*, 327, 812-818.

Gupta V. K., Sharma S. K., (2006) Plants as natural antioxidants. *Natural Product Radiance*, 5(4), 326-334.

Holmgren D., (2002) Permaculture. Principles and Pathways beyond Sustainability. Holmgren Design Services, Hepburn, Victoria.

Hoque A., Banu N. A., Nakamura Y., Shimoishi Y., Murata Y., (2008) Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells. *Journal of Plant Physiology*, 165, 813-824.

Irato P., Piccinni E., Cassini A., Santovito G., (2007) Antioxidant responses to variations in dissolved oxygen of *Scapharca inaequivalvis* and *Tapes philippinarum*, two bivalve species from the lagoon of Venice. *Mar. Pollut. Bull.*, 54, 1020-1030.

Judd W. S., Campbell C. S., Kellogg E. A., Stevens P. F., Donoghue M. J. (2016) Plant systematics: a phylogenetic approach. 4^o ed. *Oxford University Press*, 490-491.

Karathanos V. T., (1999) Determination of water content of dried fruits by drying kinetics. *Journal of Food Engineering*, 39, 337-344.

Kato N., Esaka M., (1999) Changes in ascorbate oxidase gene expression and ascorbate levels in cell division and cell elongation in tobacco cells. *Physiologia plantarum*, 105, 321–329.

Kehoe L., Romero-Muñoz A., Polaina E., Estes L., Kreft H., Kuemmerle T. (2017) Biodiversity at risk under future cropland expansion and intensification. *Nature Ecology & Evolution*, 1, 1129–1135.

Keller T., Schwager H., (1977) Air pollution and ascorbic acid. *European Journal of Forest Pathology*, 7, 338-350.

Khush G. S., (2001) Green revolution: the way forward. *Nature Reviews Genetics*, 2, 815-822.

Lefrancq M., Imfeld G., Payraudeau S., Millet M., (2013) Kresoxim methyl deposition, drift and runoff in a vineyard catchment. *Science of The Total Environment*, 442, 503-508.

Livingstone D. R., Lips F., Garcia Martinez P., Pipe R. K., (1992), Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, 112, 265-276.

Lowry O. H., Rasebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 198, 265-275.

Maathuis F. J. M., (2007) Monovalent cation transporters; establishing a link between bioinformatics and physiology. *Plant and Soil*, 301, 1-15.

Mditshwa A., Magwazab L. S., Tesfaya S. Z., Mbilic N., (2017) Postharvest quality and composition of organically and conventionally produced fruits: A review. *Scientia Horticulturae*, 216, 148-159.

Mhamdi A., Queval G., Chaouch S., Vanderauwera S., Van Breusegem F., Noctor G., (2010) Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*, 61, 4197-4220.

Mollison B., Holmgren D., (2021) Permaculture. Ch. Corlet. Permaculture Association of Western Australia Inc. and authors.

Nakano Y., Asada K., (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22, 867-880.

Newbold T., Hudson L. N., Hill S. L. L., Contu S., Lysenko I., Senior R. A., Bo" rger L., Bennett D. J., Choimes A., Collen B., Day J., De Palma A., Diaz S., Echeverria-Londoño S., Edgar M. J., Feldman A., Garon M., Harrison M. L. K., Alhousseini T., Ingram D. J., Itescu Y., Kattge J., Kemp V., Kirkpatrick L., Kleyer M., Correia D. L. P., Martin C. D., Meiri S.,

Novosolov M., Pan Y., Phillips H. R. P., Purves D. W., Robinson A., Simpson J., Tuck S. L., Weiher E., White H. J., Ewers R. M., Mace G. M., Scharlemann J. P. W., Purvis A., (2015) Global effects of land use on local terrestrial biodiversity. *Nature*, 520, 45–50.

Noctor G., Foyer C., (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Reviews Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 49, 249–79.

Noyes P. D., McElwee M. K., Miller H. D., Clark B. W., Van Tiem L. A., Walcott K. C., Erwin K. N., Levin E. D., (2009) The toxicology of climate change: environmental contaminants in a warming world. *Environment International*, 35, 971-986.

Ortiz A. M. D., Outhwaite C. L., Dalin C., Newbold T., (2020) A review of the interactions between biodiversity, agriculture, climate change, and international trade: research and policy priorities. *One Earth*, 4, 88-101.

Özkara A., Akyil D., Konuk M., (2016) Pesticides, environmental pollution, and health. In: Larramendy, M. L., Soloneski, S., (2016) Environmental health risk-hazardous factors to living species. *IntechOpen*. London, UK.

Paduchuri P., Gohokar S., Thamke B., Subhas M., (2010) Transgenic tomatoes-a review. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 1, 69-72.

Pandey V., Patel A., Patra D. D., (2016) Integrated nutrient regimes ameliorate crop productivity, nutritive value, antioxidant activity and volatiles in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Industrial Crops and Products*, 87, 124–131.

Raiola A., Rigano M. M., Calafiore R., Frusciantè L., Barone A., (2014) Enhancing the health-promoting effects of tomato fruit for biofortified food. *Mediators of Inflammation*, 16.

Rapa M., Ciano S., Ruggieri R., Vinci G., (2021) Bioactive compounds in cherry tomatoes (*Solanum Lycopersicum* var. *Cerasiforme*): Cultivation techniques classification by multivariate analysis. *Food Chemistry*, 355, 129630.

Razdan M. K., Mattoo A. K., (2007) Genetic improvement of Solanaceous crops. In: Handa A. K., Srivastava A., Perla V. Hormonal control of fruit maturation. 1° ed., *CRC Press*, 2, 313.

Reganold J. P., Wachter J. M., (2016) Organic agriculture in the twenty-first century. *Nature Plants*, 2, 15221.

Sahoo S., Awasthi J. P., Ramanjulu Sunkar R., Panda S. K., (2017) Determining glutathione levels in plants. *Methods in Molecular Biology*, 1631, 273-277.

Sainju U. M., Dris R., Singh B., (2003) Mineral nutrition of tomato. *Food, Agriculture & Environment*.

Sen S., Chakraborty R., (2011) The role of antioxidants in human health. In: Silvana Andreescu S., Hepel M. (2011) Oxidative stress: diagnostics, prevention, and therapy. *ACS Symposium Series, American Chemical Society*, 1, 1-37. Washington, DC.

Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y., Yoshimura K., (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1305–1319. **Simpson M. G. (2010)** Plant systematics. 2° ed. *Academic Press*, 416.

Smirnoff N., (2000) Ascorbic acid: metabolism and functions of a multifaceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 229-235.

Turroni S., Petracci E., Edefonti V., Giudetti A. M., D'Amico F., Paganelli L., Giovannetti G., Del Coco L., Fanizzi F. P., Rampelli S., Guerra D., Rengucci C., Bulgarelli J., Tazzari M., Pellegrini N., Ferraroni M., Nanni O., Serra P., (2021) Effects of a diet based on foods from Symbiotic Agriculture on the Gut Microbiota of subjects at risk for Metabolic Syndrome. *Nutrients*, 13, 2081.

van Doorn W., Ketsa S., (2014) Cross reactivity between ascorbate peroxidase and phenol (guaiacol) peroxidase. A review. *Postharvest Biology and Technology*, 95, 64–69.

Yadav P., Yadav T., Kumar S., Rani B., Kumar S., Jain V., Mahlotra S. P., (2015) Partial purification and characterization of ascorbate peroxidase

from ripening ber (*Ziziphus mauritiana* L.) fruits. *African Journal of Biotechnology*, 13, 3323-3331.

Zamocky M., Furtmüller P. G., Obinger C., (2008) Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxidant and Redox Signalling*, 10, 9.

Zhang H., Blumwald E., (2001) Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotechnology*, 19, 765-768.

RINGRAZIAMENTI

Questo progetto è stato realizzato grazie alla collaborazione di più persone: innanzitutto ringrazio la professoressa Paola Irato che mi ha dato l'opportunità di svolgere questo stage e mi ha insegnato come deve essere svolto uno studio sperimentale e come reagire quando ci si trova di fronte alle difficoltà; il professor Michele Zanata, del Liceo Scientifico Leonardo da Vinci di Treviso che ha proposto questo tipo di tesi e mi ha fornito il materiale con il quale ho svolto il lavoro. Ringrazio anche Luigino e Giuseppe che mi hanno fornito i loro frutti di pomodoro per poter avere il confronto con colture differenti e ringrazio Matteo, Luca, Nicola e Francesca che hanno speso il loro tempo per fare il test organolettico.

Colgo l'occasione per ringraziare soprattutto la famiglia per avermi permesso di frequentare l'università e per avermi aiutata a fare questo tirocinio oltre che essere supportata e spronata a non mollare.