

Identificazione dell'origine geografica di agrumi tipici siciliani

Margherita Amenta, Simona Fabroni e Paolo Rapisarda

Consiglio per la Ricerca e Sperimentazione in Agricoltura - ACM Centro di Ricerca per l'Agrumicoltura e le Colture Mediterranee, Acireale (CT)

Identification of the geographical origin of Sicilian typical citrus fruits

Abstract. The present research deals with the valorisation of Sicilian typical citrus fruits, primarily "Arancia Rossa di Sicilia PGI" and "Limone di Siracusa PGI", through the identification of the geographical origin and the control of the authenticity by using innovative analytical techniques. The research aimed at creating a representative and statistically valid database of citrus fruits whose geographical origin was authenticated by samplings specifically made in the areas under investigation. Physicochemical parameter and near-infrared spectroscopy (NIR) combined with multivariate analysis such as PCA and LDA were used as a tool to discriminate between PGI and non-PGI Sicilian typical citrus fruits. The results demonstrated the potential use of this method to discriminate these production according to their geographical origin.

Key words: *Citrus sinensis* L. Osbeck, *Citrus limon* (L.) Burm. f., orange fruit, lemon fruit, Tarocco, Femminello siracusano, NIR, traceability, multivariate analysis.

Introduzione

La Sicilia si caratterizza per una naturale vocazione verso la coltivazione degli agrumi, come dimostra l'ampio panorama di specie e varietà presenti nella regione. Per quanto riguarda l'arancio, le cultivar a polpa rossa Tarocco, Moro e Sanguinello sono le più diffuse anche se negli ultimi vent'anni la selezione varietale e le scelte produttive hanno premiato esclusivamente la cultivar Tarocco. Le arance pigmentate sono coltivate prevalentemente nella Sicilia orientale in un'area posta a sud dell'Etna tra le provincie di Catania, Enna e Siracusa. I frutti di queste varietà sono apprezzati sui mercati nazionali ed esteri per le loro proprietà organolettiche, nutrizionali e salutistiche; qualità distintive che hanno portato l'Unione Europea a concedere nel 1996 il riconoscimento

dell'IGP "Arancia Rossa di Sicilia"(Reg. CE 1107 - 12 giugno 1996).

Anche la limonicoltura siciliana possiede delle eccellenze varietali presenti in alcuni territori vocati della regione dove le condizioni pedoclimatiche permettono ai frutti di raggiungere standard qualitativi elevati. In particolare, il limone "Femminello siracusano", apprezzato per il suo aroma unico, l'elevata acidità e la straordinaria ricchezza di succo, ha recentemente ottenuto il riconoscimento IGP con la denominazione "Limone di Siracusa" (Reg CE 96-2011).

Nonostante l'agrumicoltura siciliana esprima prodotti di qualità, attualmente mostra notevoli criticità legate, tra l'altro, alla bassa competitività sul fronte dei prezzi rispetto alle produzioni estere, alla scarsa propensione all'innovazione ed alla polverizzazione dell'offerta. Tra le opportunità per il rilancio di questo comparto vi è la possibilità di differenziare il prodotto di qualità, sui mercati nazionali ed esteri, sfruttando, da un lato il riconoscimento comunitario IGP e dall'altro implementando un sistema di tutela della loro autenticità per fornire al consumatore la massima garanzia sulla qualità e origine dei prodotti ed evitare nel contempo eventuali frodi alimentari.

Il crescente interesse dei consumatori per i prodotti tipici con garanzia di qualità ha spinto la ricerca verso l'individuazione di tecniche analitiche innovative da utilizzare quale strumento di classificazione e verifica dell'origine e della tipicità di tali prodotti alimentari. Per effettuare indagini sugli aspetti relativi alla provenienza degli alimenti, è fondamentale considerare tutti i fattori che possano avere avuto un'influenza sulla composizione e sulle caratteristiche globali del prodotto. E' quindi possibile ricorrere a più strumenti d'indagine, ad esempio analisi chimiche e spettroscopiche, in modo da sfruttare l'informazione legata ad aspetti diversi della natura degli alimenti studiati.

I metodi chimici sono applicati principalmente per la valutazione dei parametri classici della qualità, dei principi nutrizionali e salutistici e sono stati, negli anni, standardizzati con procedure ufficialmente accettate.

La spettroscopia NIR (*Near InfraRed*) è considerata un utile metodo per la valutazione della qualità e dell'autenticità e dell'origine geografica di un alimen-

* paolo.rapisarda@entecra.it

to (Manley *et al.* 2008). Questa tecnica, si basa sull'assorbimento delle radiazioni elettromagnetiche a lunghezze d'onda comprese tra 780 e 2.500 nm (12.820 e 4.000 cm^{-1}). Le bande di assorbimento che danno origine allo spettro caratteristico del campione (fingerprint) sono attribuite alle combinazioni di vibrazioni fondamentali relative ai gruppi funzionali presenti nelle biomolecole che compongono l'alimento. Le suddette bande sono molto ampie e sovrapposte, pertanto per processare i dati relativi alle informazioni spettrali è richiesto l'uso della chemiometria.

La presente ricerca mira alla implementazione di un sistema per la certificazione dell'origine geografica e la tracciabilità di frutti di "Arancia Rossa di Sicilia IGP" e di "Limone di Siracusa IGP" mediante la valutazione di parametri chimico-fisici, NIR e l'impiego di tecniche chemiometriche.

Materiali e metodi

Campionamenti

Lo studio è stato condotto in un periodo di due anni (2010-2011) su frutti di arancio cv "Tarocco" provenienti da aziende agrumicole site nella zona di produzione ad indicazione geografica protetta dell'"Arancia Rossa di Sicilia" (n=25), in particolare nelle province di Catania, Siracusa e Ragusa. Nel corso dell'ultimo anno (2011), inoltre, i frutti sono stati campionati anche in aree diverse da quelle citate nei disciplinari di produzione, in particolare in Calabria e Basilicata (n=11). In ogni azienda sono stati raccolti, da 3-5 piante, 50-60 frutti a maturazione commerciale (SST/AT > 8); successivamente questi sono stati suddivisi in tre sub-campioni su ognuno dei quali sono state effettuate le analisi.

Nel corso dello stesso biennio (2010-2011) sono stati campionati frutti di limone cv "Femminello siracusano" in aziende locate nella zona di produzione ad indicazione geografica protetta del "Limone di Siracusa" (n=32). Nell'anno 2011, inoltre, i frutti sono stati campionati anche in aree diverse da quelle citate nei rispettivi disciplinari di produzione e precisamente nel territorio di Acireale (CT) e nelle province di Palermo e Ragusa (n=18). In ogni azienda sono stati campionati, a maturazione, 50-60 frutti da 3-5 piante che sono stati successivamente suddivisi in tre sub-campioni sui quali sono state effettuate le analisi.

Qualità dei frutti

I parametri chimico-fisici quali peso frutti, resa in succo, acidità totale (AT), pH e solidi solubili totali (SST), sono stati determinati secondo metodi standard (Kimbal, 1991). La determinazione del contenuto di

acido ascorbico (AA) è stata effettuata mediante HPLC (Rapisarda, Intelisano, 1996), utilizzando un cromatografo liquido Waters mod. 600E interfacciato ad un rivelatore PDA Waters 996 e gestito dal software Millennium 32 Waters. La colonna impiegata è stata una C18 Hypersil 250 mm x 4,6 mm d.i., 5 μm (Phenomenex, Torrence, CA) mantenuta alla temperatura di 35 °C e l'eluizione è stata eseguita con acido fosforico 0,02 M ad un flusso di 1,0 ml/min. La lunghezza d'onda di rivelazione è stata fissata a 260 nm. Le antocianine, espresse come mg/l di cianidina-3-glucoside, sono state determinate spettrofotometricamente (Varian UV-Vis spectrophotometer mod. Cary 100 Scan) secondo il metodo del pH differenziale (Rapisarda *et al.*, 2000).

Acquisizione degli spettri NIR

L'acquisizione degli spettri NIR è stata eseguita come descritto da Rodriguez-Saona *et al.* (2001), con opportune modifiche ed integrazioni. In breve, 600 μl di succo sono stati versati su un filtro in microfibra di vetro (Whatmanglass microfibre filter \varnothing 25 mm) posto all'interno di una piastra Petri (\varnothing 25 mm). I campioni sono quindi stati posti in stufa ventilata per 24 h alla temperatura di 35 ± 1 °C. Successivamente gli spettri NIR sono stati registrati usando uno spettrometro Spectrum 100 N (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts) nell'intervallo compreso fra 10.000 e 4.000 cm^{-1} , ad intervalli di 2 cm^{-1} . Le misurazioni sono state eseguite in riflettanza diffusa grazie all'impiego di una sfera di integrazione. Gli spettri raccolti sono quindi stati deconvoluti dal software Spectrum in coordinate cartesiane. Tutti i campioni sono stati analizzati in triplo.

Analisi statistica dei dati

I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica univariata utilizzando il software STATISTICA 6.0 (Statsoft Inc. 2003) e multivariata utilizzando il pacchetto statistico SPSS 18.0 (IBM, 2009). In particolare, i dati sono stati elaborati mediante analisi della varianza (ANOVA) e le medie sono state separate con test di Tukey. L'approccio multivariato è stato eseguito mediante l'analisi dei componenti principali (PCA) e l'analisi discriminante lineare (LDA).

Risultati e discussione

Nella tabella 1 sono riportati i dati relativi ai parametri qualitativi determinati sui frutti di arancio cv "Tarocco", prelevati in aziende localizzate nella zona di produzione dell'Arancia Rossa di Sicilia IGP ed in areali non-IGP. La resa in succo, l'acidità totale e i

Tab. 1 - Parametri fisico-chimici, contenuto in acido ascorbico e antocianine totali in frutti di arancio cv "Tarocco" provenienti da aree IGP e non-IGP.

Tab. 1 - *Physico-chemical parameters, ascorbic acid and total anthocyanins content in orange fruits cv "Tarocco" sampled in PGI and non-PGI areas.*

Zona di produzione	Peso medio (g)	Resa in succo (%)	pH	AT ^a (%)	SST ^a (%)	AA ^a (mg/100 ml)	Antocianine totali (mg/l)
IGP	238,42 ns	55,05 A	3,69 ns	1,11A	11,51 A	62,99 ns	39,77 A
non-IGP	246,25 ns	45,12 B	3,67 ns	0,97B	10,47 B	62,37 ns	8,44 B

Significatività: lettere minuscole $p \leq 0,05$; lettere maiuscole $p \leq 0,001$; ns, non significativo

^(a) AT, acidità totale; SST, solidi solubili totali; AA, acido ascorbico

solidi solubili totali hanno mostrato valori significativamente più elevati ($p \leq 0,001$) nei campioni provenienti dalle zone IGP rispetto a quelli non-IGP. Anche la pigmentazione antocianica è risultata significativamente maggiore ($p \leq 0,001$) nei frutti campionati nelle aree IGP. La zona di provenienza non ha invece influito sui valori del peso medio dei frutti e sulla concentrazione di acido ascorbico.

Gli spettri NIR dei differenti succhi di Tarocco IGP e non-IGP (fig. 1), acquisiti nell'intervallo spettrale compreso fra 10.000 e 4.000 cm^{-1} , hanno permesso di collezionare, per ogni campione, 3001 valori di assorbanza, registrati ad intervalli di 2 cm^{-1} . L'applicazione della suddetta tecnica dà origine a spettri complessi e difficili da analizzare per l'elevato numero di dati (assorbimenti) che si ottengono. L'Analisi delle Componenti Principali (PCA) è un metodo statistico di analisi multivariata che consente di ridurre la dimensionalità dell'insieme dei dati relativi ad un elevato numero di variabili altamente correlate e di sostituirle con un minor numero di nuove variabili (componenti principali) tra loro non correlate e legate linearmente alle variabili di partenza. L'applicazione della PCA ha permesso di ridurre le dimensioni dei dati a un piccolo numero di componenti (5 componenti principali) che spiegavano il

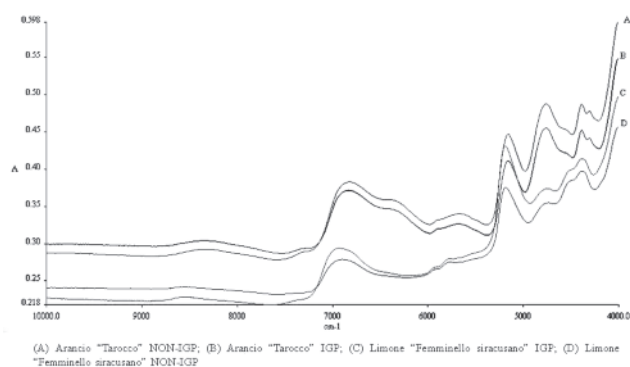


Fig. 1 - Spettri NIR di alcuni campioni di frutti di arancio cv "Tarocco" e di limone cv "Femminello siracusano" provenienti da aree IGP e non-IGP.

Fig. 1 - *NIR spectra of randomly-selected "Tarocco" orange and "Femminello siracusano" lemon fruits sampled in PGI and non-PGI areas.*

99,98 % della varianza dei dati originali. I punteggi fattoriali delle 5 componenti principali sono stati quindi impiegati, insieme ai parametri chimico-fisici dei frutti valutati, come variabili per l'esecuzione della Analisi Discriminante Lineare (LDA). La LDA è una tecnica di classificazione la quale presuppone che p variabili (quantitative) siano state misurate su osservazioni appartenenti a due o più gruppi con lo scopo di trovare una o più combinazioni lineari dei parametri che permettano di discriminare in maniera ottimale fra i vari gruppi. Il criterio della LDA per la selezione delle variabili latenti è la massima differenziazione tra i gruppi e la riduzione al minimo della varianza entro gruppi. Il metodo produce un numero di funzioni ortogonali discriminanti lineari, pari al numero dei gruppi meno uno, che permettono ai campioni di essere classificati in uno o nell'altro gruppo.

La combinazione lineare delle variabili prese in considerazione in questo studio ha quindi permesso di valutare la possibilità di differenziare le produzioni IGP da quelle non-IGP (gruppi). La LDA ha generato una sola funzione discriminante, altamente significativa al test Lambda di Wilks ($p \leq 0,0001$), fornendo una soddisfacente separazione fra i due gruppi. Nella figura 2 è riportata una rappresentazione grafica dei casi osservati in funzione dei punteggi discriminanti ottenuti. I coefficienti standardizzati della funzione discriminante hanno infine mostrato che i parametri che hanno avuto maggior peso nella differenziazione dei due gruppi sono stati la resa in succo (0,628), i SST (0,608), l'acido ascorbico (0,502) e le antocianine totali (0,403).

I risultati della classificazione hanno messo in evidenza che la LDA ha permesso la classificazione corretta dell'82,8% dei casi IGP e del 91% dei non-IGP.

La zona di produzione dell' "Arancia Rossa di Sicilia IGP" comprende numerosi comuni della Sicilia orientale situati a S-SO dell'Etna tra le province di Catania, Siracusa, Ragusa ed Enna. Nell'ambito della presente ricerca i campionamenti effettuati in aziende localizzate all'interno di tre macrozone IGP, e precisamente nelle province di Catania, Siracusa e Ragusa sono stati confrontati allo scopo di valutare se esisto-

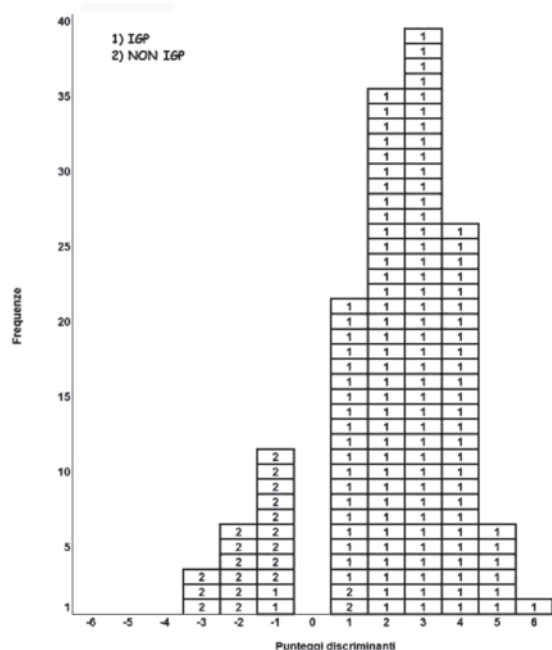


Fig. 2 - Discriminazione della zona di produzione di frutti di arancio cv. "Tarocco" in funzione dei punteggi della funzione discriminante canonica generata dalla LDA.

Fig. 2 - Differentiation of the production area in orange fruits cv. "Tarocco" as represented by the scores of the discriminating function generated by the LDA.

no differenze qualitative tra i frutti prodotti nelle diverse macrozone ricadenti sempre all'interno dell'area IGP. A tal fine è stata applicata la stessa metodologia statistica per ricavare informazioni sull'esistenza di gruppi omogenei all'interno della suddetta area. In particolare, i dati raccolti (chimico-fisici e NIR) sono stati elaborati applicando una LDA. La combinazione lineare delle variabili considerate ha permesso di evidenziare che le due funzioni discriminanti canoniche generate hanno spiegato il 100% della varianza dei dati originali. I punteggi delle due funzioni discriminanti rappresentati in figura 3 mostrano una discriminazione fra le diverse macrozone di produzione IGP. In particolare, mediante la funzione 1, che spiega il 71,2% della varianza, è stato possibile discriminare nettamente i campioni prelevati nelle province di CT e SR da quelli provenienti dalla provincia di RG e mediante la funzione 2 (28,8% della varianza), i campioni della provincia di SR da quelli della provincia di CT.

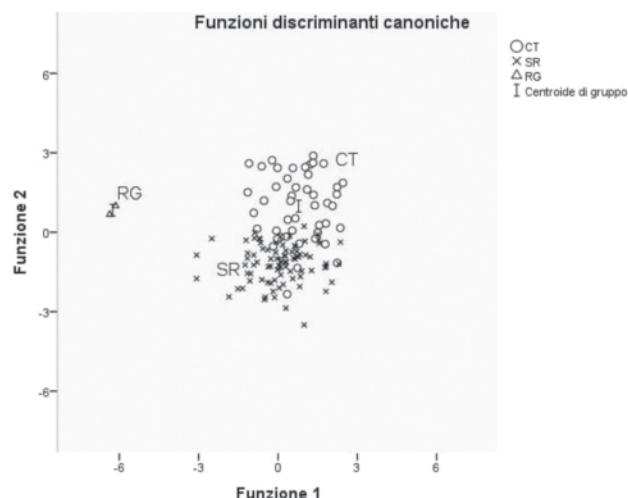


Fig. 3 - Discriminazione della macrozona di produzione di frutti di arancio cv. "Tarocco" IGP in funzione dei punteggi delle funzioni discriminanti canoniche generate dalla LDA.

Fig. 3 - Differentiation of the PGI area in orange fruits cv. "Tarocco" as represented by the scores of the discriminating functions generated by the LDA.

I risultati delle determinazioni chimico-fisiche e qualitative di frutti di limone cv "Femminello siracusano", campionati in aziende afferenti al Consorzio di tutela "Limone di Siracusa" localizzate nell'area dell'IGP, nonché in areali non ricadenti in zone IGP, sono riportati nella tabella 2. Tra i parametri determinati, il peso medio ($p \leq 0,001$), la resa in succo ($p \leq 0,001$), l'AT ($p \leq 0,001$) e i SST ($p \leq 0,005$) hanno mostrato differenze statisticamente significative, con valori più elevati nei campioni provenienti dalle zone di produzione non-IGP rispetto a quelli IGP. La concentrazione di acido ascorbico è risultata invece significativamente più elevata ($p \leq 0,001$) nei frutti campionati in areali IGP.

L'applicazione della tecnica NIR sui succhi di limone IGP e non-IGP ha permesso di collezionare, per ogni campione, 3001 valori di assorbanza che sono stati usati come variabili in una preliminare analisi delle componenti principali (PCA). I punteggi fattoriali delle 5 componenti principali derivati dalla PCA, che spiegavano il 99,98 % della varianza dei dati originali, sono stati usati insieme ai risultati delle determinazioni chimico-fisiche, come variabili per l'esecuzione dell'Analisi Discriminante Lineare

Tab. 2 - Parametri fisico-chimici e contenuto in ac. ascorbico in frutti di limone cv "Femminello siracusano" provenienti da aree IGP e non-IGP. Tab. 2 - Physico-chemical parameters and ascorbic acid content in lemon fruits cv "Femminello siracusano" sampled in PGI and not-PGI areas.

Zona di produzione	Peso medio (g)	Resa in succo (%)	pH	AT ^a (%)	SST ^a (%)	AA ^a (mg/100 ml)
IGP	163,47 B	30,02 B	2,91 ns	5,29 B	7,49 b	38,99 A
non-IGP	195,22 A	36,72 A	2,95 ns	5,87 A	7,74 a	35,02 B

Significatività: lettere minuscole $p \leq 0,05$; lettere maiuscole $p \leq 0,001$; ns, non significativo.

^(a) AT, acidità totale; SST, solidi solubili totali; AA, acido ascorbico

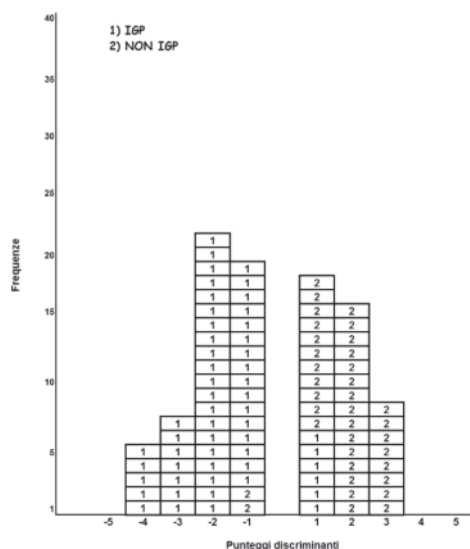


Fig. 4 - Discriminazione della zona di produzione di frutti di limone cv. "Femminello siracusano" in funzione dei punteggi della funzione discriminante canonica generata dalla LDA.

Fig. 4 - Differentiation of the production area in lemon fruits cv. "Femminello siracusano" as represented by the scores of the discriminating function generated by the LDA.

(LDA) al fine di valutare la possibilità di differenziare le produzioni IGP da quelle non-IGP. La LDA ha generato una sola funzione discriminante altamente significativa. In figura 4 è riportata una rappresentazione grafica dei casi osservati in funzione dei punteggi della funzione discriminante canonica, da cui si evince una buona separazione dei due gruppi. I risultati della classificazione hanno messo in evidenza che la LDA è riuscita a classificare correttamente l'88% dei casi IGP e il 92% dei casi non-IGP.

Dall'analisi dei coefficienti standardizzati della funzione discriminante canonica è emerso che i parametri che più hanno influito sulla discriminazione fra gruppi sono stati l'acidità totale (1,264) ed il contenuto in acido ascorbico (0,724).

Conclusioni

I risultati ottenuti in questo studio hanno dimostrato che l'impiego congiunto di marker chimici e parametri spettroscopici offre la possibilità di discriminare i frutti di agrumi prodotti in zone IGP da quelli non-IGP. Inoltre, l'utilizzo dei parametri chimici e spettroscopici in combinazione con l'analisi chemiometrica quale PCA e LDA costituisce uno strumento importante ai fini della tracciabilità e per accertare l'origine geografica dei frutti delle due produzioni tipiche della Sicilia: "Arancia Rossa di Sicilia IGP" e "Limone di Siracusa IGP". In particolare, utilizzando le funzioni di classificazione di ogni gruppo (dati non riportati) è

stato dimostrato che l'83% dei casi per il Tarocco e l'88% dei casi per "Limone di Siracusa" è risultato correttamente classificato nel gruppo di appartenenza. In entrambi i casi quindi, il metodo utilizzato in questo studio ha esplicitato una netta discriminazione fra frutti prelevati in aziende localizzate negli areali IGP da quelli di provenienza non-IGP. Ulteriori studi mirati alla determinazione dei rapporti isotopici (δ) degli elementi leggeri (H, O, C, N) con particolare riferimento a quelli legati all'origine delle falde acquifere ($\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$) o alla fotosintesi ($\delta^{13}\text{C}$), forniranno ulteriori *tools* analitici utili alla discriminazione della zona d'origine delle produzioni agrumicole tipiche siciliane.

Riassunto

La ricerca è stata mirata alla valorizzazione e all'identificazione geografica di origine di frutti di agrumi tipici siciliani, con particolare riferimento alle produzioni "Arancia Rossa di Sicilia IGP" e "Limone di Siracusa IGP", attraverso una combinazione di tecniche analitiche innovative e metodi chemiometrici. In particolare, è stato costruito un database rappresentativo formato da parametri qualitativi e spettroscopici (NIR) rilevati nel succo dei campioni prelevati in aree IGP e non-IGP. L'applicazione dell'analisi multivariata (PCA e LDA), ha permesso di individuare i legami con il territorio dei prodotti presi in considerazione, avviando così il primo esperimento per l'implementazione di un sistema per la certificazione dell'origine geografica e la tracciabilità di frutti di "Arancia rossa di Sicilia IGP" e di "Limone di Siracusa IGP".

Parole chiave: *Citrus sinensis* L. Osbeck, *Citrus limon* (L.) Burm. f., arance, limoni, Tarocco, Femminello siracusano, NIR, tracciabilità, analisi multivariata.

Bibliografia

- MANLEY M., DOWNEY G., BAETEN V. 2008. *Spectroscopic Technique: Near-infrared (NIR) Spectroscopy*. In Modern Techniques for Food Authentication. Da-Wen Sun Ed. Academic Press, Park Av. South, New York, USA: 65-115.
- KIMBAL D., 1991. *Citrus Processing. Quality Control and Technology*. AVI Books (New York).
- RAPISARDA P., INTELISANO S., 1996. *Sample preparation for vitamin C analysis of pigmented orange juices*. Ital. J. Food Sci.,3: 251-256.
- RAPISARDA P., FANELLA F., MACCARONE E., 2000. *Reliability of analytical method for determining anthocyanins in blood orange juice*. J. Agric. Food Chem., 48: 2249-2252.
- RODRIGUEZ-SAONA L.E., FRY F.S., MCLAUGHLIN M.A., CALVEY E.M., 2001. *Rapid analysis of sugars in fruit juices by FT-NIR spectroscopy*. Carbohydrate Research, 336: 63-74.

Discriminazione dell'origine geografica di arance bionde siciliane e calabresi attraverso la distribuzione degli amminoacidi liberi

Fabio Licciardello, Giuseppe Muratore e Giovanni Spagna

Dipartimento Scienze e Produzioni Agrarie e alimentari, Sezione Scienze Agroalimentari e Ambientali, Università di Catania

Discrimination of the geographical origin of Sicilian and Calabrian blonde oranges based on the free aminoacid distribution

Abstract. The study considered the free aminoacid distribution of orange juices as criterion to discriminate the geographical origin of Sicilian and Calabrian oranges. The aminoacidic profiles of 70 blonde and pigmented orange samples were determined by HPLC-FL. Experimental data were elaborated with descriptive and multivariate statistical treatments. The total free aminoacid content, together with the level of single aminoacids such as proline, arginine, aspartic acid, asparagines, serine and glicine, can be considered as a marker of the geographical provenance, able to discriminate Sicilian and Calabrian blonde varieties.

Key words: arginine, marker, orange juice, proline, traceability.

Introduzione

Gli amminoacidi sono una delle più importanti classi di composti naturali in quanto prendono parte in molti processi fisiologici essenziali. Uno di questi è la costruzione di peptidi e proteine, in cui prendono parte venti a-amminoacidi. Pertanto, amminoacidi liberi si ritrovano in molti tessuti biologici come negli alimenti. I costituenti azotati sono la porzione maggiore dei solidi non-glucidici nel succo d'arancia. Fino al 10% dei solidi solubili del succo d'arancia contiene azoto in una delle sue numerose forme organiche e inorganiche. Diverse delle forme organiche, come amminoacidi, proteine e vitamine, hanno importanza nutrizionale. Più del 70% del dell'azoto solubile totale nei succhi d'agrumi è presente sotto forma di amminoacidi liberi.

Gli amminoacidi liberi più rappresentati nei succhi d'arancia sono prolina, asparagina, arginina, acido γ -

aminobutirrico (GABA), acido aspartico, serina e acido glutammico (Wallrauch e Faethe, 1988; Fang, 1988; Aristoy *et al.*, 1989; Naullet *et al.*, 1997) che, assieme, costituiscono mediamente circa l'80-90% del totale. Differenze nel profilo amminoacidico dei succhi d'arancia possono essere attribuite a vari fattori, tra cui livello di maturazione, pratiche colturali, varietà, trattamenti tecnologici e origine geografica. Pertanto la composizione amminoacidica è stata utilizzata come indicatore dell'adulterazione dei succhi d'arancia, attraverso diluizione con acqua e aggiunta di zucchero e acido citrico, oppure miscelazione con altre tipologie di succo (Aristoy *et al.*, 1989; Gomez-Ariza *et al.*, 2005), come indicatore della provenienza del succo da concentrato o del trattamento termico subito (Del Castillo *et al.*, 1998; Gomez-Ariza *et al.*, 2005) e, infine, come marker della zona di provenienza (Naullet *et al.*, 1997; Wallrauch e Faethe, 1988).

L'individuazione di parametri compositivi che possano essere correlati con l'origine dei prodotti alimentari rappresenta uno dei campi cui la ricerca scientifica dedica maggiori sforzi. La ricerca di marker compositivi ha condotto in passato alla differenziazione di succhi d'arancia rossi e biondi sulla base dei profili delle antocianine (Maccarone *et al.*, 1998b; Rapisarda *et al.*, 2000), della distribuzione degli acidi idrossicinnamici (Rapisarda *et al.*, 1998; Di Mauro *et al.*, 2002), dei componenti volatili (Maccarone *et al.*, 1998a) e degli acidi grassi (Arena *et al.*, 1998). Altri studi condotti sulla discriminazione dell'origine geografica di succhi d'arancia, sono fondati sulla composizione amminoacidica (Naullet *et al.*, 1997), sul profilo dei carotenoidi (Mouly *et al.*, 1999), sulla distribuzione dei flavonoidi glucosidi (Rouseff, 1988; Mouly *et al.*, 1998). In particolare, la distribuzione degli acidi idrossicinnamici (Di Mauro *et al.*, 2002) si è rivelata uno strumento efficace per differenziare l'origine dei succhi rossi, ma inefficace per l'accertamento della provenienza di quelli biondi.

L'interesse crescente per l'accertamento dell'origine geografica dei prodotti alimentari è legato essenzialmente alla necessità di tutelare prodotti a denominazione di origine e a smascherare frodi commerciali.

* fabio.licciardello@unict.it

I metodi disponibili pubblicato sull'argomento sono spesso costosi e complessi, e la loro robustezza è opinabile in considerazione della forte variabilità delle matrici biologiche alimentari. Inoltre i metodi disponibili sono stati sviluppati per la differenziazione di prodotti di provenienza molto diversa, attuando confronti intercontinentali (per es. tra agrumi prodotti in Israele e in Argentina o Spagna o Italia), mentre nessuno studio è stato condotto al fine di differenziare produzioni di provenienza meno lontana, come nel caso di regioni limitrofe.

Il presente lavoro s'inquadra nella prospettiva di valorizzare le produzioni isolate con l'obiettivo di distinguere l'origine geografica dei succhi di arancia siciliani da quelli calabresi, mediante la determinazione degli amminoacidi liberi.

Materiali e metodi

Campionamento

Settanta campioni di arance siciliane e calabresi (4-5 kg per ciascun campione) di differente varietà sono stati raccolti a maturazione commerciale durante la stagione produttiva 2007-2008, da Dicembre a Maggio. I campioni sono ripartiti in quattro categorie:

- varietà bionde siciliane (Navelina, Washington Navel, Ovale e Valencia) per un totale di 20 campioni;
- varietà bionde calabresi (Navelina, Washington Navel e Biondo comune) per un totale di 16 campioni;
- varietà rosse siciliane (Tarocco e Moro) per un totale di 27 campioni;
- varietà rosse calabresi (Tarocco e Moro) per un totale di 7 campioni.

Il succo appena estratto è stato congelato, per poi essere scongelato e centrifugato per le determinazioni analitiche.

Preparazione dei campioni

I campioni di succo sono stati scongelati e centrifugati. Il metodo Waters ACCQ-TAG, con opportune modifiche, è stato impiegato per la preparazione dei campioni e viene qui di seguito descritto brevemente.

Un millilitro di surnatante è stato aggiunto a 0.5 ml di standard interno (acido α -aminobutirrico, α -ABA) 4mM, ed è stato diluito 10 volte con HCL 0.1 M. Dieci millilitri di ciascun campione sono poi stati trasferiti in tubi in vetro e mescolati con 70 μ l di tampone borato e con 20 μ l di reagente, previamente ricostituito secondo le istruzioni del produttore. La miscela di reazione è stata condizionata in bagno termostato a 55 °C per 10 minuti al fine di facilitare la

derivatizzazione, per poi essere iniettata nel sistema HPLC.

Determinazione cromatografica degli amminoacidi liberi

Il sistema HPLC è stato un Thermo Finnigan Spectra System P2000, provvisto di colonna Novapak C₁₈ (150 x 3,9 mm, 4 μ m particle size) e di loop da 10 μ l. Le condizioni dell'analisi cromatografica sono state le seguenti:

- Eluente A: Waters Eluent A (tampone acquoso) concentrato, diluito 10 volte con acqua ultra pura e portato a pH 5.80 con NaOH;
 - Eluente B: Acetonitrile/H₂O 60:40 (v/v)
- La colonna è stata termostata a 37 °C.

La separazione cromatografica è stata condotta a 1 ml/min secondo il seguente programma di eluzione: 0-10 min, 100% A; 11 min, 98% A; 25 min, 95% A; 34 min, 91% A; 36 min, 90% A; 40 min, 86% A; 45 min, 84% A; 50 min, 82% A; 60 min, 76 % A; 65 min, 67% A; 67-71 min, 0% A. La colonna è stata riequilibrata per 5 min con eluente A prima di ciascuna analisi.

La rivelazione è stata condotta con rivelatore fluorimetrico FL 3000, impostando la lunghezza d'onda di eccitazione a 250 nm e quella di emissione a 395 nm.

La quantificazione è stata condotta mediante calibrazione esterna utilizzando curve di calibrazione ottenute con appropriate diluizioni di standard commerciali (Sigma Aldrich, Milano).

Risultati e discussione

Uno studio condotto da Di Mauro *et al.* (2002) ha dimostrato che la distribuzione degli acidi idrossicinnamici può essere considerata un valido criterio per discriminare i succhi rossi siciliani da quelli provenienti da altre regioni italiane (con particolare riferimento a quelli calabresi). L'acido p-cumarico, in particolare, si ritrova nelle arance rosse siciliane a concentrazioni più elevate rispetto a frutti di altre regioni italiane, mentre nessuna differenza significativa è stata osservata tra succhi non pigmentati delle diverse regioni. Anche il rapporto (ferulico+sinapico)/(p-cumarico+caffaico) è un importante parametro in grado di discriminare i succhi rossi: il suo valore risulta 1.5 in quelli siciliani, superiore a 2 in quelli di altre regioni. Purtroppo tali considerazioni non valgono per i succhi non pigmentati, per cui è nata l'esigenza di valutare un diverso marker dell'origine geografica.

Complessivamente i risultati relativi ai profili degli amminoacidi liberi risultano in linea con i dati riportati in letteratura (Wallrauch e Faethe, 1988;

Fang, 1988; Naulet *et al.*, 1997). Si è osservata, infatti, la netta prevalenza della prolina, seguita da arginina, acido aspartico, serina e GABA, che assieme costituiscono mediamente oltre l'80% del totale degli aminoacidi liberi. La figura 1 mostra il profilo medio degli aminoacidi liberi tra tutti i campioni, a confronto con la letteratura sopra citata. I contenuti percentuali dei singoli aminoacidi nei succhi biondi siciliani e calabresi sono simili, attestandosi su un 35-36% per la prolina, 22-25% per l'arginina, 7-8% per GABA, acido aspartico e serina, e 3-5% per asparagina e glutammica. Pertanto eventuali differenze tra i succhi biondi di diversa provenienza non vanno ricercate nei contenuti relativi, piuttosto nei valori assoluti.

Il contenuto totale di aminoacidi liberi nei 70 campioni (fig. 2) evidenzia delle differenze statisticamente significative tra le categorie di succhi, mentre non concorre a discriminare i succhi rossi delle due aree geografiche. In particolare, tale livello ammonta a 30,74 mmol/l nelle arance siciliane non pigmentate, circa il 27% in più rispetto ai campioni calabresi il cui valore medio risulta pari a 22,49 mmol/l. Da notare come tale parametro per i succhi biondi calabresi risulti pressoché assimilabile a quello dei succhi pig-

mentati, sia di provenienza siciliana che calabrese. L'analisi della varianza (ANOVA) dei valori di contenuto totale di aminoacidi liberi ha confermato tali differenze tra i gruppi, assegnando i campioni siciliani non pigmentati a un gruppo differente rispetto alle altre tre categorie, a loro volta considerate statisticamente non differenti (tab. 1).

Per quanto riguarda i singoli aminoacidi liberi (tab. 1), la prolina, l'analita più rappresentato, si ritrova nei succhi biondi siciliani a livelli sensibilmente più elevati (11,13 mmol/l) rispetto ai campioni biondi calabresi e ai pigmentati (valori compresi tra 7,27 e 7,99 mmol/l); lo stesso dicasi per arginina, acido aspartico e serina, mentre il GABA risulta essere l'unico tra gli aminoacidi liberi maggioritari a non far registrare differenze statisticamente significative. Per tutti gli analiti menzionati, con l'eccezione del GABA, l'analisi della varianza ha evidenziato differenze statisticamente significative tra i campioni sici-

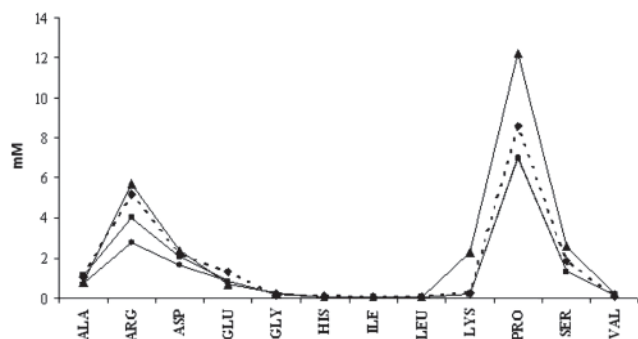


Fig. 1 - Distribuzione degli aminoacidi liberi nei succhi d'arancia, confronto con dati di letteratura. ♦ Questo lavoro; ■ Wallrauch e Faethe, 1988; ▲ Fang, 1988; ● Naulet *et al.*, 1997.
Fig. 1 - Distribution of free aminoacids in orange juices, comparison with literature data. ♦ This work; ■ Wallrauch and Faethe, 1988; ▲ Fang, 1988; ● Naulet *et al.*, 1997.

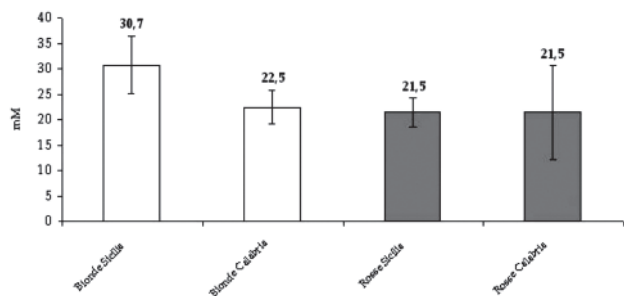


Fig. 2 - Contenuto totale (mmol/L) di aminoacidi liberi in succhi d'arancia siciliani e calabresi.
Fig. 2 - Total aminoacids content (mmol/L) in Sicilian and Calabrian orange juices

Tab. 1 - Contenuto medio di aminoacidi liberi (mM)* in 70 campioni di succhi di arance a polpa bionda e rossa di origine siciliana e calabrese. La lettera differente nella stessa riga indica una differenza significativa dei valori medi superiore al 95% di livello di confidenza (Multiple range test).

Tab. 1 - Average content of free aminoacids (mM)* in 70 samples of blond and pigmented, Sicilian and Calabrian, orange juice. Different letters in the same row indicate a significant difference among mean values at a confidence level higher than 95% (Multiple range test)

Varietà e origine	Bionde Sicilia	Bionde Calabria	Rosse Sicilia	Rosse Calabria	Totale
n. campioni	20	16	27	7	70
ASP	2,81 c	1,64 a	1,98 ab	2,38 bc	2
GLU	1,44 b	1,10 a	1,29 ab	1,36 a	1
ASN	1,28 c	0,72 a	0,79 a	0,98 b	1
SER	2,74 b	1,68 a	1,82 a	1,09 a	2
GLY	0,21 b	0,12 a	0,13 a	0,14 a	
GLN	0,29 b	0,19 a	0,26 ab	0,24 ab	
HIS	0,09 b	0,10 b	0,06 a	0,08 ab	
ARG	6,67 d	5,64 c	4,70 b	3,65 a	5
ALA	1,27 b	0,85 a	0,87 a	1,20 b	1
GABA	2,01 a	1,88 a	1,73 a	1,79 a	2
PRO	11,13 b	7,92 a	7,27 a	7,99 a	9
TYR	0,06 b	0,03 a	0,04 a	0,04 a	
VAL	0,12 b	0,09 a	0,10 ab	0,10 ab	
MET	0,02 a	0,02 a	0,02 a	0,01 a	
ILE	0,05 b	0,04 ab	0,04 a	0,04 ab	
ORN	0,10 c	0,06 a	0,10 bc	0,07 a	
LEU	0,06 b	0,05 ab	0,04 a	0,05 ab	
LYS	0,29 c	0,25 bc	0,21 ab	0,18 a	
PHE	0,10 b	0,09 b	0,05 a	0,06 a	
Totale AA	30,74 b	22,49 a	21,47 a	22,04 a	24

liani non pigmentati e le altre tre categorie, a loro volta non statisticamente differenti. Asparagina e glicina, seppur presenti a livelli di gran lunga più bassi, mostrano differenze significative tra i campioni biondi siciliani da un lato, e quelli biondi calabresi e pigmentati siciliani e calabresi, dall'altro. L'alanina discrimina efficacemente i succhi biondi siciliani (1,27 mmol/l) da quelli calabresi (0,85 mmol/l), mentre il contenuto medio nei primi risulta paragonabile a quello riscontrabile nei succhi rossi calabresi.

I dati ottenuti sono stati sottoposti a elaborazione statistica multivariata mediante analisi delle componenti principali e discriminante lineare. Quest'ultima, sulla base di due funzioni discriminanti che, assieme, spiegano circa l'87% della varianza, ha permesso di suddividere i campioni sul piano individuato dalle due funzioni discriminanti in gruppi piuttosto ben distinti (fig. 3). Complessivamente l'analisi multivariata ha permesso di classificare correttamente 19 campioni su 20 di succo non pigmentato siciliano, attribuendo l'u-

nico caso erroneamente classificato al gruppo dei succhi pigmentati calabresi (tab. 2).

Conclusioni

La distribuzione degli amminoacidi liberi può essere efficacemente impiegata come strumento per la discriminazione dell'origine geografica di succhi d'arancia non pigmentati, mentre non concorre a discriminare quelli pigmentati, per i quali, però, sono già disponibili metodi di accertamento dell'origine basati su altri marker compositivi. Il contenuto totale di amminoacidi liberi rappresenta già di per sé un valido criterio discriminante. I risultati relativi alla concentrazione dei singoli amminoacidi nei 4 gruppi di campioni ha permesso di evidenziare differenze statisticamente significative per i principali amminoacidi liberi contenuti nel succo d'arancia. Prolina, arginina, serina, asparagina e glicina possono essere considerati dei veri e propri marker in grado di discriminare i succhi biondi siciliani da quelli calabresi e dai succhi pigmentati, siciliani e calabresi. Questi amminoacidi si ritrovano nei succhi biondi siciliani a concentrazioni significativamente più elevate rispetto alle altre categorie di succhi.

La ricerca rappresenta un primo approccio verso la messa a punto di un modello di caratterizzazione dell'origine geografica dei succhi d'arancia. L'ampliamento della banca dati relativa alla composizione amminoacidica di succhi non pigmentati, con campioni di varia provenienza e raccolti in diverse stagioni produttive, si rende necessario al fine di irrobustire il modello proposto.

Tab. 2 - Classificazione dei campioni di succo d'arancia bionda e pigmentata di provenienza siciliana e calabrese sulla base dell'analisi discriminante lineare.

Tab. 2 - Classification of samples of blond and pigmented orange juice coming from Sicily and Calabria, on the base of linear discriminant analysis.

Gruppo	Numero campioni	Predetti			
		1	2	3	4
1 Rosse Sicilia	27	24	0	2	1
2 Bionde Sicilia	20	0	19	1	0
3 Rosse Calabria	7	0	0	5	2
4 Bionde Calabria	16	0	0	0	16

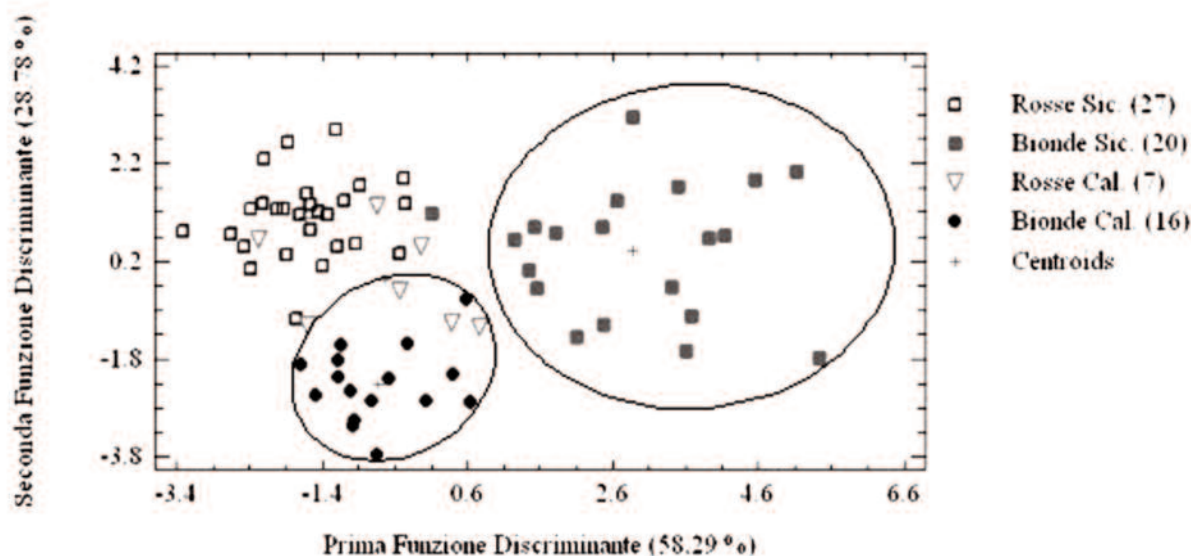


Fig. 3 - Analisi discriminante lineare. Grafico delle funzioni discriminanti.

Fig. 3 - Linear discriminant analysis. Plot of discriminant functions.

L'analisi degli amminoacidi liberi come criterio per la determinazione dell'origine geografica si configura come un metodo rapido, facile ed economico che potrebbe essere utilmente impiegato in associazione con la determinazione di altri marker compositivi fornendo un efficace strumento di indagine ad istituzioni ed enti deposti all'accertamento della tracciabilità dei prodotti alimentari.

Riassunto

Lo studio ha considerato la distribuzione degli amminoacidi liberi nei succhi d'arancia come criterio discriminante dell'origine geografica delle arance siciliane e calabresi. Sono stati determinati i profili amminoacidici di 70 campioni di arance di varietà bionde e pigmentate con la metodologia HPLC-FL. I dati sperimentali sono stati elaborati con trattamenti statistici descrittivi e multivariati. Il contenuto di amminoacidi liberi totali, insieme ai livelli dei singoli amminoacidi prolina, arginina, acido aspartico, asparagina, serina e glicina, può essere considerato un marker dell'origine geografica in grado di discriminare le varietà bionde siciliane da quelle calabresi.

Parole chiave: arginina, marker, prolina, succo d'arancia, tracciabilità.

Bibliografia

ARENA E., Campisi S., Fallico B., Maccarone E., 1998. *Fatty acids of Italian blood orange juices*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 4138-4143.

ARISTOY M.C., ORLANDO L., NAVARRO J.L., SENDRA J.M., IZQUIERDO L., 1989. *Characterization of Spanish orange juice for variables used in purity control*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 37: 596-600.

DEL CASTILLO M.D., SANTA-MARIA G., PUEYO E., CORZO N., OLANO A., 1998. *Differences in amino acid composition in*

commercial orange juices. J. Agr. Food Chem. 46: 2329-31.

DI MAURO A., PASSERINI A., RAPISARDA P., MACCARONE E. 2002. *Distribution of hydroxycinnamic acids as a criterion to evaluate variety and geographical origin of Italian orange juices*. Italian Journal of Food Science, 14: 301-315.

FANG T.T., 1988. *Modern Methods of Plant Analysis*, New Series Vol. 8. In "Analysis of Nonalcoholic Beverages". Linkens, H.F. and Jackson, J.F. Ed. Springer, Berlin: 51-69.

GOMEZ-ARIZA J.L., VILLEGAS-PORTERO M.J., BERNAL-DAZA V., 2005. *Characterization and analysis of amino acids in orange juice by HPLC-MS/MS for authenticity assessment*. Analytica Chimica Acta 540: 221-230.

MACCARONE, E., CAMPISI, S., FALLICO, B., RAPISARDA, P. and SGARLATA, R., 1998a. *Flavor components of Italian orange juices*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46: 2293-2298.

MACCARONE, E., RAPISARDA, P., FANELLA, F., ARENA, E. and MONDELLO, L. 1998b. *Cyanidin-3-(6''-malonyl)- β -glucoside. One of the major anthocyanins in blood orange juice*. Italian Journal of Food Science 10: 367.

MOULY P.P., GAYDOU E.M., AUFFREY A., 1998. *Simultaneous separation of flavanone glycosides and polymethoxylated flavones in citrus juices using liquid chromatography*. Journal of Chromatography-A 800: 171.

Mouly P.P., Gaydou E.M., Corsetti J., 1999. *Determination of the geographical origin of Valencia orange juice using carotenoid liquid chromatographic profiles*. Journal of Chromatography A, 844: 149-159.

NAULET N., TESSON P., BOULER N., Martin G.J., 1997. *Optimization of analytical method for origin assessment of orange juices. II. Determination of the amino acid composition*. Analisis, 25: 42-47.

RAPISARDA P., CAROLLO G., FALLICO B., TOMASELLI F., MACCARONE E., 1998 *Hydroxycinnamic acids as markers of Italian blood orange juices*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46: 464-470.

RAPISARDA P., FANELLA F., MACCARONE E., 2000. *Reliability of analytical methods for determining anthocyanins in blood orange juice*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 2249-2252.

ROUSEFF R.L., 1988. *Differentiating citrus juices using flavanone glycosides concentration profiles*. In "Adulteration of Fruit Juices and Beverages. S. Nagy, J.A. ATTAWAY, M.E.RHODES eds. DEKKER, New York: 49-65.

WALLRAUCH S., FAETHE W., 1988. *Amino acids: criteria for the evaluation of fruit juices*. In "Adulteration of Fruit Juices and Beverages". Nagy S., Attaway J.A., Rhodes, M.E. 1988. Ed. Dekker, New York: 21-48.

Attività antiinfiammatoria di alcuni principi attivi contenuti nelle arance rosse di Sicilia

Giuseppina Frasca¹, Luisa Rizza², Francesco Bonina², Annamaria Panico², Paolo Rapisarda³ e Venera Cardile^{1*}

¹Dipartimento di Scienze Bio-mediche, Sezione Fisiologia, Università di Catania

²Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università di Catania

³Consiglio per la Ricerca e Sperimentazione in Agricoltura - ACM Centro di Ricerca per l'Agrumicoltura e le Colture Mediterranee, Acireale (CT)

Anti-inflammatory effects of a red orange extract

Abstract. The purpose of this study was to evaluate the anti-inflammatory activity of a red orange (*Citrus sinensis* varieties: Moro, Tarocco, Sanguinello) complex (ROC), characterized by high levels of anthocyanins, flavanones, hydroxycinnamic acids and ascorbic acid, on the interferon-gamma (IFN- γ) and histamine-exposed human keratinocyte line NCTC 2544 and on interleukin-1 β (IL- β)-stimulated human primary chondrocytes. The expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), prostaglandin (PG)_{E₂}, immunomodulatory membrane molecules such as inter-cellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and the release of chemokines such as monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and interleukin-8 (IL-8) were determined. PGs and nitric oxide (NO) are involved in various pathophysiological processes, including inflammation, and inducible isoforms of COX-2 and iNOS are mainly responsible for the production of large amounts of these mediators. ICAM-1 modulates the permanence and activation of T lymphocytes in the epidermis. MCP-1 is a specific chemoattractant for monocytes and dendritic cells. IL-8 is important for the recruitment of both neutrophils and T lymphocytes. ROC exhibits very interesting anti-inflammatory properties, expressed by its capacity to counteract the pro-inflammatory effects induced by IFN- γ and histamine in human NCTC 2544 keratinocytes and by IL- β in human chondrocytes.

Key words: cytokines, keratinocytes, chondrocytes, flavonoids, inflammation.

Introduzione

Numerose ricerche hanno dimostrato che il consumo di arance è importante per la prevenzione di

numerosi tumori e di molte patologie cardiovascolari e degenerative (Silalahi, 2002). Le arance rosse, in particolare, sono un'importante componente della cosiddetta dieta mediterranea e spesso usate nella medicina popolare per le loro proprietà benefiche sulla salute (Pieroni e Quave, 2005).

Obiettivo della ricerca è stato valutare l'attività antiinfiammatoria di alcune sostanze contenute nelle arance rosse di Sicilia ed ampliare ulteriormente le conoscenze sul loro potenziale salutistico. L'attività antiinfiammatoria è stata valutata *in vitro* utilizzando un estratto standardizzato (Red Orange Complex)-ROC, ottenuto dal succo di tre varietà pigmentate di *Citrus sinensis* (Moro, Tarocco, Sanguinello), contenente glucosidi della cianidina (20%), acidi idrossicinnamici (3,1%), glucosidi flavonici (8,1%) ed acido ascorbico (5,0%), su una linea cellulare di cheratinociti umani (NCTC 2544) trattati con interferone- γ (IFN- γ) ed istamina e su condrociti umani stimolati con interleuchina (IL)-1 β (Albanesi *et al.*, 1998; Giustizieri *et al.*, 2004; Panico *et al.*, 2007). I cheratinociti sono cellule largamente diffuse nell'epidermide dove, oltre a svolgere la funzione di protezione (in quanto costituiscono la prima vera barriera verso l'esterno), sono in grado di sintetizzare e produrre alcune citochine capaci di regolare l'attività di molte cellule del sistema immunitario. I condrociti sono l'unica componente cellulare della cartilagine e giocano un ruolo chiave nella progressione delle patologie articolari. I vari mediatori infiammatori e le citochine pro-infiammatorie, tra cui IL-1 β , sintetizzati dai condrociti, sono di fondamentale importanza nell'indurre e sostenere i danni della cartilagine grazie alla loro capacità di sopprimere l'equilibrio tra l'eccessiva distruzione della cartilagine e i processi di riparazione della cartilagine (Martel-Pelletier *et al.*, 2003). Pertanto, i modelli cellulari da noi utilizzati sono particolarmente utili per riprodurre i meccanismi dove lo stress ossidativo-infiammatorio è coinvolto.

* cardile@unict.it

L'inflammation comprende diverse vie molecolari e si intreccia con una vasta gamma di processi biologici. Nel nostro studio, ROC è stato testato allo scopo di valutare la possibilità che l'uso di tale estratto possa portare alla soppressione della produzione di molecole chiave rilasciate durante gli eventi infiammatori sia in condrociti umani primari stimolati con IL-1 β che in cheratinociti trattati con IFN- γ ed istamina. In particolare, l'attività antiinfiammatoria di ROC è stata stimata a diverse concentrazioni determinando l'espressione della molecola di adesione inter-cellulare-1 (ICAM-1) e il rilascio della proteina chemioattraente i monociti-1 (MCP-1) e dell'interleuchina-8 (IL-8). La molecola di membrana ICAM-1 è coinvolta nella lisi dei cheratinociti da parte dei linfociti T citotossici. MCP-1 è una citochina chemiotattica che promuove la migrazione dei linfociti verso il tessuto danneggiato, contribuendo allo sviluppo dell'inflammation. L'IL-8 è prodotta dalle cellule epiteliali durante i disordini infiammatori ed è importante per il reclutamento dei linfociti T e dei neutrofili. Numerose evidenze suggeriscono che le prostaglandine (PG) e l'ossido nitrico (NO) sono coinvolti in vari processi fisiopatologici tra cui l'inflammation e la cancerogenesi e isoforme inducibili della cicloossigenasi (COX-2) e della ossido nitrico sintetasi (iNOS) sono i principali responsabili della produzione di grandi quantità di questi mediatori (Kim *et al.*, 2005). Molti stimoli infiammatori inducono l'espressione sia di iNOS che di COX-2. Questi due sistemi enzimatici sembrano interagire con un meccanismo in cui l'attività della COX-2 aumenta attraverso la nitratura dei residui di cisteina della COX-2 stimolata dalla iNOS. Ciò fornisce una base razionale per lo sviluppo di inibitori della coppia COX-2/iNOS che possano bloccare i sintomi dell'inflammation relativi alla formazione di PG e NO (Kim *et al.*, 2005).

Materiali e metodi

Per ottenere ROC, il succo di tre varietà di arance rosse di Sicilia è stato filtrato con carta da filtro da 0,2 μ m per rimuovere ogni impurità ed inserito in una colonna XAD-16 (Rohm and Haas, Philadelphia, PA, USA). Le resine sono state eluite con una soluzione di etanolo ed acqua (50:50), successivamente l'etanolo è stato rimosso tramite evaporazione e il residuo acquoso è stato nebulizzato.

I cheratinociti 2544 sono stati forniti dall'Interlab Cell Line Collection (Genova), mantenuti in *Minimum Essential Medium* (MEM) con l'aggiunta del 10% di siero fetale di vitello, 100 U/ml di penicillina e 100 μ g/ml di streptomycina. I condrociti sono stati ottenuti da cartilagine articolare di pazienti con fratture acci-

dentali del collo del femore sottoposti ad intervento chirurgico di sostituzione che hanno dato il consenso informato. La procedura di isolamento è stata condotta secondo il protocollo riportato in Cardile *et al.* (2010). I condrociti ottenuti sono stati mantenuti in coltura con *Dulbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM) contenente NaHCO₃, siero fetale bovino 10%, Hepes 25 mM, sodio piruvato 1 mM, gentamicina 50 μ g/ml, penicillina 100U/ml, streptomycina 100 μ g/ml e amfotericina B 2,5 μ g/ml. Le colture cellulari sono state tenute a 37 °C in un incubatore in un'atmosfera umidificata al 95% di aria e 5% di CO₂. Per gli esperimenti, le cellule state contaminate e trapiantate o in piastre da 96 pozzetti (per saggi ELISA e dei nitriti) o in capsule Petri da 100 mm (per Western blot). Dopo 24 ore il terreno di coltura è stato rimosso e le cellule sono state stimolate con le citochine pro-infiammatorie e trattate con ROC a 10 e 100 μ g/ml per 48 h. L'indometacina e l'idrocortisone sono stati utilizzati come farmaci antiinfiammatori di riferimento.

L'espressione di iNOS, COX-2 e ICAM è stata valutata mediante analisi Western blot come riportato in Cardile *et al.* (2010). Le bande ottenute sono state misurate densitometricamente e i valori sono stati espressi come unità densitometriche arbitrarie corrispondenti all'intensità del segnale.

Il rilascio di MCP-1 (Amersham Biosciences, Svizzera), di IL-8 (Biotrak, EIA System, Amersham Biosciences, USA) e di PGE₂ (Prostaglandin E₂, Biotrak, EIA System, Amersham Biosciences, USA) è stato misurato, nel soprannatante libero da cellule raccolto 48 ore dopo il trattamento, per mezzo di specifici kit ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ed EIA (enzyme immunoassay) in grado di riconoscere in modo specifico le proteine mediante il legame antigene-anticorpo monoclonale. I risultati sono stati riportati come pg/ml \pm SEM.

La concentrazione di nitriti nel soprannatante è stata quantificata mediante il saggio colorimetrico basato sulla reazione di Griess (Cardile *et al.*, 2010).

L'analisi statistica è stata effettuata con il programma SYSTAT, versione 9 (SYSTAT Inc., Evanston, USA). Ogni risultato è stato calcolato come valore medio \pm errore standard (SEM). La valutazione delle significatività statistiche tra valori accoppiati e non accoppiati è stata effettuata mediante il test del t di Student. I valori di p <0,05 sono stati considerati statisticamente significativi.

Risultati e discussione

I risultati ottenuti dimostrano che le cellule NCTC 2544 non trattate (controlli) presentano quantità poco

rilevabili di ICAM-1, mentre l'incubazione delle colture cellulari con IFN- γ ed istamina per 48 ore ne induce una elevata espressione. L'aggiunta di ROC a diverse concentrazioni insieme ad IFN- γ ed istamina ha prodotto un'inibizione dose-dipendente dell'espressione di ICAM-1. Alla dose piú alta l'estratto è stato in grado di bloccare del $40 \pm 4\%$ l'espressione di ICAM-1 (fig. 1). Un risultato particolarmente significativo è stato ottenuto quando i cheratinociti sono stati valutati per il rilascio di MCP-1. I cheratinociti normali umani NCTC 2544 non rilasciano costitutivamente MCP-1 che è stato potentemente indotto dall'istamina e dall'IFN- γ e notevolmente inibito da ROC: alla concentrazione piú bassa (10 $\mu\text{g/ml}$) era presente una significativa diminuzione ($75 \pm 3\%$), che aumentava ulteriormente alla concentrazione piú alta di estratto (100 $\mu\text{g/ml}$) ($80 \pm 5\%$) (fig. 2). Per quanto riguarda il rilascio dell'IL-8, una quantità trascurabile

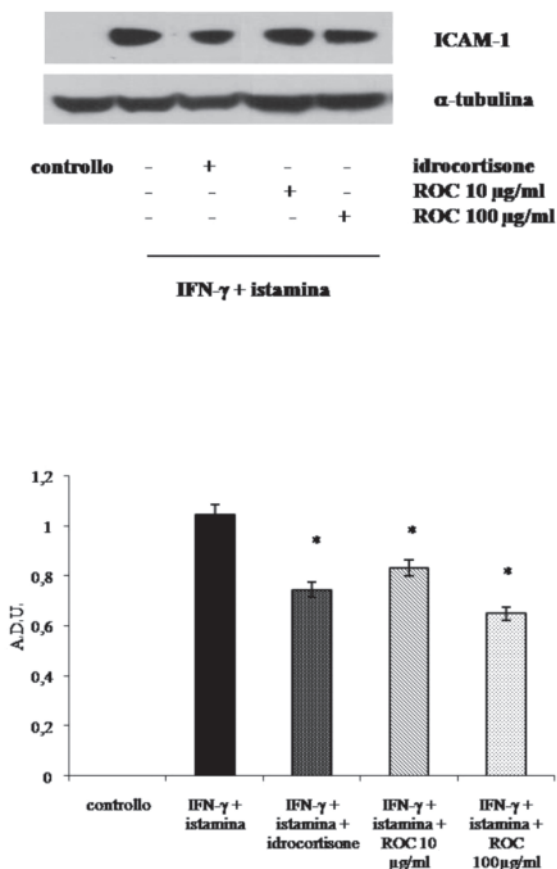


Fig. 1 - Effetti dell'estratto standardizzato di arancia rossa (ROC) e idrocortisone sull'espressione di ICAM-1 indotto da IFN- γ e istamina su una linea cellulare di cheratinociti umani normali NCTC 2544, determinati tramite analisi Western blot. * $p < 0,05$ denota una differenza significativa rispetto a IFN- γ e istamina. Fig. 1 - Effects of a standardized red orange extract (ROC) and hydrocortisone on ICAM-1 expression induced by IFN- γ and histamine on normal human keratinocytes cell line NCTC 2544 determined by Western blot analysis. * $p < 0,05$ significantly different compared to IFN- γ and histamine.

ne è stata prodotta dai cheratinociti non stimolati. IFN- γ ed istamina, invece, ne hanno indotto una notevole quantità, che è stata notevolmente ridotta, in maniera dose-dipendente, dal trattamento con l'estratto (tab. 1). Rispetto a ROC, il decremento osservato dopo il trattamento con l'idrocortisone, utilizzato come farmaco antiinfiammatorio di riferimento, è stato inferiore per tutti i parametri esaminati.

Sui condrociti trattati con IL-1 β ed istamina ROC ha agito come un potente inibitore di iNOS, di NO (fig. 3A e B) e di COX-2 (fig. 4), sopprimendo anche la produzione di PGE₂ (fig. 5). Inoltre, ROC ha indotto una significativa diminuzione dose-dipendente dell'espressione di ICAM-1 (fig. 6) e del rilascio di IL-8 (fig. 7). Infine, rispetto alla indometacina, usato come farmaco antiinfiammatorio di riferimento, ROC ha

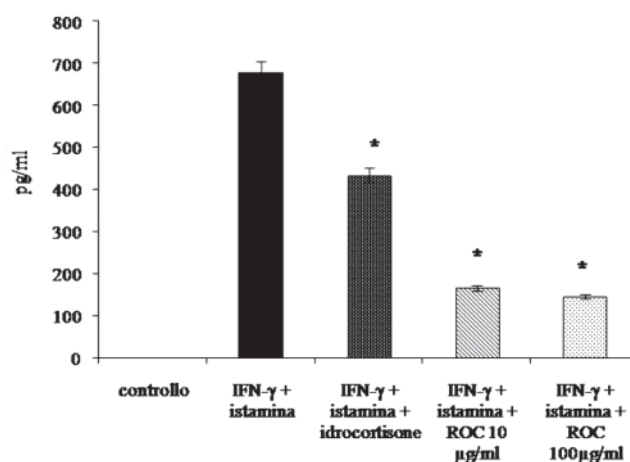


Fig. 2 - Effetti dell'estratto standardizzato di arancia rossa (ROC) e idrocortisone sul rilascio di MCP-1 indotto da IFN- γ e istamina su una linea cellulare di cheratinociti umani normali NCTC 2544, determinati tramite specifici kit ELISA. * $p < 0,05$ denota una differenza significativa rispetto a IFN- γ e istamina. Fig. 2 - Effects of a standardized red orange extract (ROC) and hydrocortisone on MCP-1 release induced by IFN- γ and histamine on normal human keratinocyte cell line NCTC 2544 determined by specific ELISA kit. * $p < 0,05$ significantly different compared to IFN- γ and histamine.

Tab. 1 - Effetti dell'estratto standardizzato di arancia rossa (ROC) e idrocortisone sul rilascio di IL-8 indotto da IFN- γ e istamina su una linea cellulare di cheratinociti umani normali NCTC 2544. I valori sono la media \pm SEM di tre esperimenti. * $p < 0,05$ denota una differenza significativa rispetto a IFN- γ e istamina. Tab. 1 - Effects of a standardized red orange extract (ROC) and hydrocortisone on the release of IL-8 induced by IFN- γ and histamine on normal human keratinocytes NCTC 2544.

Trattamento	pg/ml \pm SEM
Controllo	ND
IFN- γ e istamina	850 \pm 30
IFN- γ e istamina + ROC 10 $\mu\text{g/ml}$	120 \pm 25*
IFN- γ e istamina + ROC 100 $\mu\text{g/ml}$	65 \pm 10*
IFN- γ e istamina + Idrocortisone	330 \pm 25*

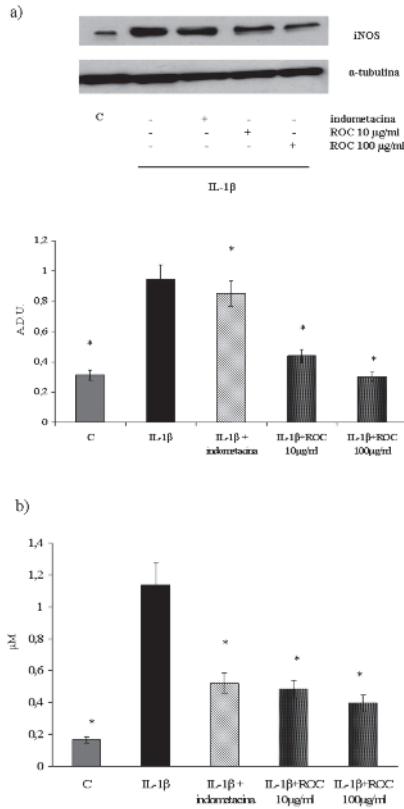


Fig. 3 - Effetti dell'estratto standardizzato di arancia rossa (ROC) e indometacina (a) sull'espressione di iNOS e (b) sul rilascio di NO indotti da IL-1 β su colture primarie di condrociti umani normali e determinati rispettivamente tramite analisi Western blot e reattivo di Griess. * $p < 0,05$ denota una differenza significativa rispetto a IL-1 β .

Fig. 3 - Effects of a standardized red orange extract (ROC) and indomethacin on (a) iNOS expression and (b) NO release induced by IL-1 β on normal human primary chondrocytes determined by Western blot analysis and Griess assay, respectively. * $p < 0.05$ significantly different compared to IL-1 β .

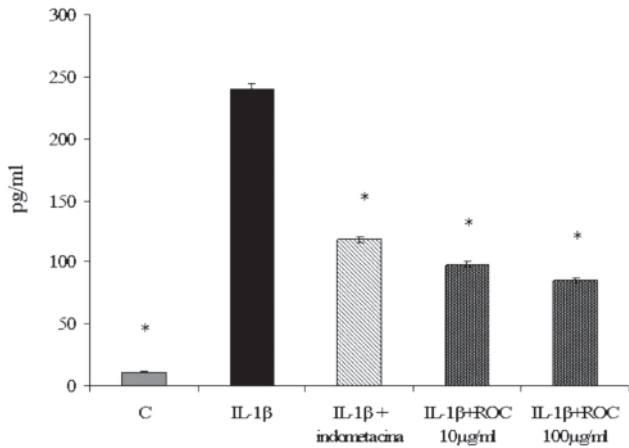


Fig. 5 - Produzione di PGE₂ misurata tramite kit ELISA nel terreno di coltura di condrociti umani dopo 48 ore dall'aggiunta di ROC e/o indometacina. * $p < 0,05$ denota una differenza significativa rispetto a IL-1 β .

Fig. 5 - PGE₂ production measured by ELISA in culture media from normal human chondrocytes 48 h after ROC and/or indomethacin addition. * $p < 0.05$ significantly different compared to IL-1 β .

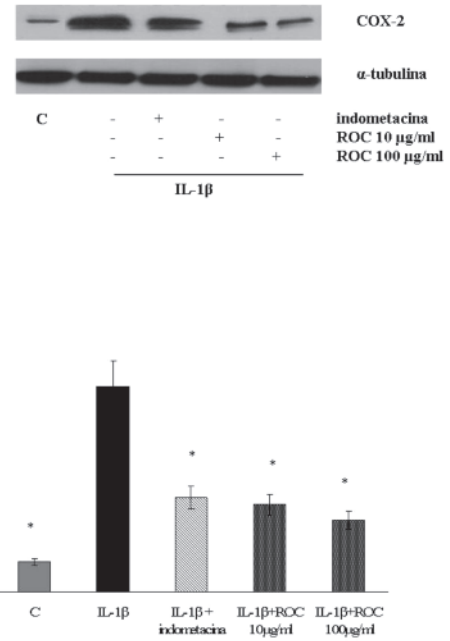


Fig. 4 - Effetti dell'estratto standardizzato di arancia rossa (ROC) e indometacina sull'espressione della COX-2 indotta da IL-1 β su colture primarie di condrociti umani normali e determinata tramite analisi Western blot. * $p < 0,05$ denota una differenza significativa rispetto a IL-1 β .

Fig. 4 - Effects of a standardized red orange extract (ROC) and indomethacin on COX-2 expression induced by IL-1 β on normal human primary chondrocytes determined by Western blot analysis. * $p < 0.05$ significantly different compared to IL-1 β .

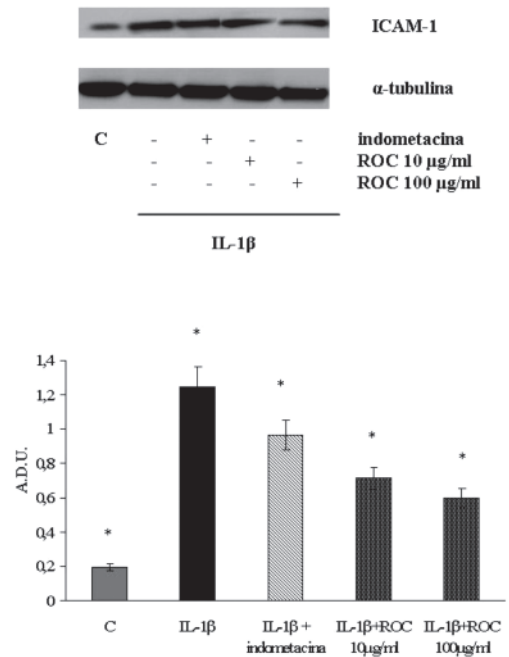


Fig. 6 - Effetti dell'estratto standardizzato di arancia rossa (ROC) e idrocortisone sull'espressione di ICAM-1 indotto da IL-1 β su colture primarie di condrociti umani normali e determinata tramite analisi Western blot. * $p < 0,05$ denota una differenza significativa rispetto a IL-1 β .

Fig. 6 - Effects of a standardized red orange extract (ROC) and hydrocortisone on ICAM-1 expression induced by IL-1 β on normal human primary chondrocytes determined by Western blot analysis. * $p < 0.05$ significantly different compared to IL-1 β .

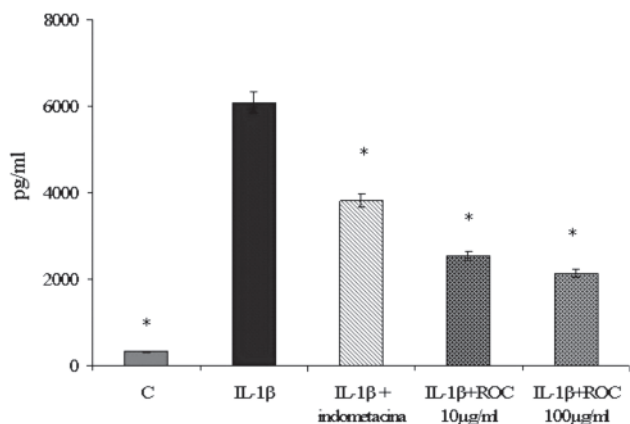


Fig. 7 - Produzione di IL-8 misurata tramite kit ELISA nel terreno di coltura di condrociti umani dopo 48 ore dall'aggiunta di ROC e/o indometacina. * $p < 0,05$ denota una differenza significativa rispetto a IL-1 β .

Fig. 7 - IL-8 production measured by ELISA in culture media from normal human chondrocytes 48 h after ROC and/or indomethacin addition. * $p < 0.05$ significantly different compared to IL-1 β .

bloccato in modo più efficiente le azioni pro-infiammatorie di IL-1 β sui condrociti, soprattutto iNOS e COX-2.

Conclusioni

Tutti i farmaci oggi usati forniscono solo un sollievo sintomatico e sono spesso associati a pericolosi effetti collaterali. In questo contesto, nuove strategie terapeutiche che prevedano l'uso di sostanze naturali possono fornire una maggiore efficacia e una minore tossicità. Gli effetti biologici osservati in questo studio dimostrano, oltre a quelli già noti, il ruolo benefico delle arance rosse anche nei confronti dei processi infiammatori a carico della pelle e/o della cartilagine.

Riassunto

L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare l'attività antiinfiammatoria di un pool di sostan-

ze estratte da tre varietà pigmentate di *Citrus sinensis* (Moro, Tarocco, Sanguinello) su una linea cellulare di cheratinociti umani normali (NCTC 2544) esposti all'azione pro-infiammatoria dell'interferone- γ (IFN- γ) e dell'istamina e su condrociti umani primari stimolati con interleuchina (IL)-1 β . In entrambi i modelli cellulari è stata valutata la produzione di molecole chiave rilasciate durante gli eventi infiammatori. I risultati ottenuti dimostrano che il pool di sostanze contenute nelle arance rosse è in grado di esercitare una notevole attività protettiva e antiinfiammatoria.

Parole chiave: citochine, cheratinociti, condrociti, flavonoidi, infiammazione.

Bibliografia

- ALBANESI C, PASTORE S, FANALES-BELASIO E, GIROLIMONI G., 1998. *Cetirizine and hydrocortisone differentially regulate ICAM-1 expression and chemokine release in cultured human keratinocytes*. Clin Exp Allergy 28(1): 101-109.
- CARDILE V, FRASCA G, LIBRA M, CAGGIA S, UMEZAWA K, PANICO A, MALAPONTE G., 2010. *Dehydroxymethylepoxyquinomicin inhibits expression and production of inflammatory mediators in interleukin-1beta-induced human chondrocytes*. Cell Physiol Biochem 25(4-5): 543-50.
- GIUSTIZIERI ML, ALBANESI C, FLUHR J, GISONDI P, NORGAEUER J, GIROLIMONI G., 2004. *H1 histamine receptor mediates inflammatory responses in human keratinocytes*. J Allergy Clin Immunol 114(5): 1176-1182.
- KIM SF, HURI DA, SNYDER SH., 2005. *Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2*. Science, 310(5756), 1966-1970.
- MARTEL-PELLETIER J, PELLETIER JP, FAHMI H., 2003. *Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues*. Semin Arthritis Rheum 33(3), 155-167.
- PANICO AM, CARDILE V, GARUFI F, PUGLIA C, BONINA F, RONSISVALLE G., 2007. *Effect of hyaluronic acid and polysaccharides from Opuntia ficus-indica (L.) cladodes on the metabolism of human chondrocyte cultures*. Journal of Ethnopharmacol 111(2), 315-321.
- PIERONI A, QUAVE CL., 2005. *Traditional pharmacopoeias and medicine among Albanians and Italians in southern Italy: a comparison*. J Ethnopharmacol 101(1-3): 258-270.
- SILALAH J., 2002. *Anticancer and health protective properties of citrus fruit components*. Asia Pacific J Clin Nutr 11(1): 79-84.

Determinazione di pesticidi e plastificanti in oli essenziali agrumari provenienti da differenti nazioni

Angela Giorgia Potorti, Vincenzo Lo Turco*, Patrizia Furci, Giovanni Bartolomeo, Andrea Salvo, Nicola Cicero, Gloria Pumilia e Giacomo Dugo

Dipartimento di Scienze degli Alimenti e dell'Ambiente "Prof. G. Stagno d'Alcontres", Università di Messina

Determination of pesticides and plasticizers in citrus essential oils from different countries

Abstract. The aim of this study was to determine the presence of organochlorine and organophosphorus pesticides, phosphorated plasticizers and chloroparaffins in 190 citrus essential oils from different countries produced in the crop year 2006-2007. Organophosphorus pesticides and organophosphorus plasticizers were determined by HRGC-FPD, while organochlorine pesticides and chlorinated paraffins by HRGC-ECD. In analyzed samples there was the absence of phosphorated plasticizers and chloroparaffins. Pesticide residue levels in Italian citrus oils showed a measurable decrease for organophosphorus and organochlorine pesticides compared with past production years. Results showed that the largest pesticide quantities were found in oils from Brazil and Spain.

Key words: organic contaminants, HRGC-FPD, HRGC-ECD.

Introduzione

Gli oli essenziali agrumari trovano largo impiego nell'industria alimentare, farmaceutica e cosmetica, per cui garantirne la genuinità e la qualità significa immettere sul mercato prodotti che siano esenti da qualunque tipo di contaminante o i cui valori rientrino nei limiti previsti dai paesi importatori. Tale contaminazione può derivare dalla presenza di residui di pesticidi organoclorurati e organofosforici, i primi altamente lipofili penetrano nel tessuto tegumentale della pianta, in quantità limitate, i secondi invece, attraversano il sistema vascolare della pianta e sono assorbiti a livello cellulare. Residui di queste sostanze

si ritrovano nella buccia e pertanto negli oli essenziali estratti da essa. Altri contaminanti possono essere rappresentati dai plastificanti fosforati e cloroparaffine, additivi delle plastiche dei macchinari usati per l'estrazione e/o la decantazione degli oli. A tutt'oggi purtroppo non esiste nella Comunità Europea un'indicazione esatta sulle quantità massime di residui di contaminanti organici in questi prodotti.

Questo studio si propone quindi di valutare la presenza di pesticidi organofosforici ed organoclorici, plastificanti fosforati e cloroparaffine in campioni di oli essenziali provenienti da differenti nazioni, per determinarne l'eventuale stato di contaminazione.

Materiali e metodi

Questa ricerca è stata eseguita su oli essenziali agrumari estratti a freddo, 120 provenienti dall'Italia e 70 provenienti da Spagna, Argentina, Brasile e Sudafrica, prodotti nelle annate 2006-2007, come riportato in tabella 1. L'analisi dei residui di contaminanti organofosforati è stata effettuata prelevando direttamente 0,2 ml dell'olio essenziale agrumario, addizionato di 0,2 ml della soluzione di standard interno e processandolo ad un gascromatografo FPD-Perkin Elmer Clarus 500, equipaggiato con una colonna capillare Restek RTX5-MS di 30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm film thickness. Per i pesticidi organoclorurati e cloroparaffine è stata eseguita inizialmente una procedura di *clean-up*, secondo quanto riportato da Dugo *et al.* (1997), e successivamente sono stati determinati mediante un gascromatografo ECD-Perkin Elmer Clarus 500, equipaggiato con la colonna capillare descritta precedentemente. I metodi utilizzati sono stati validati mediante la determinazione del recupero e dei limiti di rivelabilità, secondo quanto riportato dalla Pharmaeuropa 1999. Il recupero per tutte le classi è risultato $\geq 94,0$ % ed i limiti di rivelabilità per i pesticidi erano $< 70 \mu\text{g l}^{-1}$, per i triarilfosfati totali $0,01 \text{ mg l}^{-1}$ e per le cloroparaffine 1 mg l^{-1} (Saitta *et al.*, 1997; Di Bella *et al.*, 2001).

* vloturco@unime.it

Tab. 1 - Campioni di oli essenziali agrumari analizzati.
 Tab. 1 - Analyzed samples of citrus essential oils.

Campioni	Italia	Spagna	Brasile	Argentina	Sudafrica
Limone	30	-	10	10	10
Arancia	30	-	10	-	-
Mandarino verde	15	-	10	-	-
Mandarino giallo	15	-	10	-	-
Clementino	-	10	-	-	-
Bergamotto	30	-	-	-	-

Risultati e discussione

In tabella 2 e 3 è riportata la concentrazione media dei residui di pesticidi organofosforati ed organoclorurati e la percentuale dei campioni contaminati. La maggior parte degli oli essenziali di limone Italiani era contaminata da pesticidi organofosforici: in particolare, l'80 % di questi oli presentava methidathion, methyl ed ethyl chlorpyrifos. Il dicofol era l'unico pesticida organoclorurato ritrovato nel 50 % dei campioni. Gli oli provenienti dal Brasile e dall'Argentina presentavano soltanto ethyl chlorpyrifos e dicofol; il methidathion è stato anche determinato nel 30 % dei campioni del Sudafrica, che

Tab. 2 - Valore medio dei campioni di oli essenziali italiani contaminati da residui di pesticidi organoclorurati e organofosforati ($\text{mg l}^{-1} \pm$ deviazione standard) con la relativa percentuale di campioni contaminati.

Tab. 2 - Mean value of contaminated Italian citrus oils by organophosphorus and organochlorine pesticide residues ($\text{mg l}^{-1} \pm$ standard deviation) and percentage of contaminated samples.

Specie	Olio essenziale	Valore medio \pm d.s.	% campioni contaminati
Limone	Methyl azinphos	0,55 \pm 0,10	10,0
	Ethyl chlorpyrifos	0,20 \pm 0,06	83,3
	Methyl chlorpyrifos	0,20 \pm 0,06	80,0
	Methidathion	0,55 \pm 0,10	80,0
	Pyridafenthion	0,35 \pm 0,09	13,3
	Dicofol	0,41 \pm 0,10	50,0
Arancia	Methyl azinphos	0,24 \pm 0,15	86,7
	Ethyl chlorpyrifos	1,56 \pm 0,84	80,0
	Methyl chlorpyrifos	1,44 \pm 0,73	30,0
	Fenthion	0,64 \pm 0,30	30,0
	Malathion	0,82 \pm 0,41	26,7
	Pyridafenthion	1,97 \pm 0,90	66,7
Mandarino giallo	Ethyl chlorpyrifos	2,19 \pm 0,58	20,0
	Methyl chlorpyrifos	0,94 \pm 0,23	13,3
	Phentoate	0,20 \pm 0,06	6,7
	Pyridafenthion	0,15 \pm 0,05	33,3
	Dicofol	0,61 \pm 0,10	33,3

mostravano anche la più alta concentrazione di dicofol. Negli oli essenziali di arancia italiani l'ethyl ed il methyl chlorpyrifos erano presenti in alta concentrazione, mentre il methyl azinphos era ad un livello molto basso, ma in un gran numero di campioni. Tra gli oli di arancia stranieri il methidathion era quello ritrovato in più alta concentrazione e fra i pesticidi organoclorurati il dicofol. Negli oli essenziali Italiani di mandarino giallo l'ethyl chlorpyrifos è stato determinato nel 20 % dei campioni; il dicofol è stato l'unico pesticida organoclorurato determinato nel 33 % dei campioni; negli oli brasiliani, soltanto l'ethyl chlorpyrifos ed il malathion erano stati ritrovati nel 70-80 % dei campioni. Negli oli italiani di mandarino verde non sono stati riscontrati residui di pesticidi, al contrario di quelli brasiliani, in cui erano presenti il methidathion, il methyl azinphos e l'ethyl chlorpyrifos. Gli oli essenziali italiani di bergamotto non mostravano contaminazione da pesticidi, il che ha confermato il trend già osservato in precedenti studi (Saitta *et al.*, 2000) e probabilmente connesso alla forte resistenza dei frutti all'attacco degli insetti ed al ridotto uso dei pesticidi rispetto ad altre specie agrumarie. Gli oli di clementino spagnoli mostravano i più alti livelli di contaminazione. Riguardo agli oli essenziali italiani, le concentrazioni dei pesticidi trovati in questa ricerca erano più bassi rispetto a quelli determinati nei campioni prodotti fra il 1983 ed il 1991 (Dugo *et al.*, 1997). Sia i campioni italiani che quelli stranieri, che sono stati oggetto di questa ricerca, hanno mostrato residui di plastificanti fosforati e cloroparaffine inferiori al limite di rivelabilità.

Conclusioni

Gli oli essenziali brasiliani e spagnoli erano quelli maggiormente contaminati. La presenza dei residui dei pesticidi organofosforici ed organoclorurati, talvolta alta sia negli oli essenziali italiani che in quelli stranieri, potrebbe essere il risultato di un uso improprio dei pesticidi durante la crescita delle piante di agrumi o a causa di una precedente contaminazione nella fase di estrazione. I livelli dei residui di pesticidi presenti nei campioni italiani hanno mostrato comunque un calo rispetto alle annate precedenti, il che suggerisce che vi sia un trend indirizzato verso una riduzione ed un uso più razionale dei trattamenti fitosanitari. L'assenza, inoltre, di residui di plastificanti fosforati e di cloroparaffine in tutti i campioni analizzati può inoltre derivare da un miglioramento delle procedure utilizzate durante il ciclo di produzione e nel rispetto della corretta conservazione degli oli

Tab. 3 - Valore medio dei campioni di oli essenziali stranieri contaminati da residui di pesticidi organoclorurati e organofosforati ($\text{mgL}^{-1} \pm$ deviazione standard) con la relativa percentuale di campioni contaminati (n.d.: non determinabile).

Tab. 3 - Mean value of contaminated citrus oils from various countries by organophosphorus and organochlorine pesticide residues ($\text{mgL}^{-1} \pm$ standard deviation) and percentage of contaminated samples (n.d.: not determinable).

Specie	Olio essenziale	Brasile	%	Argentina	%	Sudafrica	%	Spagna	%
Limone	Ethyl chlorpyriphos	2,22 \pm 0,18	70	1,99 \pm 0,15	80	0,28 \pm 0,05	50		
	Methidathion	n.d.	-	n.d.	-	1,50 \pm 0,14	30		
	Dicofol	0,60 \pm 0,09	40	0,80 \pm 0,10	60	2,50 \pm 0,20	50		
Arancia	Ethyl chlorpyriphos	0,60 \pm 0,15	60						
	Malathion	0,15 \pm 0,08	30						
	Methidathion	4,59 \pm 1,30	80						
	Bromopropilate	0,39 \pm 0,10	20						
	Dicofol	3,88 \pm 0,80	50						
Mandarino giallo	Ethyl chlorpyriphos	2,63 \pm 0,90	80						
	Malathion	4,80 \pm 1,60	70						
Mandarino verde	Methyl azinphos	0,22 \pm 0,05	60						
	Ethyl chlorpyriphos	0,08 \pm 0,01	60						
	Methidathion	0,34 \pm 0,08	40						
	Pyridafenthion	0,19 \pm 0,05	30						
Clementino	Ethyl chlorpyriphos							8,50 \pm 2,30	80
	Fenthion							3,96 \pm 1,20	70
	Fenitrothion							2,00 \pm 0,94	30
	Methidathion							4,81 \pm 1,26	40
	Bromopropilate							3,50 \pm 1,18	50
	Dicofol							2,00 \pm 0,55	70

essenziali rispetto a quanto osservato negli anni precedenti (Saitta *et al.*, 1997; Di Bella *et al.*, 2001).

Riassunto

È stata valutata la presenza di pesticidi organofosforici ed organoclorici, plastificanti fosforati e cloroparaffine in 190 campioni di oli essenziali agrumari di differenti nazioni (annata di produzione 2006-2007). I pesticidi organofosforici e i plastificanti organofosforati sono stati determinati mediante HRGC-FPD, mentre quelli organoclorurati e le cloroparaffine mediante HRGC-ECD. E' stata riscontrata la totale assenza di cloroparaffine e di plastificanti fosforati in tutti i campioni esaminati, ed una diminuzione, in quelli italiani, dei livelli di pesticidi organofosforici ed organoclorurati rispetto alle annate precedenti; gli oli brasiliani e spagnoli mostravano comunque le più alte concentrazioni di pesticidi.

Parole chiave: contaminanti organici, HRGC-FPD, HRGC-ECD.

Bibliografia

- DI BELLA G., SAIITA M., LO CURTO S., SALVO F., LICANDRO G., DUGO G., 2001. Contamination of citrus essential oils: presence of chloroparaffin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (49):3705-3708.
- DUGO G., SAIITA M., DI BELLA G., DUGO P., 1997. Organophosphorus and Organochlorine pesticide residues in Italian citrus oils. *Perfumer & Flavorist* (22): 33-44.
- PHARMAEUROPA. The European Pharmacopeia Forum. 1999. Technical guide for the elaboration of monograph. 3rd edition, 66.
- SAIITA M., DI BELLA G., BONACCORSI I., DUGO G., DELLA CASSA E., 1997. Contamination of citrus essential oils: the presence of phosphorated plasticizers. *Journal of Essential Oil Research*, (9):613-618.
- SAIITA M., DI BELLA G., SALVO F., LO CURTO S., DUGO G., 2000. Organochlorine pesticide residues in Italian citrus essential oils, 1991-1996. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (48):797-801.

Contenuto minerale delle foglie e qualità dei frutti di agrumi per la trasformazione

Francesca Barone^{1*}, Riccardo Lo Bianco¹, Germana Patricolo¹, Diego Padoan¹ e Eristanna Palazzolo²

¹ Dipartimento DEMETRA, Università di Palermo

² Dipartimento dei Sistemi Agro-Ambientali, Università di Palermo

Leaf mineral content and quality of citrus fruits for processing

Abstract. In the present study, we analyzed leaf mineral contents fruit quality traits of orange, lemon and tangerine varieties grown in Sicily. The purpose of this research was to individuate chemical or physical fruit quality parameters useful to establish the best possible use of the crop, fresh market or processing. Moreover, leaf mineral analyses were conducted in order to characterize nutritional levels of citrus varieties grown in Sicily. In a second study, we evaluated fruit quality of orange trees cv Valencia in response to deficit irrigation.

Key words: Citrus limon, Citrus sinensis, Citrus reticulata, anthocyanin, vitamin C.

Introduzione

Le iniziative miranti a identificare e salvaguardare il prodotto di pregio per il consumo fresco, distinguendolo così da quello di massa, hanno permesso di ampliare e migliorare nel tempo la conoscenza delle caratteristiche bioagronomiche e commerciali delle cultivar e dei frutti degli agrumi di Sicilia. Esistono già vari consorzi e denominazioni, come l'IGP dell'Arancia rossa di Sicilia, l'IGP limone di Siracusa, la Riberella, il Mandarino Conca d'Oro di Sicilia, che regolano con rigidi disciplinari la qualità dei frutti, il territorio all'interno del quale è possibile ottenere il prodotto, le norme di coltivazione e sanitarie da rispettare.

Da estesi territori siciliani, destinati all'agrumicoltura, comunque, si ottengono ancora produzioni difficilmente identificabili in base a parametri qualitativi oggettivi. Né in tali territori esistono disciplinari o

norme che diano delle direttive da seguire per quanto riguarda i valori dei principali parametri qualitativi. Queste produzioni rappresentano una considerevole parte dell'agrumicoltura isolana per la quale non è mai stato approntato uno studio approfondito che mettesse in risalto pregi e difetti.

Lo scopo dell'attività di ricerca è stato quello di stabilire dei parametri oggettivi attraverso i quali determinare le qualità carpologiche, chimiche e fisiche dei frutti per la qualificazione commerciale. Inoltre, allo scopo di rendere caratterizzabili le cultivar e di fornire una mappa del loro livello nutrizionale, sono state effettuate delle analisi chimiche sulle foglie degli agrumi più coltivati in Sicilia.

All'interno di questa indagine ad ampio spettro è stato condotto un ulteriore studio sulle caratteristiche qualitative dei frutti e lo stato nutrizionale di piante di arancio della cv Valencia in risposta a regimi irrigui controllati.

Materiali e metodi

Le aree dove sono stati fatti i rilievi sono per il limone, la Costiera Palermitana e il territorio di Siracusa; per l'arancio a frutto biondo, la Fiumara tirrenica del Messinese, Lascari e il territorio di Sciacca e Ribera; per il mandarino, i poli di Castelvetro (TP), Campobello di Mazara (TP), Palermo, Sciacca (AG) e Lascari (PA). All'interno di questi territori sono state scelte delle aziende rappresentative e per cultivar sono stati scelti sia appezzamenti regolarmente coltivati, sia zone in parziale abbandono dove non venivano effettuate concimazioni.

Nel triennio 2007-2010, la procedura impiegata per il campionamento delle foglie è stata la seguente: le foglie sono state prelevate da rametti non fruttiferi, del flusso primaverile, disposti sulla fascia mediana della chioma ed ai quattro punti cardinali; le foglie sono state raccolte nel periodo compreso tra ottobre e novembre, quando queste hanno raggiunto l'età di 5-6

* francesca.barone@unipa.it

mesi. I campioni sono stati inviati in laboratorio a temperatura controllata.

I frutti sono stati raccolti a piena maturazione dalle stesse piante individuate per il campionamento delle foglie.

Le analisi fogliari sono state eseguite presso il Dipartimento SAGA, sez. di chimica. L'azoto totale è stato determinato secondo il metodo Kjedhal. I micro e macro elementi sono stati determinati con l'assorbimento atomico (AA) previa mineralizzazione (Morard e Gullo, 1970). Il fosforo invece è stato determinato per via colorimetrica (Fogg e Wilkinson, 1958).

Le analisi qualitative sui frutti sono state eseguite presso il laboratorio di Frutticoltura del Dipartimento DEMETRA. Su un campione di 1 kg di frutti, sono state determinate le caratteristiche qualitative.

Presso il Dipartimento SAGA, sez. di chimica, sono stati determinati l'acidità titolabile, il contenuto in vitamina C e le antocianine (per le cultivar di arance pigmentate). Queste analisi sono state effettuate impiegando i metodi usuali di analisi (AOAC). La vitamina C è stata quantificata utilizzando il metodo enzimatico, mentre le antocianine sono state determinate con il metodo spettrofotometrico (Rapisarda *et al.*, 1994).

Per quanto riguarda la prova di irrigazione, sono state utilizzate 48 piante di arancio cv Valencia, a cui sono stati imposti 3 differenti sistemi irrigui: 1) irrigazione convenzionale (CI, 2 irrigatori per albero a 100% ET); 2) irrigazione di una porzione dell'apparato radicale (PRD, 1 irrigatore per albero alternato su ciascun lato dell'apparato radicale, 50% CI); 3) irrigazione di deficit continuo (DI, 2 irrigatori per albero, 50% CI su entrambi i lati dell'apparato radicale). Irrigazione a parte, tutte e tre le tesi hanno ricevuto la stessa gestione culturale. In questo caso, la determinazione dei parametri qualitativi classici ha riguardato l'intero triennio, mentre carotenoidi, vitamina C ed elementi minerali nelle foglie sono stati misurati solo nel 2010.

Risultati e discussione

Nella tabella 1 sono riportate le medie dei tre anni delle analisi fogliari, nella tabella 2 le analisi riguardanti le caratteristiche qualitative dei frutti. La tabella 3 riporta le caratteristiche qualitative dei frutti della cv Valencia sottoposti a tre diversi regimi irrigui.

Dal confronto delle tabelle 1 e 2 si evince che spesso a valori più o meno elevati di un elemento minerale non corrisponde una maggiore o minore qualità del prodotto. Inoltre la differenza tra campo coltivato e non coltivato talvolta è minima, special-

mente nel limone. Il limone della cv 2kr, nonostante il valore di azoto (1,75 %) e di fosforo (0,34 %) ha un alto contenuto di vitamina C (168,6 mg/100ml) ed è un ottimo limone che ha ottenuto l'IGP a Siracusa e che viene consigliato agli agricoltori. Il limone della cv Lunario si distingue per il basso numero di semi (0,81), caratteristica richiesta dal mercato.

Riguardo all'arancio, i frutti della cv Ovale Calabrese, che ormai non si presta più per il consumo fresco, ha una buona percentuale di succo sia nel campo coltivato (48,59%) che nel non coltivato (47,52%); la vitamina C è 34,23 mg/100ml, per cui se ne può consigliare la destinazione all'industria di trasformazione.

Riguardo ai mandarini, c'è da dire che la cv Tardivo di Ciaculli tradizionale è poco apprezzata per l'eccessivo numero di semi e la pezzatura piccola, mentre la cv Tardivo di Ciaculli nucellare presenta una pezzatura più elevata (132 g) e un numero di semi più ridotto. Eccellente è la cv Nova che raggiunge un peso di 157 g, presenta una colorazione arancio intenso già a fine dicembre, e ha una percentuale di succo alta (37%); inoltre nelle zone dove si trova in monocoltura, presenta un basso numero di semi (0,92).

Per quanto riguarda le arance pigmentate, la cv Moro, nonostante sia leggermente acidula (SST/A=6,9), ha una buona percentuale di succo (42,13%) e soprattutto un alto contenuto di antocianine (174,20 mg/l) per questo motivo risulta ottima dal punto di vista salutistico ed è consigliata anche per la produzione di succhi pigmentati.

Riguardo alla prova sull'irrigazione della cv Valencia, si è visto che, da un punto di vista qualitativo, i frutti appartenenti alla tesi PRD hanno presentato una colorazione leggermente migliore ed una percentuale di succo maggiore (52%) rispetto ai frutti della tesi DI; inoltre il °Brix e l'acidità titolabile sono risultati maggiori nei frutti delle piante sottoposte a PRD e DI rispetto a quelli della tesi CI. Il peso specifico dei frutti non è stato influenzato dall'irrigazione; la concentrazione totale di carotenoidi e vitamina C è risultata maggiore nel succo dei frutti della tesi PRD e DI rispetto a quelli della tesi CI.

Conclusioni

Possiamo affermare che questo lavoro, nonostante necessiti di ulteriori verifiche e approfondimenti, ha fornito una mappa con i valori nutritivi delle foglie degli agrumi più coltivati in Sicilia. Come sappiamo tutto ciò può essere utile per modificare i piani di concimazione in cui spesso alcuni elementi sono in eccesso. Infatti è stato visto che non sempre ad una

Tab. 1 - Contenuto degli elementi minerali nelle foglie (media dei 3 anni).
 Tab. 1 - Leaf mineral content (average data) of three years.

Cultivar	N (%)	Ca (%)	Mg (%)	K (%)	Na (%)	P ₂ O ₅ (%)	Cu (ppm)	Fe (ppm)	Mn (ppm)	Zn (ppm)
Arancio										
Navelina (Butera)	2,35	3,85	0,38	1,01	0,27	0,28	27,54	175,25	39,51	67,65
New Hall (Augello)	1,96	2,98	0,32	0,88	0,32	0,31	31,56	327,94	22,97	80,09
Navelina (Augello) vecchio cl.	2,97	2,68	0,29	0,88	0,33	0,38	44,24	202,07	39,86	65,96
Brasiliano 92 (Lascari)	1,65	3,40	0,30	1,01	0,28	0,43	28,05	538,73	21,56	48,20
Ribera W.Navel (Ganduscio)	2,32	2,85	0,20	0,92	0,42	0,34	30,54	218,95	36,84	66,82
Brasiliano (Augello)	2,65	3,20	0,39	1,09	0,27	0,38	27,14	249,75	39,41	73,36
3033 (Augello) brasiliano	2,58	2,20	0,34	0,88	0,35	0,35	24,51	248,82	36,67	81,77
Brasiliano non colti. (Augello)	1,70	3,35	0,41	0,79	0,26	0,38	31,60	257,00	25,16	65,60
Thomson (Augello)	2,43	2,82	0,29	1,09	0,23	0,36	73,73	291,31	36,76	76,92
Navelate(Augello)	2,50	4,30	0,35	0,80	0,31	0,36	40,14	297,44	33,75	59,62
Lanelate (Augello)	2,42	4,16	0,39	0,85	0,29	0,31	19,73	297,74	35,59	64,77
Fischer (Augello)	2,21	3,50	0,41	0,63	0,35	0,28	23,43	418,29	35,55	51,22
Vaniglia (Augello)	2,62	3,88	0,37	1,01	0,39	0,40	25,13	273,42	33,75	90,27
Vaniglia (Marcenò)	2,17	3,85	0,28	0,76	0,26	0,40	28,16	358,96	14,86	68,60
Valencia (Marcenò)	2,18	4,44	0,21	0,44	0,32	0,54	19,78	698,09	40,30	88,94
Valencia (Campo Tigli)	2,05	3,49	0,52	1,24	0,26	0,28	30,79	317,84	31,60	65,15
Ovale Calabrese non colt. (Leone)	1,99	3,58	0,39	1,07	0,32	0,32	27,75	307,27	38,93	71,47
Ovale Calabrese (Leone) colt.	1,88	4,36	0,25	0,52	0,32	0,27	24,90	219,90	36,85	84,64
Moro (Butera)	2,08	3,40	0,35	0,53	0,19	0,31	41,13	193,46	40,34	68,82
Tarocco (Carlentini)	2,22	3,85	0,25	0,99	0,26	0,37	28,36	199,96	33,75	90,06
Sanguinello (Butera)	1,86	3,15	0,27	1,86	0,30	0,34	27,15	239,60	34,93	89,22
Navelina ISA 315 nuovo cl. (Augello)	2,25	3,22	0,37	1,08	0,25	0,40	27,91	276,86	29,10	81,35
Limone										
Femminello(Leone) non coltivato	2,21	4,19	0,17	0,48	0,28	0,30	59,84	159,59	29,92	19,91
Femminello(Leone) coltivato	2,09	3,29	0,24	0,72	0,35	0,32	19,97	179,71	27,96	19,97
Femminello (Bagheria) non colt.	1,92	2,27	0,20	0,95	0,21	0,40	78,93	177,58	55,25	19,73
2KR (Corvaia)	1,75	3,64	0,74	0,72	0,20	0,34	28,87	136,75	28,87	66,69
Zagara bianca (Corvaia)	1,89	4,01	0,29	0,69	0,29	0,30	34,36	137,90	36,17	71,08
Lunario (Augello)	2,09	3,48	0,38	1,00	0,29	0,44	29,62	204,37	34,61	71,17
Mandarino										
Avana ombelicato (Marcenò)	2,88	2,50	0,27	0,92	0,34	0,37	27,34	359,95	12,57	45,90
Tardivo 19 (Lascari)	2,77	2,27	0,40	0,96	0,31	0,51	30,87	142,68	40,03	84,64
Tardivo Ciaculli (Campo Tigli)	2,12	3,35	0,39	1,00	0,31	0,28	33,73	282,71	33,75	73,65
Tardivo Ciaculli (Gargano)	2,21	3,32	0,46	0,70	0,30	0,45	26,94	236,32	28,75	42,54
Tardivo Ciaculli (Gargano) non colt.	2,04	3,26	0,26	0,55	0,22	0,30	39,49	217,22	53,32	19,75
Tardivo Ciaculli (Marcenò)	2,57	3,06	0,31	0,58	0,21	0,42	26,12	325,44	19,48	42,98
Tardivo Ciaculli (Augello)	2,33	3,79	0,22	1,22	0,26	0,35	29,39	374,65	40,78	94,16
Nova (Augello)	2,15	3,10	0,52	1,17	0,24	0,34	51,25	337,31	36,55	67,34
Nova (Gargano)	1,84	2,91	0,41	0,69	0,26	0,41	27,34	394,49	21,57	55,98
Clementine Monreal -(Butera)	2,44	3,43	0,26	0,781	0,18	0,40	22,18	229,63	35,45	78,93
Clementine SRA63 (Lascari)	2,55	4,35	0,41	1,06	0,32	0,34	24,97	273,47	31,56	76,91
Clementine SRA64 (Lascari)	2,38	3,16	0,37	1,22	0,33	0,50	40,01	272,91	31,34	79,86
Mandarino 3DN6 (Lascari)	2,44	3,31	0,33	1,18	0,35	0,44	24,96	291,08	34,74	76,86
Clementine Nules (Lascari)	2,41	3,37	0,31	1,16	0,34	0,36	31,45	294,19	33,64	59,32
Avana (Augello)	2,71	2,52	0,38	0,69	0,24	0,40	26,54	253,40	27,66	82,87
Marisol (Augello)	2,44	3,24	0,20	0,80	0,39	0,35	29,25	301,33	376,82	78,81

Tab. 2 - Caratteristiche qualitative dei frutti (media dei 3 anni).
 Tab. 2 - Fruit quality traits (average of three years).

Cultivar	Peso (g)	Altezza (mm)	Larghezza (mm)	Indice forma	Spessor e buccia (mm)	N° logge	N° semi sani	N° semi abortiti
Arancio								
Navelina (Butera)	224,08	50,58	50,51	1,01	3,98	11,64	0,0	0,0
New Hall (Augello)	290,33	59,05	58,45	1,03	4,41	10,29	0,0	0,0
Navelina (Augello)	213,06	48,85	49,11	0,98	3,38	10,63	0,0	0,0
Brasiliano 92 (Lascari)	223,65	75,17	77,48	0,97	5,72	10,05	0,0	0,0
W.Navel (Ganduscio)	287,78	56,45	55,87	1,00	3,70	10,67	0,0	0,0
Brasiliano non coltivato (Augello)	237,70	50,05	53,56	0,93	4,58	10,45	0,0	0,0
Vaniglia (Augello)	209,18	46,70	50,00	0,93	3,67	10,50	0,06	0,0
Brasiliano non coltivato (Augello)	183,33	45,51	45,66	0,98	3,55	10,17	0,0	0,0
Fischer (Augello)	214,93	46,29	49,97	0,92	4,05	10,57	0,0	0,0
Moro (Butera)	144,13	43,02	43,65	1,00	3,61	10,63	0,92	0,20
Brasiliano 3033 (Augello)	248,69	50,47	54,58	0,93	4,48	10,33	0,0	0,0
Vaniglia (Marcenò)	264,62	54,60	55,70	0,97	4,03	11,42	2,14	0,36
Thomson (Augello)	260,54	54,77	55,83	1,00	2,89	10,40	0,0	0,0
Sangunello (Butera)	187,35	48,41	51,43	0,94	3,63	10,17	0,09	0,0
Navelate (Augello)	198,81	72,76	74,49	0,98	4,19	9,08	0,0	0,0
Ovale Calabrese coltivato (Leone)	205,75	76,47	72,24	1,06	3,89	10,58	0,79	0,67
Ovale Calabrese non colt. (Leone)	171,87	71,04	67,14	1,06	3,38	10,46	1,75	1,46
Lanelate (Augello)	244,10	78,06	73,73	1,06	2,80	11,25	0,11	0,0
Valencia (Campo dei Tigli)	193,82	70,23	70,96	0,99	3,89	9,71	1,58	0,42
Valencia (Marcenò)	149,51	47,63	49,43	0,64	4,18	6,69	0,42	0,08
Limone								
Lunario (Augello)	205,32	77,82	75,35	1,93	4,35	13,03	0,81	0,37
Femminello non coltivato (Mineo)	112,25	70,07	59,05	1,19	6,42	9,89	3,08	1,25
Zagara bianca (Corvaia)	152,56	59,37	44,85	1,30	5,87	9,99	6,53	1,90
2kr (Corvaia)	136,96	52,38	43,51	1,21	4,23	10,23	8,93	1,77
Femminello coltivato (Leone)	152,40	71,45	71,62	1,02	6,60	9,56	5,77	0,33
Femminello non coltivato (Leone)	157,60	72,21	74,93	1,01	6,46	9,46	4,79	0,38
Mandarino								
Clementine Monreal (Butera)	117,22	35,71	35,90	1,00	1,89	9,22	15,10	1,18
Clementine Nules (Lascari)	78,95	33,03	37,05	0,91	1,48	8,31	4,39	0,44
Clementine SRA 64 (Lascari)	92,45	35,97	41,17	0,89	1,59	8,69	5,78	0,41
Clementine SRA 63 (Lascari)	99,58	35,65	41,97	0,84	1,38	8,97	4,94	0,69
Nova (Augello)	123,55	35,20	41,68	0,84	2,27	10,77	0,92	0,03
Nova (Gargano)	157,61	39,05	48,15	0,82	1,71	10,60	7,77	0,84
Avana ombelicato (Marcenò)	135,46	57,22	63,34	0,92	3,34	10,91	16,25	3,89
Tardivo Ciaculli (Augello)	89,60	36,35	36,01	0,97	2,01	9,76	8,39	2,45
Tardivo Ciaculli (Marcenò)	117,56	39,32	39,23	0,94	2,19	10,67	10,65	1,40
Tardivo Ciaculli (Campo dei Tigli)	98,48	39,19	38,22	0,97	1,75	9,71	9,37	1,17
Tardivo Ciaculli nuc. (Gargano)	132,51	34,76	47,03	0,79	1,67	10,74	8,60	0,84
MTC-3DN6 (Lascari)	100,61	39,30	40,05	0,95	1,66	9,83	7,67	1,67
Tardivo Ciaculli non colt. (Gargano)	74,86	44,31	55,45	0,80	2,06	9,54	5,83	1,21

Tab. 2 - Caratteristiche qualitative dei frutti (media dei 3 anni).
 Tab. 2 - Fruit quality traits (average of three years).

	% succo	SST	Acidità (g / 100ml)	SST/A	Vitamina C (mg / 100ml)	Antocianine (mg / l)
Arancio						
Navelina (Butera)	31,28	12,43	1,03	12,24	21,49	0,0
New Hall (Augello)	32,63	11,53	1,38	9,08	33,03	0,0
Navelina (Augello)	29,29	11,13	1,05	10,56	25,16	0,0
Brasiliano 92 (Lascari)	37,87	13,00	1,63	8,18	31,05	0,0
W.Navel (Ganduscio)	37,34	11,80	1,85	7,28	28,63	0,0
Brasiliano non coltivato (Augello)	32,62	12,17	1,61	8,01	37,31	0,0
Vaniglia (Augello)	38,23	11,87	0,12	100,08	37,62	0,0
Brasiliano non coltivato (Augello)	29,31	13,63	1,85	7,47	33,92	0,0
Fischer (Augello)	32,52	11,58	1,08	10,96	32,22	0,0
Moro (Butera)	42,13	11,17	1,62	6,90	18,35	174,20
Brasiliano 3033 (Augello)	31,91	10,67	1,12	9,60	29,49	0,0
Vaniglia (Marcenò)	41,31	10,67	0,16	70,80	31,90	0,0
Thomson (Augello)	38,92	13,13	1,19	11,24	18,21	0,0
Sangunello (Butera)	39,13	10,53	1,65	6,94	36,81	63,70
Navelate (Augello)	48,39	11,80	0,69	18,26	36,03	0,0
Ovale Calabrese coltivato (Leone)	48,59	10,35	0,83	12,49	34,23	0,0
Ovale Calabrese non colt. (Leone)	47,52	11,20	0,95	11,92	32,90	0,0
Lanelate (Augello)	38,55	15,25	1,14	14,55	33,95	0,0
Valencia (Campo dei Tigli)	46,55	10,60	1,10	9,59	22,67	0,0
Valencia (Marcenò)	21,75	6,90	0,65	7,05	15,14	0,0
Limone						
Lunario (Augello)	40,51	9,40	8,91	1,59	146,66	0,0
Femminello non coltivato (Mineo)	25,98	7,95	5,39	1,47	110,84	0,0
Zagara bianca (Corvaia)	22,65	6,47	5,13	1,26	134,02	0,0
2kr (Corvaia)	24,27	6,83	5,37	1,27	168,62	0,0
Femminello coltivato (Leone)	32,18	7,30	5,42	1,35	103,76	0,0
Femminello non coltivato (Leone)	32,34	7,35	5,80	1,27	108,40	0,0
Mandarino						
Clementine Monreal (Butera)	30,53	11,33	0,99	11,52	21,83	0,0
Clementine Nules (Lascari)	29,14	12,43	0,72	17,24	35,27	0,0
Clementine SRA 64 (Lascari)	33,32	12,23	0,65	19,73	29,12	0,0
Clementine SRA 63 (Lascari)	33,53	12,13	0,72	17,27	31,79	0,0
Nova (Augello)	32,02	12,13	0,78	15,67	29,88	0,0
Nova (Gargano)	37,58	11,77	0,80	16,30	35,94	0,0
Avana ombelicato (Marcenò)	33,03	10,50	1,08	9,75	23,67	0,0
Tardivo Ciaculli (Augello)	39,11	10,33	0,88	12,36	20,22	0,0
Tardivo Ciaculli (Marcenò)	36,09	10,53	1,01	11,17	21,43	0,0
Tardivo Ciaculli (Campo dei Tigli)	27,46	12,40	1,01	12,36	24,90	0,0
Tardivo Ciaculli nuc. (Gargano)	32,81	10,30	0,92	11,23	20,60	0,0
MTC-3DN6 (Lascari)	34,03	11,83	0,86	13,84	20,85	0,0
Tardivo Ciaculli non colti. (Gargano)	35,57	10,45	0,60	17,47	19,98	0,0

Tab. 3 - Caratteristiche qualitative dei frutti di alberi di arancio cv Valencia sottoposti a irrigazione convenzionale (CI), irrigazione di una porzione dell'apparato radicale (PRD), irrigazione di deficit continuo (DI). In riga, lettere diverse indicano differenze significative.

Tab. 3 - Fruit quality traits of orange trees cv Valencia under conventional irrigation (CI), partial rootzone drying (PRD), and continuous deficit irrigation (DI). For each row, different letters indicate statistical differences.

Parametri	CI	PRD	DI
Peso (g)	156,7± 5,07a	145,8± 4,22ab	139,3± 4,31b
Peso specifico (g/ml)	1,020± 0,0042	1,013± 0,0046	1,012± 0,0042
Resa in succo (%)	51,5± 0,40a	52,0± 0,37a	49,3± 0,53b
Solidi solubili totali (°Brix)	11,9± 0,11b	12,3± 0,09a	12,5± 0,12a
Acidità titol. (g/100ml)	1,01± 0,015b	1,14± 0,017a	1,15± 0,025a
Indice di colore	0,904± 0,0045	0,904± 0,0047	0,900± 0,0049
Carotenoidi (mg/l)	29,1± 1,26b	32,3± 1,22ab	35,0± 2,08a
Vitamina C (mg/l)	362± 5,22b	371± 6,55ab	382± 4,76a

eccessiva concimazione corrisponde una migliore qualità del frutto. Riguardo al regime irriguo della cv Valencia, possiamo dire che tra le due tecniche tentate (tesi PRD e DI) si prefigura più sostenibile la tesi PRD rispetto alle altre.

Riassunto

Nel presente lavoro sono stati analizzati il contenuto minerale fogliare e le caratteristiche organolettiche dei frutti prelevati a piena maturazione di diverse varietà delle tre specie di agrumi (arancio, limone e mandarino) all'interno dell'intero territorio siciliano.

Lo scopo della ricerca è stato quello di stabilire dei parametri oggettivi attraverso i quali determinare le qualità carpologiche, chimiche e fisiche dei frutti per la qualificazione commerciale e per la caratterizzazione delle cultivar.

Un ulteriore studio è stato condotto su alcune piante della cultivar Valencia sottoposte a regimi irrigui controllati per verificarne lo stato nutrizionale e le caratteristiche dei frutti.

Parole chiave: *Citrus limon*, *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata*, antocianine, vitamina C.

Bibliografia

- FOGG D.N., WILKINSON N.T., 1958 *The calorimetric determination of phosphorus*. Analyst 83: 406-414.
- MORARD P., GULLO J.L., 1970. *Mineralization des tissus vegetaux en vue du dosage de P, K, Ca, Mg, Na*. Ann. Aron. 21: 229-236.
- RAPISARDA P., FALLICO B., IZZO R., MACCARONE E., 1994. *A simple and reliable method for determining anthocyanins in blood orange juices*. Agrochimica, 38: 157-164.

Studio di un prodotto innovativo di IV gamma: spicchi e bucce d'arancia

Giovanna Cortellino^{1*}, Domenico Carminati², Valentina Picchi¹ e Serena Gobbi¹

¹Consiglio per la Ricerca e Sperimentazione in Agricoltura - IAA Unità di Ricerca per i Processi dell'Industria Agroalimentare, Milano

²Consiglio per la Ricerca e Sperimentazione in Agricoltura - FLC Centro di ricerca per le Produzioni Foraggere e Lattiero-Casearie, Lodi

Study of an innovative fresh-cut product: orange segments and peels

Abstract. The peeling technique by vacuum infusion in water or in sugar syrup permits to obtain not only the intact fruit but also, as a by-product, a peel quite undamaged. The aim is the study of an innovative product, rich in nutraceutical compounds and with an original composition, which allows the recovery and the exploitation of the by-products resulting from fruit peeling. The product is composed of both segments and some parts of peel, which are further under-vacuum infused in sugar syrup in order to improve their pleasantness. The chemical-physical, nutraceutical, microbiological and sensorial profile of segments and peels are evaluated during the shelf-life.

Key words: peeling technique, under vacuum infusion, sugar syrup, nutraceutical compounds, microbiological stability, sensorial analysis.

Introduzione

Nella produzione di arance pronte per il consumo (IV gamma) l'operazione più delicata è la pelatura dei frutti. Attualmente la sbucciatura viene effettuata con pelatrici meccaniche, che provocano l'asportazione di parte della polpa con conseguente fuoriuscita di succo, oppure mediante infusione sottovuoto dei frutti in una soluzione enzimatica a base di pectinasi, la cui criticità è dovuta all'attività residua dell'enzima (Senesi *et al.*, 2004). Presso il CRA-IAA è stata messa a punto una efficace tecnica di pelatura che prevede l'infusione sottovuoto dei frutti immersi in acqua, da cui si ottiene non solo il frutto integro, ma anche la buccia minimamente danneggiata e impregnata di liquido. Dal punto di vista nutraceutico, oltre alla ben nota ricchezza di antiossidanti e vitamine del frutto, risulta di notevole interesse anche la composizione della buccia, contenente elevate quantità di pectine, flavonoidi, carotenoidi, acido ascorbico e fibra (Manthley e

Grohmann, 1996). Un limite al consumo di questo sottoprodotto è rappresentato, dal punto di vista organolettico, dalla componente amara presente nell'ampio bouquet di composti aromatici caratteristici della scorza; l'impregnazione sottovuoto in soluzioni zuccherine potrebbe migliorare la gradevolezza sensoriale della buccia d'arancia (Cháfer *et al.*, 2003). Scopo del presente lavoro è lo studio di un prodotto innovativo di arance di IV gamma, che permetta, inoltre, il recupero e la valorizzazione dei sottoprodotti derivanti dalla pelatura dei frutti. Per offrire al consumatore un prodotto più ricco e dalla formulazione originale, infatti, nella confezione dell'arancia di IV gamma vengono introdotte alcune parti di buccia, previa infusione sottovuoto in soluzione zuccherina per migliorare la loro gradevolezza. Inoltre questo studio si prefigge di valutare l'influenza sulle caratteristiche qualitative del prodotto finale, dell'operazione di pelatura, effettuata mediante infusione sottovuoto in soluzione zuccherina, come evoluzione dell'infusione in acqua.

Materiali e metodi

La materia prima, fornita dal Centro di Ricerca per l'Agrumicoltura e le Colture Mediterranee (CRA-ACM), è costituita da arance non trattate delle cultivar Tarocco e Navel. Le arance, dopo incisione longitudinale della buccia, sono state sottoposte a infusione sottovuoto sia in acqua che in soluzione di saccarosio (40°Bx) per 3 minuti e lasciate a riposo nelle rispettive soluzioni per 3 minuti prima della pelatura manuale. Le bucce, ottenute da entrambe le tecniche di pelatura, sono state sottoposte ad un'ulteriore immersione sottovuoto in una soluzione zuccherina (saccarosio, 40 °Bx) per 15 minuti (più 25 minuti di rilassamento). Successivamente gli spicchi e le relative bucce sono state confezionate in vaschette di polipropilene termosaldate, precedentemente sanitizzate mediante UV. I campioni sono stati analizzati alla preparazione e dopo 3, 6, 9 giorni di conservazione refrigerata (4 °C). Sono state effettuate le seguenti analisi: residuo secco, pH e acidità titolabile, contenuto totale di carotenoidi, polifenoli e flavonoidi, vitamina C, capacità antiossidante.

* giovanna.cortellino@entecra.it

Inoltre sono stati condotti test microbiologici per valutare la carica batterica totale, i batteri lattici e gli eumiceti (lieviti e muffe). Per ciascun tempo di conservazione sono state analizzate 3 confezioni. I risultati sono espressi in riferimento a 100g di prodotto tal quale. In corrispondenza dei tempi di scadenza considerati (3, 6, 9 giorni) sono stati condotti test sensoriali.

Risultati e discussione

Dall'analisi chimico-fisica della materia prima, le bucce si differenziano dalla polpa per il pH più elevato (~5,3 e ~3,5 rispettivamente per bucce e spicchi) e minore acidità (~1,3 e ~10 meqNaOH/100g rispettivamente), risultando pertanto più esposte ad un possibile rischio di proliferazione microbica in conservazione. I risultati confermano la ricchezza nutrizionale e le proprietà antiossidanti sia della polpa che della buccia delle arance. In particolare il profilo nutraceutico delle bucce si rivela di estremo interesse per il contenuto di vitamina C (Navel: 75,36 e Tarocco: 101,53 mg/100g), polifenoli (N: 247,70 e T: 271,81 mg catechina eq./100g) e flavonoidi (N: 84,80 e T: 66,13 mg rutina eq./100g) rendendole un ingrediente dall'elevato potenziale salutistico.

Dall'analisi sensoriale (fig. 1) sono risultati più accettabili i campioni di entrambe le cultivar che hanno subito la pelatura nello sciroppo, sia nel caso degli spicchi che delle bucce; queste ultime sono giudicate anche significativamente meno amare di quelle ottenute da arance pelate in acqua, nonostante entrambe subiscano la successiva impregnazione sottovuoto nello sciroppo. Nel corso della conservazione non vengono percepite modificazioni dell'aroma, mentre si osserva un aumento dell'acidità negli spicchi di arance Tarocco. I giudizi di consistenza non presentano andamenti costanti nei vari campioni.

La trasformazione delle arance in prodotto di IV

gamma non ha comportato conseguenze sulla qualità microbiologica che si mantiene inalterata durante la conservazione refrigerata (dati non riportati). In tutti i campioni, la carica batterica totale presente all'inizio (valore medio $3,2 \pm 0,4$ log ufc/g, senza significative differenze tra bucce e spicchi) rimane stabile nel corso della shelf-life (valore medio dopo 9 giorni $3,5 \pm 0,4$ log ufc/g). Anche i lieviti, presenti però con valori iniziali un poco più elevati nelle bucce rispetto agli spicchi (valori medi $1,8 \pm 0,7$ e $0,8 \pm 0,3$ log ufc/g, rispettivamente), non hanno registrato incrementi significativi di carica dopo 9 giorni (valori medi $1,9 \pm 0,6$ e $1,0 \pm 0,3$ log ufc/g, rispettivamente per bucce e spicchi). Nonostante le bucce siano caratterizzate da un elevato contenuto zuccherino (21-33 °Bx), dovuto agli step tecnologici, un pH piuttosto elevato e da valori di acidità titolabile molto bassi, la conservazione in condizioni di refrigerazione ha consentito di evitare fenomeni di proliferazione microbica.

Relativamente alle variazioni del profilo nutraceutico, che per necessità di sintesi sono riportate per la sola cultivar Tarocco (tab. 1), si evidenzia negli spicchi una diminuzione graduale del contenuto di vitamina C, significativa dal sesto giorno di conservazione. La pelatura in sciroppo sembra preservare almeno parzialmente il contenuto di vitamina C nelle bucce della cv Tarocco, che mostrano valori significativamente più elevati delle rispettive bucce pelate in acqua. Il contenuto in carotenoidi degli spicchi, che non presenta differenze significative fra le due cultivar e le due tipologie di pelatura, rimane costante nel corso della conservazione. Nelle bucce, invece, il contenuto dei carotenoidi è più elevato nella cv Tarocco, e si mantiene più elevato nel caso dei campioni che hanno subito la pelatura sottovuoto in acqua. Le bucce sono più ricche in polifenoli e flavonoidi dei rispettivi spicchi, e le loro quantità, simili nelle due cultivar, non risultano influenzate dal tipo di pelatura subita e

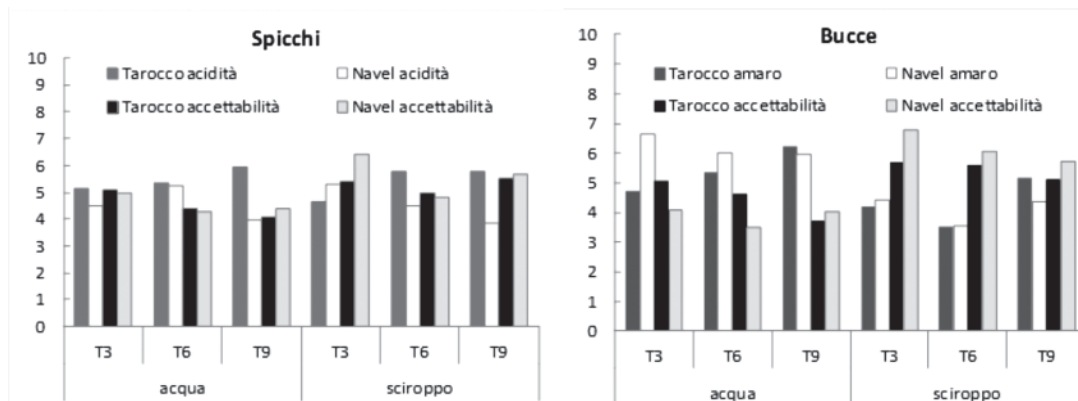


Fig. 1 - Analisi sensoriale di spicchi e bucce di arancia, ottenuti mediante tecnica di pelatura in acqua e in sciroppo, dopo 3, 6 e 9 giorni di conservazione.

Fig. 1 - Sensorial test of orange segments and peels, obtained by peeling technique in water and in syrup, after 3, 6 and 9 storage days.

Tab. 1 - Evoluzione delle caratteristiche nutraceutiche di spicchi e bucce di arance Tarocco nel corso della shelf life.
 Tab. 1 - Evolution of nutraceutical characteristics in segments and peels of cv Tarocco orange during the shelf life.

Campione		Giorni	Vitamina C (mg/100g)	Carotenoidi totali (mg β -carotene eq/100g)	Polifenoli totali (mg catechina eq/100g)	Flavonoidi totali (mg rutina eq/100g)	Capacità antiossidante (mmol acido ascorbico eq/100g eq/100g)
spicchi	acqua	0	43,50 \pm 3,04	2,32 \pm 0,26	73,27 \pm 2,46	14,22 \pm 3,56	0,119 \pm 0,009
	sciropo		46,86 \pm 3,19	2,21 \pm 0,17	82,63 \pm 3,43	18,42 \pm 4,71	0,136 \pm 0,023
	acqua	3	36,89 \pm 9,33	1,98 \pm 0,49	74,26 \pm 4,00	15,38 \pm 1,00	0,126 \pm 0,009
	sciropo		34,53 \pm 2,30	2,27 \pm 0,31	74,91 \pm 4,29	16,85 \pm 4,52	0,109 \pm 0,010
	acqua	6	18,32 \pm 1,11	2,35 \pm 0,11	68,63 \pm 5,32	18,99 \pm 3,38	0,079 \pm 0,005
	sciropo		20,91 \pm 1,41	2,45 \pm 0,10	68,69 \pm 6,00	13,03 \pm 1,44	0,087 \pm 0,006
acqua	9	19,80 \pm 2,40	1,87 \pm 0,56	64,75 \pm 10,77	13,86 \pm 1,88	0,078 \pm 0,007	
sciropo		27,15 \pm 6,18	2,42 \pm 0,20	79,89 \pm 6,93	16,73 \pm 2,62	0,082 \pm 0,003	
bucce	acqua	0	32,46 \pm 3,46	1,14 \pm 0,40	116,66 \pm 33,73	25,87 \pm 6,93	0,094 \pm 0,040
	sciropo		46,28 \pm 12,01	0,80 \pm 0,21	136,74 \pm 1,99	35,45 \pm 1,57	0,142 \pm 0,027
	acqua	3	26,03 \pm 3,33	1,43 \pm 0,20	129,91 \pm 4,19	26,61 \pm 2,20	0,118 \pm 0,028
	sciropo		42,71 \pm 7,18	0,62 \pm 0,05	142,68 \pm 12,88	31,16 \pm 2,40	0,104 \pm 0,020
	acqua	6	19,91 \pm 1,92	1,16 \pm 0,03	107,15 \pm 5,53	22,23 \pm 2,23	0,043 \pm 0,007
	sciropo		30,36 \pm 9,07	0,52 \pm 0,34	111,92 \pm 25,23	28,63 \pm 2,29	0,069 \pm 0,033
	acqua	9	17,64 \pm 2,99	1,33 \pm 0,24	115,78 \pm 8,55	23,13 \pm 1,66	0,052 \pm 0,034
	sciropo		40,59 \pm 7,33	1,31 \pm 0,06	135,27 \pm 6,01	36,65 \pm 6,59	0,108 \pm 0,018

rimangono costanti durante la conservazione. La diminuzione della capacità antiossidante si osserva, sia per gli spicchi che per le bucce, a partire dal sesto giorno di conservazione, ed è più evidente nei campioni della cv Tarocco. Andamenti analoghi sono registrati nei campioni ottenuti con i due diversi tipi di pelatura.

Conclusioni

L'analisi microbiologica e sensoriale dimostrano che l'arancia di IV gamma può raggiungere tempi di conservazione che si ritengono interessanti per il ciclo commerciale. Infatti al 9° giorno di conservazione i valori di accettabilità sensoriale del prodotto sono ancora mediamente buoni, questo limite potrebbe anche essere superato considerati i favorevoli risultati delle analisi microbiologiche e nutrizionali. La tecnica di pelatura proposta, che prevede l'infusione sottovuoto in sciroppo come evoluzione dell'infusione in semplice acqua, si è dimostrata valida in quanto non ne ha compromesso la qualità microbiologica migliorando l'accettabilità del prodotto da parte del consumatore. Dallo studio emerge la possibilità di proporre come parte integrante del prodotto di IV gamma le bucce, che finora erano considerate solo un prodotto di scarso, aprendo nuove prospettive di valorizzazione.

Riassunto

La tecnica di pelatura mediante infusione sotto-

vuoto in acqua o in sciroppo permette di ottenere non solo il frutto integro ma anche la buccia minimamente danneggiata. Lo scopo è di studiare un prodotto innovativo, più ricco e dalla formulazione originale, che permetta, inoltre, il recupero e la valorizzazione dei sottoprodotti derivanti dalla pelatura dei frutti. Il prodotto è composto sia da spicchi sia da alcune parti di buccia, sottoposte ad infusione sottovuoto in soluzione zuccherina per migliorare la loro gradevolezza. È stato valutato il profilo chimico-fisico, nutrizionale, microbiologico e sensoriale degli spicchi e delle bucce nel corso della *shelf-life*.

Parole chiave: tecnica di pelatura, infusione sottovuoto, sciroppo zuccherino, composti nutraceutici, stabilità microbiologica, analisi sensoriale.

Bibliografia

- CHÁFER, M., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, A., CHIRALT, A., FITO, P., 2003. *Microstructure and vacuum impregnation response of citrus peels*. Food Research International, 36: 35-41.
- MANTHEY, J.A., GROHMANN, K., 2001. *Phenols in citrus peel byproducts. Concentrations of hydroxycinnamates and polymethoxylated flavones in citrus peel molasses*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 3268-3273.
- SALVATORI, D., ANDRÉS, A., CHIRALT, A., FITO, P., 1998. *Characterization of some properties of fruits related to Vacuum Impregnation*. J. Food Process Eng., 21: 59-73.
- SENESE, E., CALABRETTO, A., DI CESARE, L., LO SCALZO, R., 2004. *Effect of two peeling techniques on the composition of fresh-cut oranges*. Proc. Int. Cong. Eng. Foods (ICEF): 664-669.