



# Unità di Ricerca “NUTRALP VDA”

## *“Nutraceutici in Valle d'Aosta”*

*Relazione Scientifica Finale*



In collaborazione con:



## ***PROGETTO OPERATIVO 1***

**“Longevità in un sorso di mela”**



## RILIEVI IN FRUTTETO E CAMPIONAMENTI

### RILIEVI IN FRUTTETO

Nel periodo immediatamente antecedente all'attivazione ufficiale del progetto, i ricercatori dell'Institut Agricole Régional di Aosta, facenti parte dell'unità di ricerca NUTRALP VDA, hanno effettuato rilievi fenologici in frutteto. Durante la stagione vegetativa sono state eseguite le seguenti pratiche colturali: potatura, e diradamento frutti, concimazione, irrigazione, difesa fitosanitaria, gestione del terreno. Non ci sono stati scostamenti dalla norma, a parte alcuni problemi riscontrati dal punto di vista fitosanitario per le continue piogge che hanno caratterizzato la primavera 2013 (problemi comunque risolti attraverso trattamenti supplementari). Sono stati eseguiti anche i rilievi fenologici durante la stagione vegetativa: germogliamento fioritura, maturazione dei frutti. Leggero posticipo (circa 10 gg) della fioritura rispetto all'anno precedente, soprattutto a causa delle continue precipitazioni associate a temperature piuttosto basse. Tale posticipo si è comunque attenuato con il procedere della stagione vegetativa.

La stessa procedura è stata condotta per il secondo anno di progetto. Fenologia: il 2014 è stato caratterizzato da un anticipo di una decina di giorni, rispetto all'anno precedente, per quanto riguarda le diverse fasi fenologiche del melo, soprattutto a causa delle giornate calde della prima decade di marzo che hanno anticipato il germogliamento delle piante. Nonostante i mesi successivi siano stati caratterizzati da precipitazioni frequenti, associate a temperature piuttosto basse, questo anticipo si è mantenuto fino alla fine della stagione vegetativa.

Per quanto riguarda l'aspetto fitosanitario, le condizioni di maggiore umidità durante la stagione vegetativa hanno favorito la comparsa di oidio nelle varietà più sensibili di melo, problema comunque risolvibile con una difesa fitosanitaria più mirata. In alcune varietà, in particolare la Golden Delicious, si sono manifestati casi di filloptosi anticipata a causa delle temperature e precipitazioni particolari durante la stagione.

Il tenore più elevato in umidità dell'aria, associato a temperature relativamente basse, ha favorito la comparsa della grana caratteristica sulla Renetta, migliorando l'aspetto qualitativo di questa varietà. La scarsa escursione termica giornaliera del mese di settembre non ha favorito una buona colorazione dell'epidermide di alcune varietà di melo, Jonagold in particolare.

Visto che è stata accettata la proroga di fine progetto al 31 dicembre 2015 sono state eseguite ulteriori attività in questa WP1: potatura, e diradamento frutti, concimazione, irrigazione, difesa fitosanitaria, gestione del terreno; sono iniziati i rilievi in frutteto sul germogliamento e fioritura. Da un punto di vista fenologico non ci sono grossi scostamenti, rispetto all'anno precedente, delle diverse fasi fenologiche. Per quanto riguarda l'aspetto fitosanitario le piogge durante il periodo primaverile hanno favorito le condizioni per qualche infezione di ticchiolatura, problema comunque risolvibile con una difesa fitosanitaria più mirata. Il volo della carpocapsa è in anticipo di una decina di giorni rispetto all'anno precedente.

La scarsità di precipitazioni nelle prime fasi fenologiche è stata compensata attraverso interventi irrigui, senza pregiudicare quindi il regolare accrescimento e sviluppo delle piante.

### CAMPIONAMENTI

Nel corso delle annate 2013 e 2014 sono stati programmati diversi step di campionamento di ciascuna varietà oggetto di studio, così da poter valutare l'andamento della concentrazione di molecole bioattive nel corso della maturazione del frutto, mentre nel corso del 2015 sono stati campionati solo alcuni campioni di mela alla raccolta per cercare di implementare i dati ottenuti nei due anni di progetto. In corrispondenza degli step di raccolta (maturità del frutto) sono stati effettuati test di maturazione per tutte le varietà, con valutazione dei seguenti parametri: peso, durezza, contenuto di amido e di zuccheri, acidità, etilene. Tutte le varietà di mele sono state raccolte al giusto grado di maturazione. Nell'anno 2013 per ogni step una parte delle mele raccolte è stata inviata ai laboratori del Dipartimento di Ingegneria Civile, Chimica e Ambientale (DICCA) dell'Università degli Studi di Genova, dove i campioni sono stati in parte essiccati e tritati (dopo aver separato buccia e polpa) e in parte stoccati interi per la conservazione a -20°C. Nell'anno 2014 e 2015 invece tutti i campioni di mele raccolte nei diversi step sono stati essiccati e polverizzati presso il laboratorio dell'ente capofila. In corrispondenza dello step di raccolta una parte dei campioni è stata destinata alla produzione del sidro sperimentale. Solo per la varietà Ravéntze, una parte dei campioni è stata destinata alla produzione di sidro commerciale da parte del partner Maley.

### SIDRIFICAZIONE

Per ciascun anno di progetto, tutte le varietà di mele sono state raccolte al giusto grado di maturazione e una parte del raccolto è stato destinato alla trasformazione in sidro, operazione effettuata nella cantina sperimentale dello IAR. A tale scopo le mele sono state suddivise in 6 blocchi omogenei, 3 destinati alla sidrificazione in bianco e 3 destinate alla macerazione. Per ogni blocco destinato alla sidrificazione in bianco si è proceduto alla macinatura, pressatura e ripressatura. Il mosto ottenuto è stato trasferito in damigiane, solfitato (50mg/L) e lasciato riposare per 72 ore in cella frigorifera a 4-5°C. Al termine delle 72 ore si è proceduto alla sfecciatura e all'inoculo di lieviti selezionati (LSA). Una volta terminata la fermentazione alcolica il sidro ottenuto viene separato dalla feccia attraverso diversi travasi e trasferito in contenitori colmi. A questo punto una parte del sidro ottenuto viene filtrato e confezionato, un'altra parte viene avviata a spumantizzazione. Al termine del processo di spumantizzazione i sidri vengono sboccati e confezionati.

Per ogni blocco destinato alla sidrificazione mediante macerazione, si è proceduto alla macinatura. Il macinato è stato trasferito in damigiane, solfitato (50mg/L) e lasciato riposare per 72 ore in cella frigorifera alla temperatura di 4-5°C. Al termine delle 72 ore, il macinato è stato pressato e riprestato. Il mosto

ottenuto è stato trattato esattamente come sopra. Tutti i sidri sperimentali di ogni varietà (Raventze, renetta, Jonagold e Golden sono stati fatti in 3 ripetizioni e in 2 versioni di prodotto finito (fermo e spumante metodo classico) per un totale di 48 sidri.

Nelle foto sottostanti alcuni dei passaggi del processo di trasformazione in sidro.

Si fa notare che solo per il 2015 non si avranno i risultati dei sidri finiti per mancanza di tempo vista la fine del progetto indicata al 31 dicembre 2015.

## ANALISI DI LABORATORIO

**MATURITÀ DEI FRUTTI** – nel laboratorio chimico IAR, in corrispondenza di tutti gli step di campionamento (vedi WP1), sono stati eseguiti i test di qualità delle mele al fine di raccogliere i frutti al giusto grado di maturità caratteristico di ciascuna varietà. I parametri valutati sono stati: peso, durezza attraverso il penetrometro, zuccheri come °BRIX attraverso rifrattometro, acidità totale mediante titolazione, amido mediante il test di Lugol.

**ANALISI CHIMICHE DI BASE SUI MOSTI E SIDRI** – sui mosti e sui sidri sperimentali sono state condotte diverse analisi chimiche di base per seguire l'andamento della sidrificazione e per avere un dato sulla qualità del prodotto finito. Presso il laboratorio di enologia della cantina sperimentale dello IAR sono quindi stati analizzati i seguenti parametri: pH, acidità totale, densità, gradi Babo, gradi Brix sui mosti, mentre pH, acidità totale, densità, alcool, sostanza secca, acidità volatile, acido malico, acido lattico, e zuccheri residui sul prodotto finito sidro.

**ESTRAZIONE MOLECOLE BIOATTIVE** – durante il periodo subito antecedente all'inizio ufficiale del progetto, i ricercatori dello IAR, in collaborazione con i ricercatori del DICCA (collaboratori dell'Unità di Ricerca), hanno effettuato una lunga e attenta ricerca bibliografica al fine di ottimizzare metodiche già in uso nei due laboratori. Si è quindi deciso di testare due differenti metodiche di estrazione al fine di verificare quale fosse più efficace nell'estrarre le molecole bioattive di interesse. In corrispondenza di ciascuno step di campionamento le mele sono state quindi inviate al laboratorio DICCA al fine di procedere alle prove di estrazione secondo protocolli analitici presenti in letteratura. Una parte dei campioni di ciascuna varietà ha subito un processo di separazione delle bucce dalle polpe e successivamente bucce e polpe sono state essiccate in stufa a 60°C per 24 h; un'altra parte di campioni di ciascuna varietà è stato utilizzato fresco e senza separazione tra buccia e polpa al fine di avere un confronto con il prodotto essiccato. Entrambe le estrazioni utilizzate sono state effettuate mediante l'uso di un solvente di estrazione. In particolare l'estrazione su matrice essiccata è stata effettuata seguendo la metodica di Rupasinghe H. P. V. and Kean C. (2008), che prevede l'essiccazione di buccia e polpa separatamente, la loro successiva polverizzazione ed estrazione con metanolo al 100% mediante l'uso di ultrasuoni, mentre l'estrazione da matrice fresca è stata effettuata seguendo la metodica di Mattivi et al. (2002) che prevede

l'estrazione con acetone al 70% del frutto intero. Le estrazioni di tutte le varietà con entrambe le metodiche sono state portate avanti dalla borsista in formazione seguita in parte dai ricercatori del DICCA e in parte dai ricercatori dello IAR. Ogni estrazione è stata condotta in doppio e gli estratti ottenuti sono stati stoccati a -20°C in attesa delle analisi. Nel secondo anno di progetto è stata portata avanti solo l'estrazione su matrice essicidata in quanto più idonea per la successiva fase di analisi in HPLC/MS.

**QUANTIFICAZIONE DEI POLIFENOLI NEGLI ESTRATTI, NEI MOSTI E NEI SIDRI** – la quantificazione dei polifenoli totali negli estratti di bucce e polpe e nei sidri è stata fatta seguendo la metodica colorimetrica Folin-Ciocalteu previa purificazione del campione con cartuccia SPE (metodo Rigo A. et al. 2000), già in uso nel laboratorio dello IAR. Questa metodica consente di eliminare una serie di interferenti presenti negli estratti (notoriamente zuccheri, proteine, acidi nucleici...) e di avere una misura più attendibile del contenuto in polifenoli totali. Ogni estratto è stato analizzato in doppio.

**CARATTERIZZAZIONE DEGLI ESTRATTI, DEI MOSTI E DEI SIDRI IN LC/MS** – dopo approfondita bibliografia e uno screening preliminare mediante LC/MS si è proceduto alla scelta e alla messa a punto della metodica da utilizzare per la caratterizzazione degli estratti di bucce e polpe di ciascuna varietà di mela oggetto di studio e dei sidri sperimentali e commerciali. La fase di messa a punto e scelta della metodica migliore sono state portate avanti grazie anche alla collaborazione di un ricercatore del DICCA Università di Genova che ha trascorso un periodo presso il laboratorio dello IAR a supporto dei ricercatori. La metodica che è stata scelta per l'analisi degli estratti e dei sidri è quella descritta da Vrhovsek U. (2004) leggermente modificata per ottenere una migliore risoluzione dei chromatogrammi degli estratti e dei sidri iniettati. La tecnica analitica HPLC permette di separare i singoli componenti di una miscela complessa per mezzo di una particolare colonna chromatografica. Lo spettrometro di massa (ESI-IT-MS/MS) permette di identificare tali componenti per mezzo di un rivelatore posto all'uscita della colonna chromatografica. Il rivelatore è dotato di una sorgente a ionizzazione elettrospray (ESI) e un analizzatore a trappola ionica (IT) che permette di lavorare utilizzando la tecnica tandem massa (MS/MS).

I vantaggi di questa tecnica analitica sono:

- a) Fornire precise indicazioni strutturali delle molecole sulla base del loro rapporto massa molecolare/carica elettrica ( $m/z$ ) per identificare composti sconosciuti.
- b) Quantificare i singoli composti perché il segnale elettrico del rivelatore è linearmente proporzionale alla concentrazione dei composti presenti nel campione.
- c) Aumentare la selettività e sensibilità sfruttando la tecnica MS/MS per la rivelazione di molecole diverse che hanno la stessa massa molecolare.

L'identificazione delle molecole polifenoliche presenti negli estratti e nei sidri analizzati è avvenuta attraverso confronto con standard, quando reperibili, altrimenti attraverso analisi MS/MS e confronto con un database on-line. Per la quantificazione tutti i campioni sono stati riiniettati e su ciascun picco

corrispondente ad una molecola identificata è stato fatto il MS/MS; la quantificazione è stata fatta sugli ioni frammento caratteristici della molecola facendo riferimento ad una curva standard.

Le condizioni cromatografiche sono descritte nell'articolo Vrhovsek U et al. (2004) e sono state adattate per lavorare con lo strumento in dotazione presso il laboratorio chimico dello IAR. Lo strumento utilizzato per la caratterizzazione dei polifenoli durante l'attività di ricerca è un Thermo Scinetific LTQ XL Linear Ion Trap Mass Spectrometer, dotato di un autocampionatore Accela AS, una pompa binaria, un termostato, una colonna cromatografica, sorgente ESI e rivelatore a trappola ionica lineare. Software di elaborazione dati Xcalibur.

## RISULTATI

### ANALISI CHIMICHE SULLE MELE

#### *Test maturazione*

Nelle tabelle 1 e 2 è presente l'elenco completo dei dati ottenuti nel corso dei test di maturazione effettuati nel corso del campionamento delle mele delle prime due annate.

Campione	Mele NUTRALP 2013: Medie Test Maturazione										
	data test	n° mele	PESO (g)	DUREZZA media (Kg/cm <sup>2</sup> )	media AMIDO (1-5)	media ETILENE (%>0,2 ppm)	ZUCCHERI (*brix)	ZUCCHERI (g/L)	ACIDITÀ (NaOH mL)	ACIDITÀ (ac. malico g/L)	THIAULT INDEX
M1	12/09/2013	10	335,473	6,980	3,350		12,4	110,84	8,6	5,762	168,46
M2	12/09/2013	10	260,532	10,430	1,760		10,4	89,64	12,2	8,174	171,38
M3	16/09/2013	10	195,872	6,910	1,850	0,189	12,6	112,96	7,2	4,824	161,2
M4	16/09/2013	10	293,020	9,720	1,480		11	96	12,5	8,375	179,75
M5	16/09/2013	10	292,295	6,820	3,900		13	117,2	8,2	5,494	172,14
M6	19/09/2013	10	208,142	7,475	3,350	0,010	11,6	102,36	6,5	4,355	145,91
M7	19/09/2013	10	296,392	7,075	3,600		12,4	110,84	8,2	5,494	165,78
M8	19/09/2013	10	265,262	7,740	3,800		13,4	121,44	7,4	4,958	171,02
M9	20/09/2013	10	123,061	11,770	0,750		12	106,6	13,2	8,844	195,04
M10	25/09/2013	10	209,981	8,265	3,100	1,171	13,2	119,32	8	5,36	172,92
M11	25/09/2013	10	197,036	7,635	4,100	0,767	11,8	104,48	5,8	3,886	143,34
M12	23/09/2013	10	232,875	9,890	1,950	1,246	11,8	104,48	13,1	8,777	192,25
M13	23/09/2013	10	260,453	10,100	1,050	0,139	11	96	15,5	10,385	199,85
M14	26/09/2013	9	70,275	12,161	1,111		13	117,2	13,9	9,313	210,33

Campione	Mele NUTRALP 2014: Medie Test Maturazione											
	data test	n° mele	PESO (g)	DUREZZA media (Kg/cm <sup>2</sup> )	media AMIDO (1-5)	media ETILENE (%>0,2 ppm)	ZUCCHERI (*brix)	ZUCCHERI (g/L)	ACIDITÀ (NaOH mL)	ACIDITÀ (ac. malico g/L)	media DA	THIAULT INDEX
M1	20/08/2014	10	78,0847	12,255	0,5	-	11,4	100,24	11,6	7,772	1,638	177,96
M2	20/08/2014	10	196,0485	10,255	1,21	-	10	85,4	10,4	6,968	1,655	155,08
M3	21/08/2014	10	230,6885	7,225	3	-	11,4	100,24	7	4,69	1,594	147,14
M4	21/08/2014	10	208,1964	7,715	1,75	-	11,4	100,24	7,5	5,025	1,628	150,49
M5	27/08/2014	10	65,5054	12,065	0,5	-	11	96	14,7	9,849	1,662	194,49
M6	27/08/2014	10	234,1176	9,76	1,34	-	10,2	87,52	10,1	6,767	1,765	155,19
M7	27/08/2014	10	239,5038	7,06	3,65	-	12,4	110,84	6,6	4,422	1,503	155,06
M8	28/08/2014	10	215,5301	7,565	2,05	0,0216	10,8	93,88	7,7	5,159	1,624	145,47
M9	09/09/2014	10	106,1783	11,79	1,15	-	10	85,4	9,8	6,566	1,72	151,06
M10	03/09/2014	10	213,8106	6,435	4,05	-	11,8	104,48	6,7	4,489	1,4	149,37
M11	03/09/2014	10	264,6729	8,255	2,85	-	12,4	110,84	8	5,36	1,366	164,44
M12	04/09/2014	10	239,7514	6,585	2,65	0,085	12,2	108,72	6,7	4,489	1,499	153,61
M13	11/09/2014	10	209,6367	9,805	3,25	0,1525	12	106,6	10,2	6,834	1,659	174,94
M14	11/09/2014	10	249,3876	9,56	2,55	0,056	11,6	102,36	7	4,69	1,696	149,26
M15	17/09/2014	10	240,0072	6,88	3,55	0,0367	12,8	115,08	7	4,69	1,253	161,98
M16	17/09/2014	10	241,0655	6,84	4,2	0,066	12	106,6	5,3	3,551	1,42	142,11
M17	06/10/2014	10	129,5049	10,61	1,8	-	12	106,6	8,85	5,9295	1,753	165,895

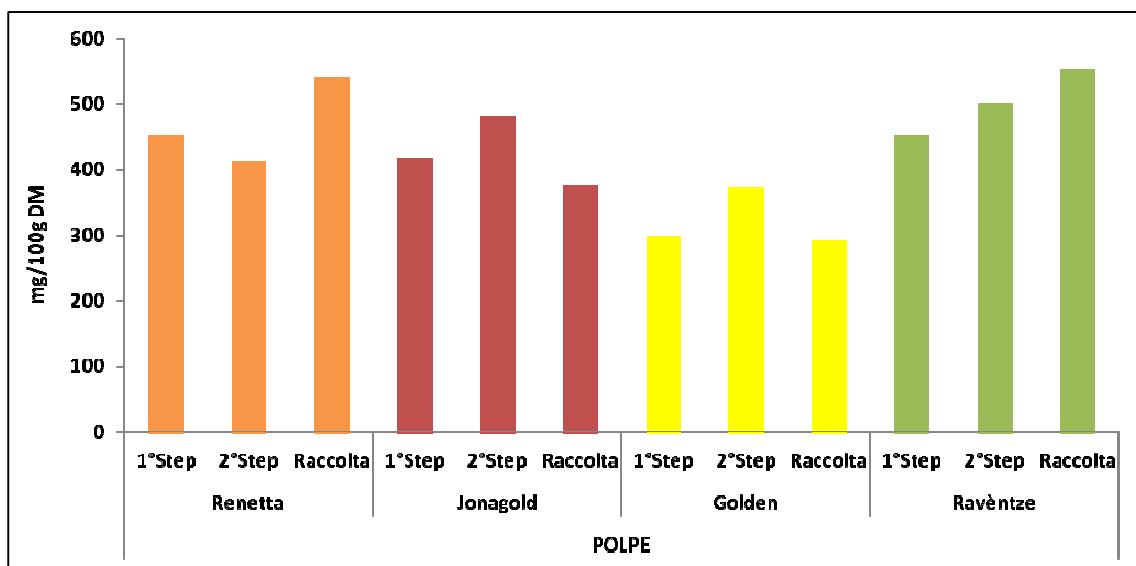
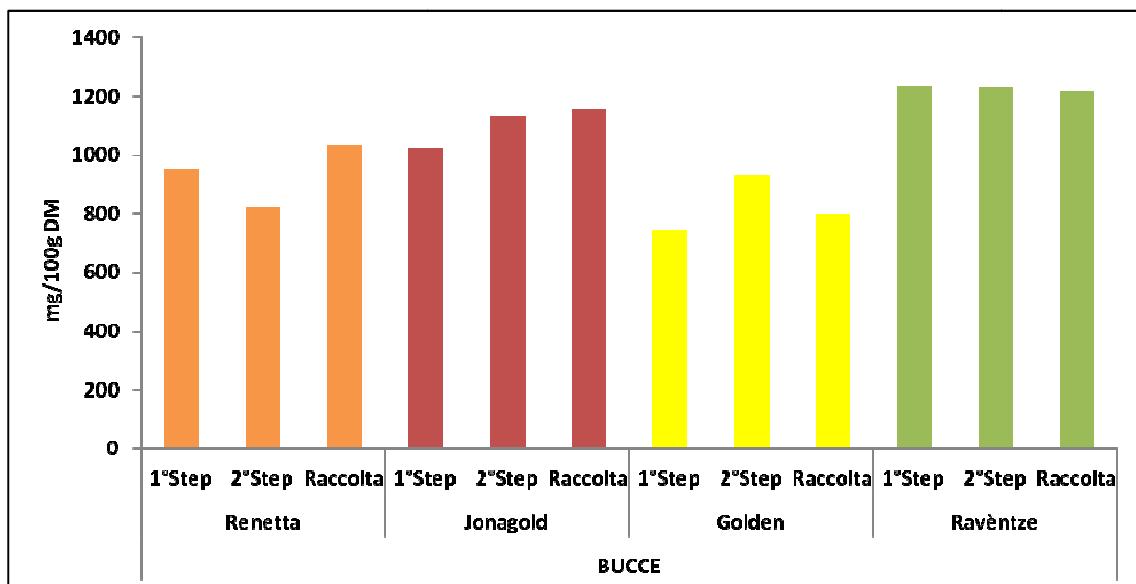
Tabelle 1 e 2. Elenco dei parametri misurati (valori medi) nel corso dei test di maturazione eseguiti sulle mele raccolte nelle prime due annate di lavoro.

Mele NUTRALP 2015: Test Maturazione																
Campione				Parametri maturazione												
CODICE	CULTIVAR	PRODUTTORE	STEP RACCOLTA	data fact	n° mela	PESO (g)	DUREZZA (kg/cm²)			ALIMENTO (g)	DA	TITRIBE (%)±2 ppm	ZUCCHERI (Mol)	ACIDITA'		pH
							a	b	media					tanak (ml)	ac. malico (g/l)	
M1	Raventoz	Maley	1	21/08/2015	10	100,54	11,08	11,61	11,545	0,5		10,6	15	10,95	8,05	
M2	Raventoz	Maley	2	25/08/2015	10	106,88	11,79	12,29	12,04	0,65	1,67	10,9	14,5	9,715	8,05	
M3	Scirocco	Ottin	Prematurazione	31/08/2015	10	222,51	10,13	10,95	10,24	1,32	1,71	10,6	11,4	7,638		
M4	Raventoz	Maley	Raccolta	04/09/2015	10	164,11	12,28	12,78	12,505	0,65	1,62	11	12	8,04	8,05	
M5	Raventoz	Ottin	Raccolta	11/09/2015	10	218,11	9,45	9,28	9,365	2,75	1,65	12	11,8	7,906	8,2	
M6	Dolcezza	Ottin	Raccolta	21/09/2015	10	266,37	7,06	7,09	7,075	3,65	1,45	13,8	6,5	4,221	8,17	
M7	Raventoz	Maley	Raccolta	22/09/2015	10	143,67	10,4	10,26	10,33	1,8	1,61	12,4	10,3	6,901	8,11	

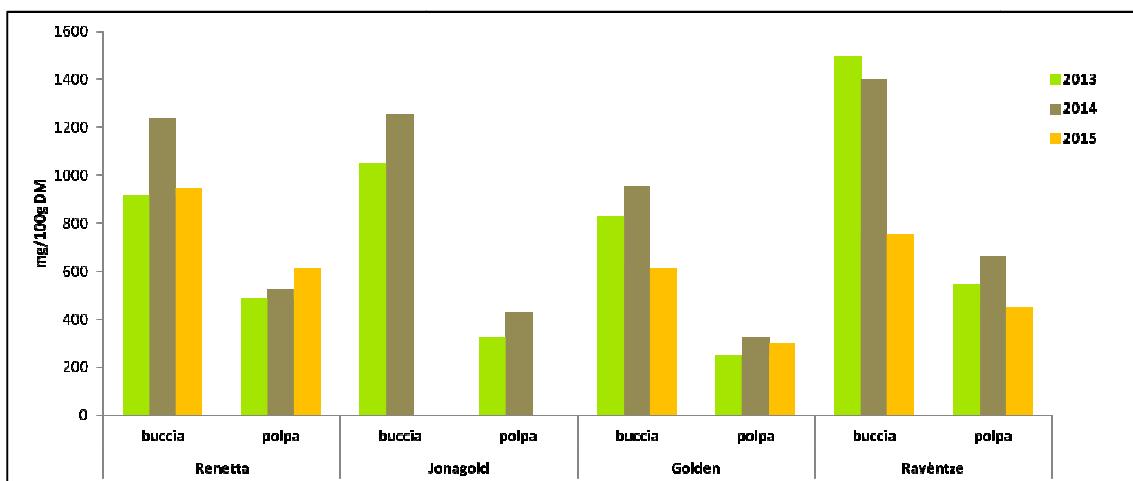
**Tabella 3.** Elenco dei parametri misurati (valori medi) nel corso dei test di maturazione eseguiti sulle mele raccolte nella terza annata di lavoro.

## QUANTIFICAZIONE POLIFENOLI TOTALI

Nella figura 1 è presente il grafico relativo all'andamento dei polifenoli totali (estratti metanolici) nei tre anni di campionamento, per un confronto intervarietà dell'andamento di tali molecole nel corso della maturazione.



**Figura 1:** contenuto medio, dei tre anni di campionamento, in polifenoli totali nel corso della maturazione nei campioni di bucce e polpe di mela.

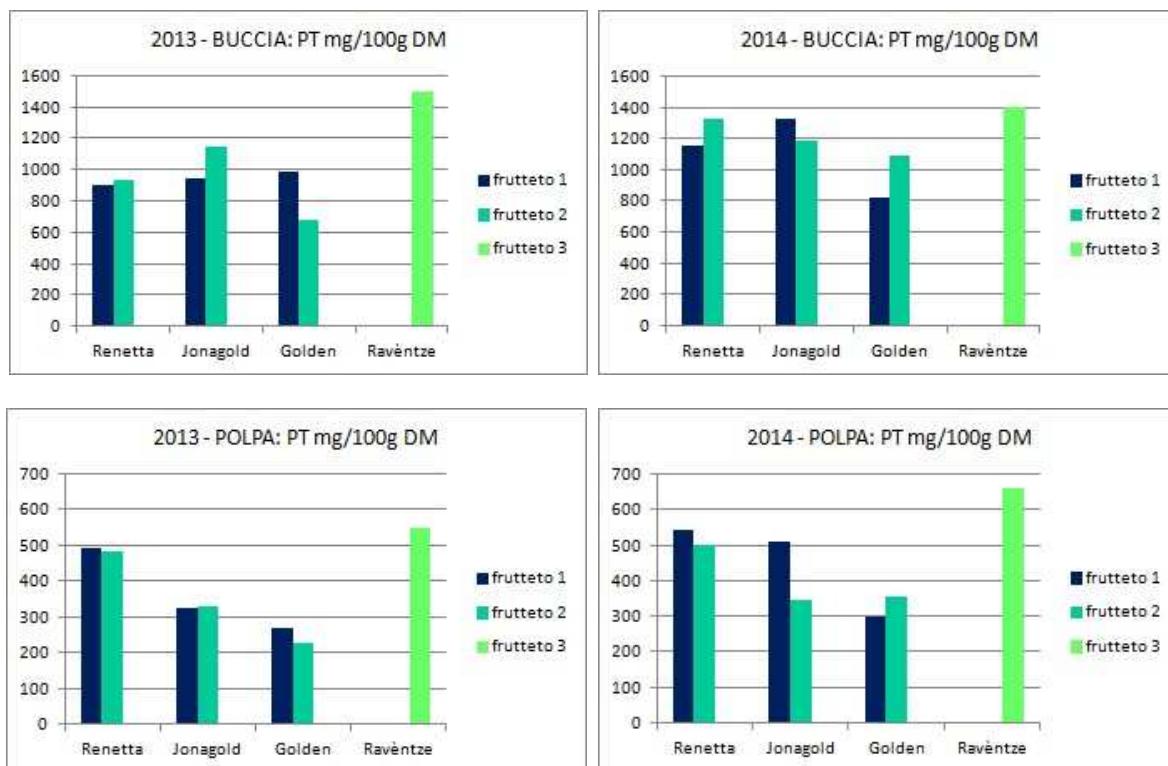


**Figura 2:** confronto dei valori di polifenoli totali presenti, alla raccolta, negli estratti di bucce e polpe di 4 differenti varietà di mele (Renetta, Jonagold, Golden, Ravèntze), nel corso di tre differenti annate (2013-2014-2015).

Come si può notare nei grafici presentati, il contenuto in polifenoli totali nella buccia e nella polpa delle mele analizzate è molto variabile a seconda della varietà, dell'annata, e del livello di maturazione del frutto. Ciò è dovuto al fatto che la concentrazione di tali molecole è fortemente dipendente dalle condizioni ambientali nelle quali si sviluppa il frutto, oltre che dalle condizioni meteorologiche che accompagnano la stagione vegetativa.

In linea generale e in maniera statisticamente significativa ( $p<0,001$ ), si osserva una concentrazione di polifenoli nettamente inferiore nelle polpe rispetto alle bucce, come già ampiamente noto in letteratura. Si tratta, infatti, di molecole che la pianta produce principalmente come difesa dagli agenti esterni, e che pertanto si localizzano in misura maggiore laddove la pianta è più esposta, appunto, al mondo esterno: in questo caso, a livello della buccia del frutto. Le varietà complessivamente più ricche in polifenoli totali sono risultate essere la *Ravèntze* e la *Jonagold* (seguite da *Renetta*), per quanto riguarda la buccia ( $p<0,005$ ), e *Ravèntze* e *Renetta* (seguite da *Jonagold*) per la polpa ( $p<0,005$ ).

Per quanto riguarda il confronto tra frutteti, si osservano differenze rilevanti all'interno della medesima varietà (Fig. 3), soprattutto nella buccia di *Jonagold* e *Golden* di tutte le annate ( $p<0,001$  per la prima annata in entrambe le varietà, rispettivamente  $p<0,005$  e  $p<0,001$  per la seconda annata) e nella polpa di *Jonagold* del 2014 ( $p<0,001$ ). Questo dato suggerisce la stretta dipendenza del contenuto in polifenoli del frutto dalle condizioni ambientali di crescita dello stesso (piccole variazioni di altitudine, esposizione, tipo di suolo del frutteto possono riflettersi in differenze anche rilevanti nel profilo chimico della mela).

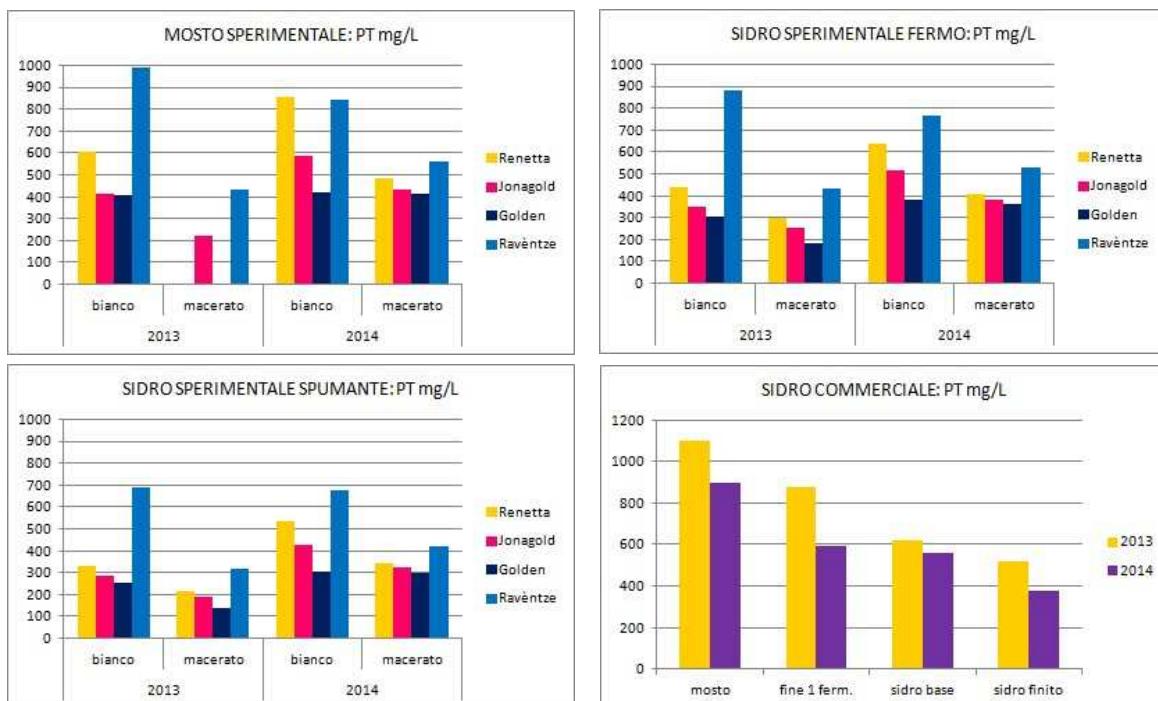


**Figura 3:** contenuto in polifenoli totali di buccia e polpa a maturazione completa del frutto nei diversi frutteti campionati. Non è riportata l'annata 2015 in quanto, per mancanza di tempo, è stato possibile fare il campionamento in un solo frutteto.

## QUANTIFICAZIONE POLIFENOLI TOTALI

L'elenco di tutti i dati raccolti per quanto riguarda la quantificazione dei polifenoli totali nei campioni di mosto e sidro (sperimentale e commerciale) delle prime due annate è presente nelle tabelle 1 e 2, mentre per quanto riguarda l'annata 2015 si è potuto eseguire tali analisi solo fino ai mosti.

Nella figura 1 sono presenti i grafici relativi al contenuto in polifenoli totali di mosti e sidri dei primi due anni di campionamento, per un confronto delle diverse tecniche produttive studiate.

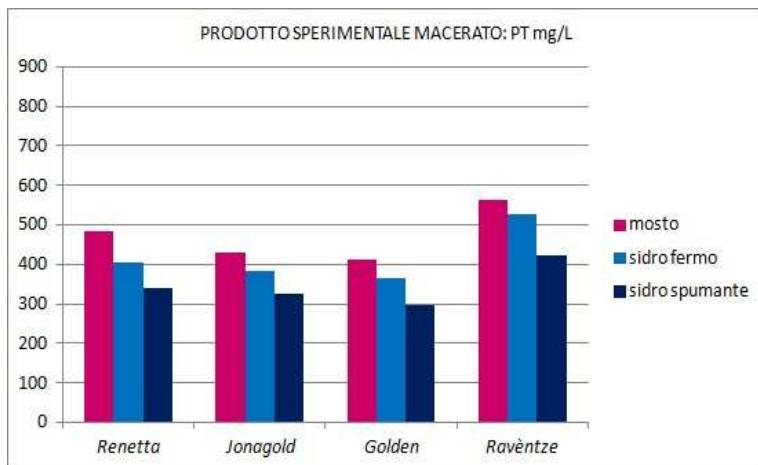


**Figura 1.** Contenuto in polifenoli totali di mosti e sidri sperimentuali e commerciali dei primi due anni di campionamento.

Come si può osservare nei grafici presentati, il contenuto in polifenoli totali di mosti e sidri risulta molto variabile a seconda della varietà di mela utilizzata, dell'annata e del tipo di lavorazione del prodotto. I valori più elevati sono stati ritrovati, in entrambe le annate di studio, nelle varietà *Raventze* e *Renetta*, che dal punto di vista statistico risultano essere significativamente diverse sia fra di loro che dalle altre due varietà ( $p<0,001$ )

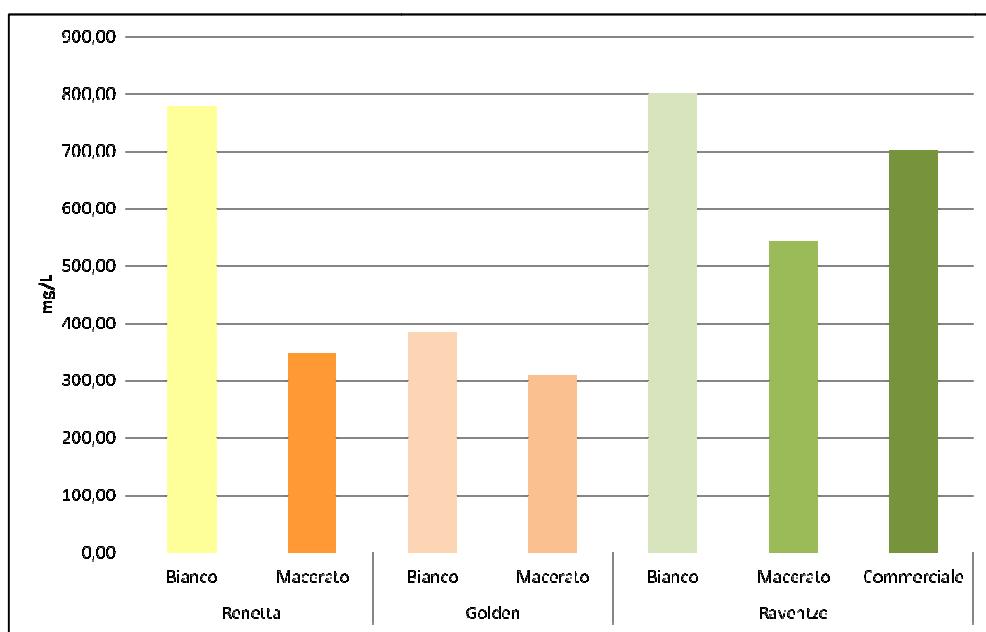
È stato evidenziato, in tutti i casi, un netto calo del contenuto in polifenoli totali nel prodotto sperimentale lavorato con macerazione rispetto a quello in bianco ( $p<0,001$ ), la cui causa probabile sono processi ossidativi cui va incontro il composto risultante dalla macinatura dei frutti nel periodo che precede la torchiatura (che nei mosti lavorati in bianco avviene immediatamente dopo la macinatura). Un calo del contenuto in polifenoli totali ( $p<0,001$ ), inoltre, è stato osservato ad ogni passaggio della lavorazione del prodotto: ovvero, da mosto (spremitura del frutto) a sidro fermo (prima fermentazione) a sidro

spumantizzato (seconda fermentazione). Anche in questo caso, il calo è dovuto a reazioni ossidative cui il prodotto viene inevitabilmente incontro in ogni fase della lavorazione, ed è più chiaramente visibile nei grafici presentati a titolo d'esempio in figura 2, separatamente per le lavorazioni in bianco e macerata relativamente alla sola seconda annata.



**Figura 2.** Contenuto in polifenoli totali di mosti e sidri della seconda annata.

Lo stesso andamento lo si può osservare nei mosti dell'annata 2015 (fig. 3) dove il contenuto in polifenoli totali risulta molto variabile a seconda della varietà di mela utilizzata e del tipo di lavorazione del prodotto.



**Figura 3.** Contenuto in polifenoli totali nei mosti dell'annata 2015.

Anche nella terza annata di produzione, si osserva un netto calo del contenuto in polifenoli totali nel prodotto sperimentale lavorato con macerazione rispetto a quello in bianco ( $p<0,001$ ), la cui causa probabile sono processi ossidativi cui va incontro il composto risultante dalla macinatura dei frutti nel periodo che precede la torchiatura (che nei mosti lavorati in bianco avviene immediatamente dopo la macinatura). Vista la scadenza del progetto, non è stato possibile raccogliere i dati delle analisi sui sidri finiti dell'annata 2015.

## ANALISI QUALI-QUANTITATIVA IN HPLC-MS

### *Mele: analisi del profilo polifenolico in HPLC-MS*

Nelle figure 1, 2, 3 sono presenti i grafici relativi al profilo polifenolico delle bucce delle mele della tre annate, all'ultimo step di raccolta, con rappresentazione delle molecole più abbondanti che costituiscono il profilo.

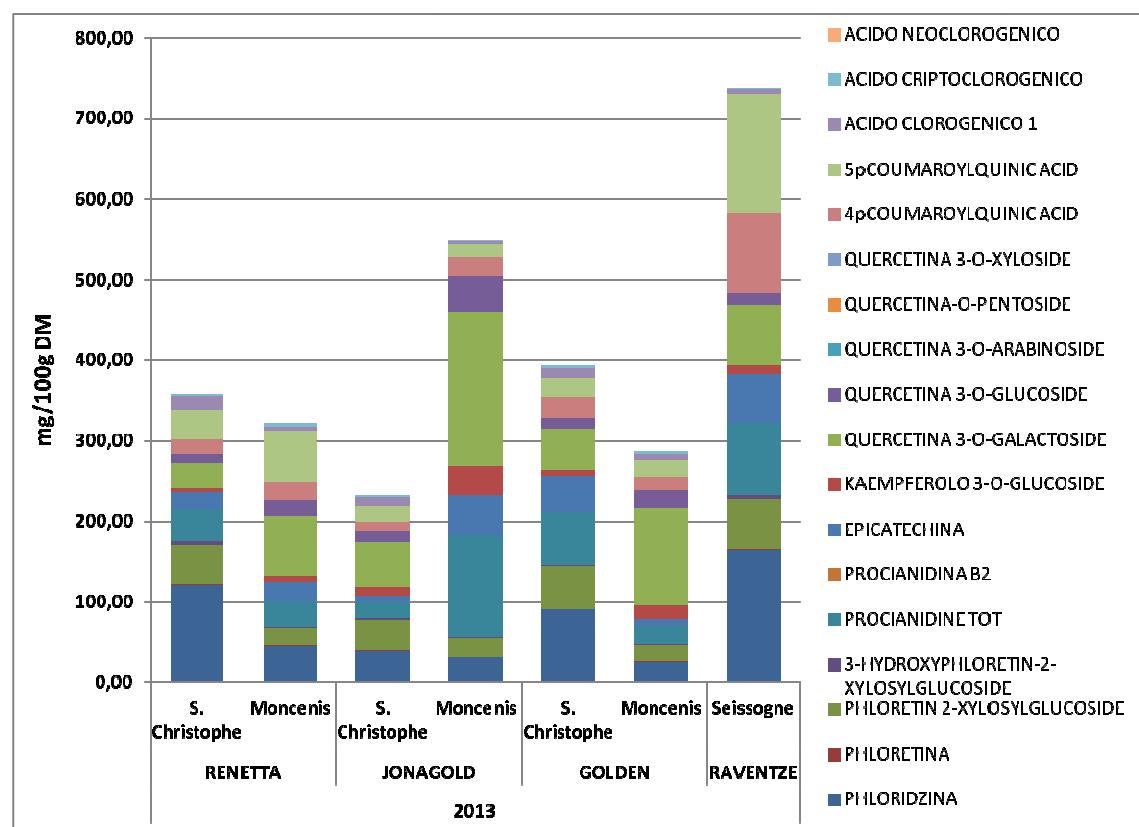


Figura 1. Profilo polifenolico delle bucce di mela della prima annata di campionamento.

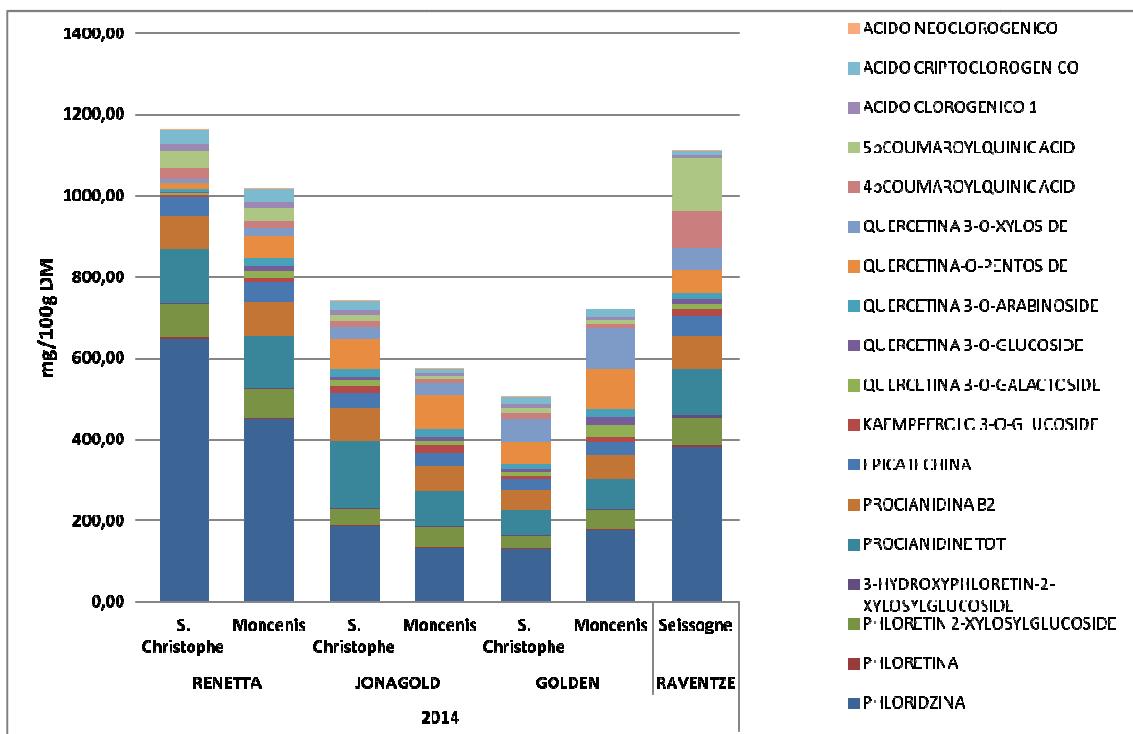


Figura 2. Profilo polifenolico delle bucce di mela della seconda annata di campionamento.

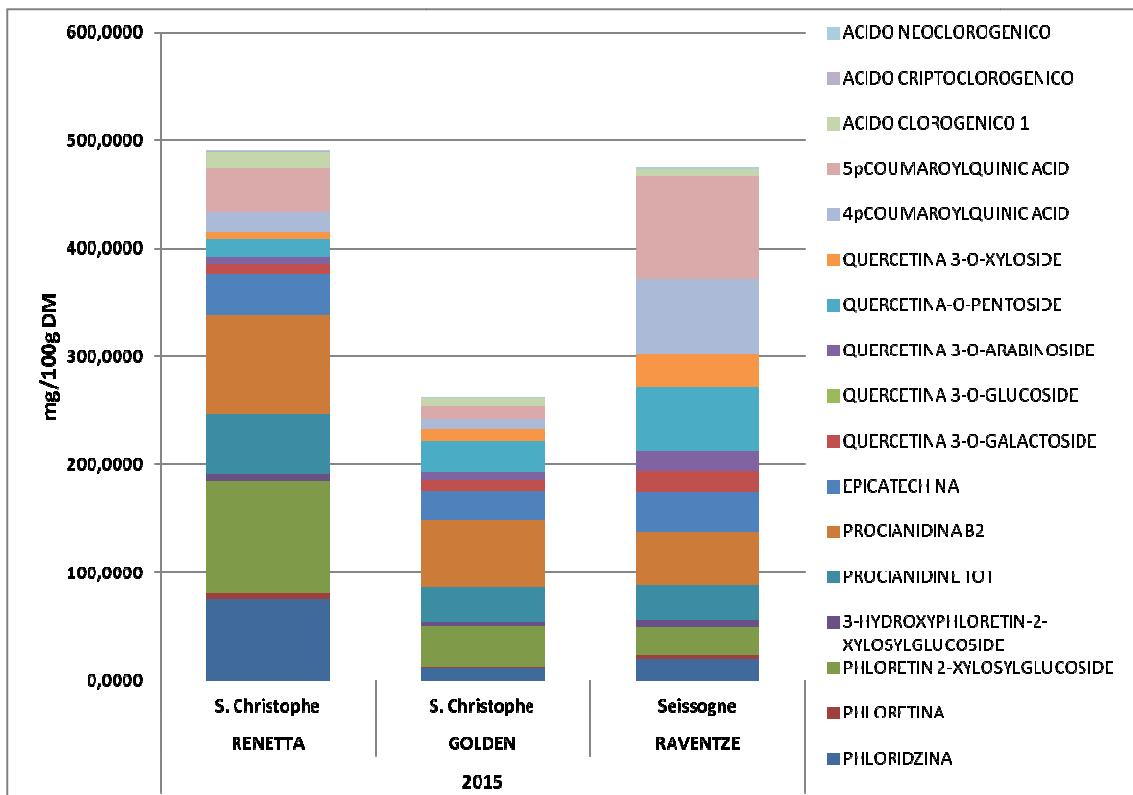
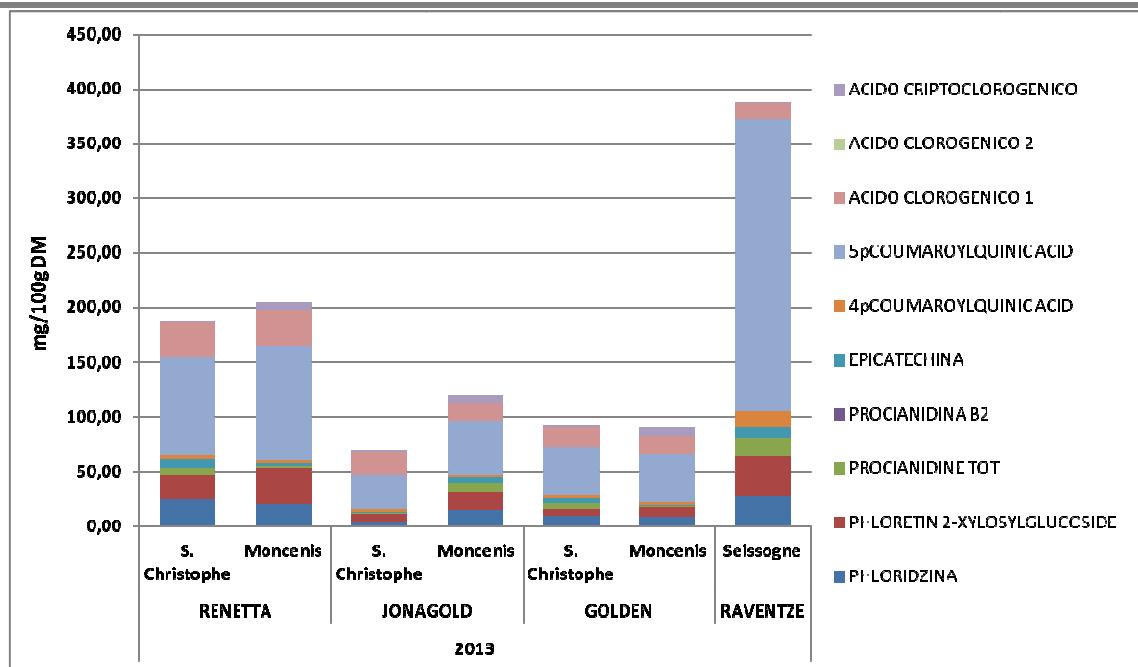


Figura 3. Profilo polifenolico delle bucce di mela della terza annata di campionamento; si fa notare che manca la varietà Jonagold in quanto sono venute a mancare le piante.

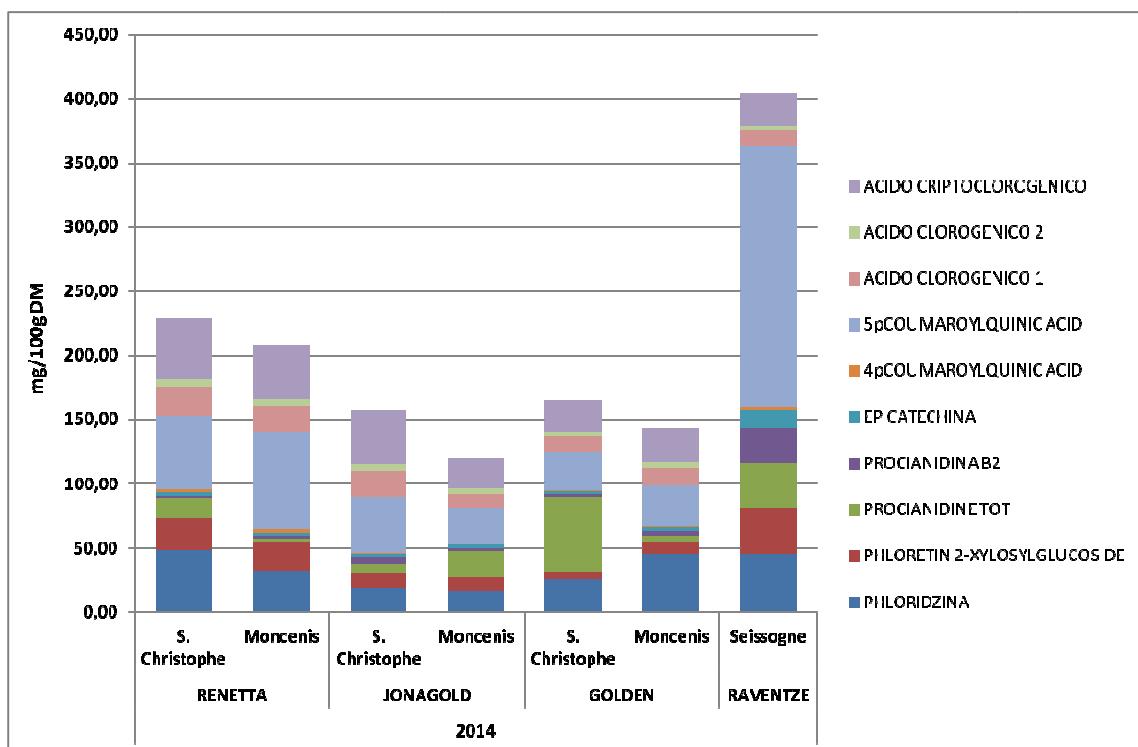
Sono state riscontrate alcune differenze tra le varietà, e all'interno della stessa varietà anche tra frutteti differenti (soprattutto nel caso di *Jonagold* e *Golden*). Questo a riprova di quanto l'ambiente possa influenzare la sintesi di queste molecole, soprattutto a livello della buccia dei frutti. Piccole differenze in termini di concentrazione delle singole molecole polifenoliche si notano anche all'interno della stessa varietà nel corso delle diverse annate prese in considerazione, anche questo a favore del fatto che tali molecole sono fortemente influenzate dall'ambiente e anche dalle condizioni climatiche.

In generale vi è un'abbondanza di molecole glicosilate (glucosidi/galattosidi di kaempferolo e quercetina), particolarmente importanti proprio per la loro caratteristica di essere legate ad un residuo zuccherino, che le rende maggiormente biodisponibili e quindi assorbibili a livello di organismo. Un altro importante composto fenolico presente nella buccia di tutte le varietà studiate è la Floridzina, un diidrocalcone noto per le sue proprietà biologiche (alcuni esempi: inibizione dell'assorbimento del glucosio a livello intestinale, della lipoperossidazione e della crescita delle cellule cancerogene). La varietà che presenta la concentrazione maggiore di tale composto fenolico è la Renetta. Altra importante classe di polifenoli identificati nelle varietà studiate sono gli acidi idrossicinnamici, in particolare Coumaroylquinic acid e chlorogenic acid che si trovano a concentrazioni importanti soprattutto nella varietà Ravèntze.

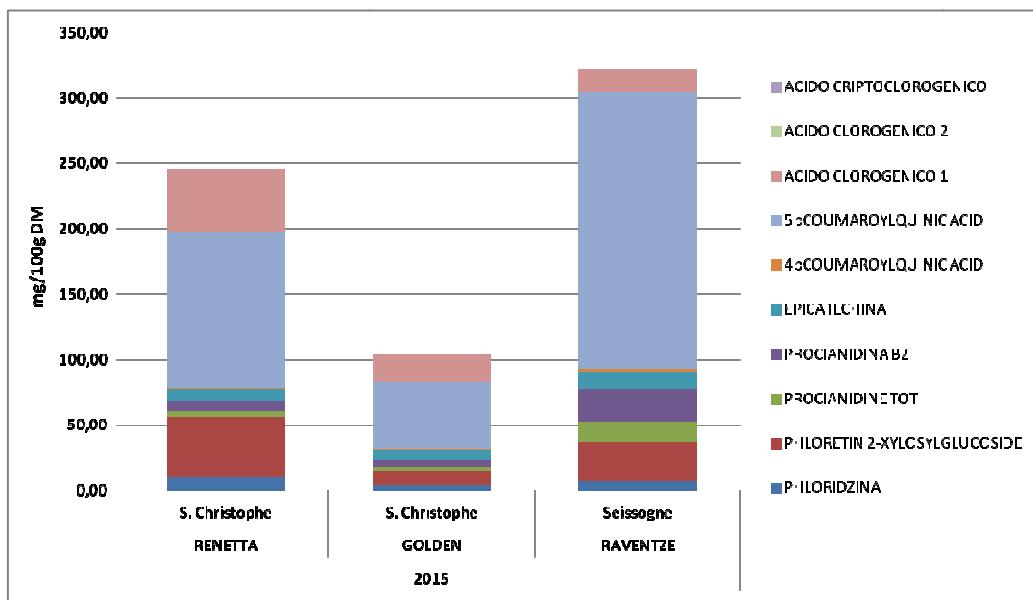
Le proprietà benefiche dei polifenoli studiati, comunque, verranno tratte con maggiore dettaglio in seguito. Nelle figure 4, 5, 6 è invece visibile il profilo polifenolico delle polpe delle stesse tre annate, sempre facente riferimento al solo step di raccolta. Anche in questo caso si notano alcune differenze intravarietali tra frutteti differenti, particolarmente nel caso della varietà *Jonagold*. Il profilo polifenolico delle polpe è generalmente meno ricco rispetto a quello delle bucce, ma vi si ritrovano importanti quantitativi di acidi idrossicinnamici, soprattutto il 5p-coumaroylquinic acid, molecole che sono in grado di esplicare una forte attività antiossidante. Come già osservato nelle bucce, la varietà che presenta la più elevata concentrazione di questi composti è la Ravèntze, e rispetto alle bucce, le polpe di tutte le varietà ne risultano più ricche.



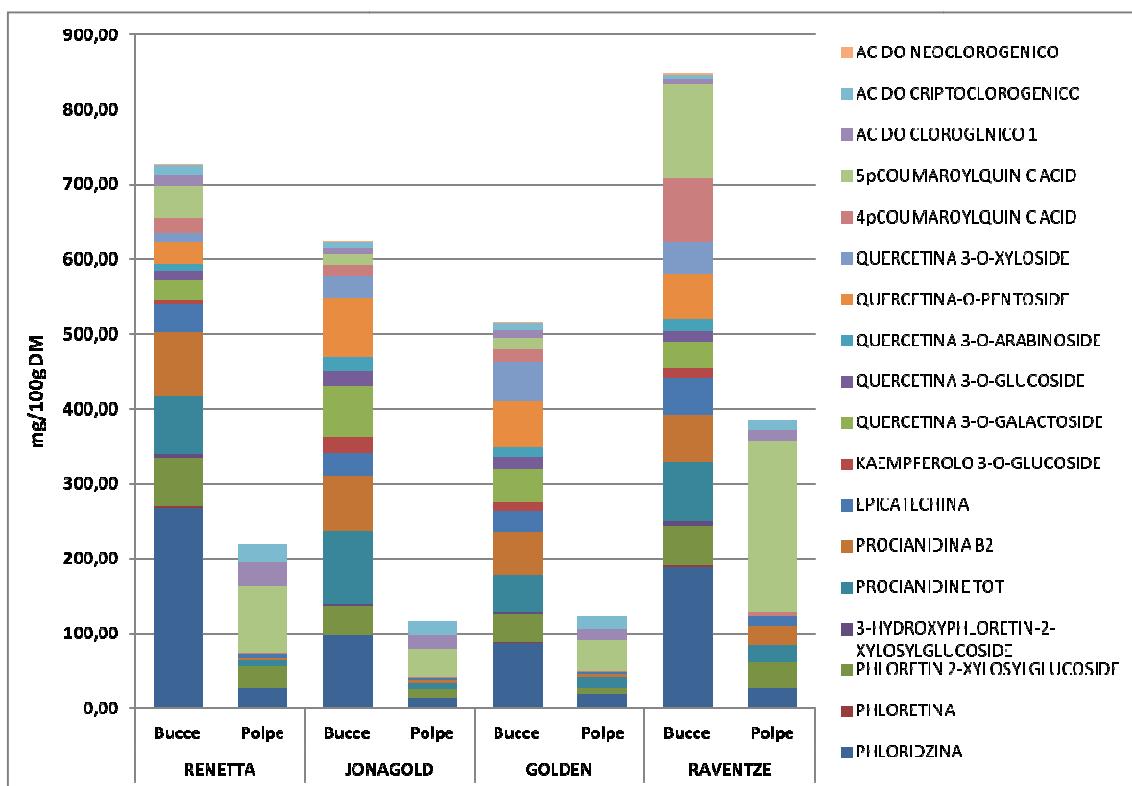
**Figura 4:** profilo polifenolico delle polpe di mela della prima annata di campionamento.



**Figura 5:** profilo polifenolico delle polpe di mela della seconda annata di campionamento.



**Figura 6:** profilo polifenolico delle polpe di mela della terza annata di campionamento. ; si fa notare che manca la varietà Jonagold in quanto sono venute a mancare le piante.



**Figura 7.** Profilo polifenolico medio delle bucce e delle polpe di tutte le varietà studiate nelle tre annate.

Effettuando un confronto statistico tra la composizione polifenolica delle bucce (media dei tre anni) e delle polpe (media dei tre anni), sono emerse alcune differenze significative ( $p<0.001$ ): indipendentemente dalle varietà, le bucce risultano essere più ricche in florizina, epicatechina, procianidine, queracetine glicosolate, phloretin-2-O-xylosylglucoside, 3-idrossiphloretin-2-xylosylglucoside, kaempferol-3-O-glucoside, queracetina, acido 4-p-coumaroilquinico; le polpe sono più ricche in acido 5-p-coumaroilquinico (Figura 7), in particolare la varietà Raventze, che presenta il valore più alto rispetto non solo alle bucce ma anche alle polpe delle altre varietà (Figura 6 e 7,  $p<0.001$ ).

#### ***Mosto e sidro: analisi del profilo polifenolico in HPLC-MS***

L'elenco di tutti i dati raccolti per quanto riguarda la quantificazione delle singole molecole nei campioni di mosto e sidro della prima annata è presente in allegato 3. Ci limitiamo di seguito alla presentazione di alcuni grafici esplicativi dei risultati ottenuti.

Nella figura 8, 9, 10 sono presenti i grafici relativi al profilo polifenolico dei mosti sperimentali delle quattro varietà di mela, delle tre annate, con la rappresentazione delle molecole più abbondanti che costituiscono il profilo.

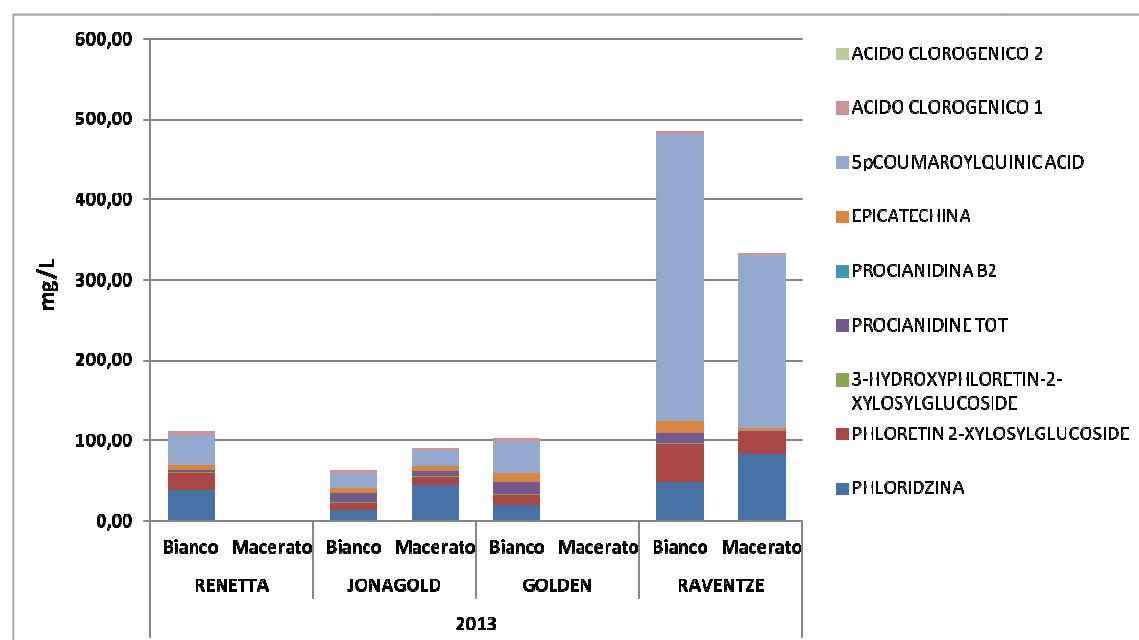


Figura 8. Profilo polifenolico dei mosti della prima annata di trasformazione.

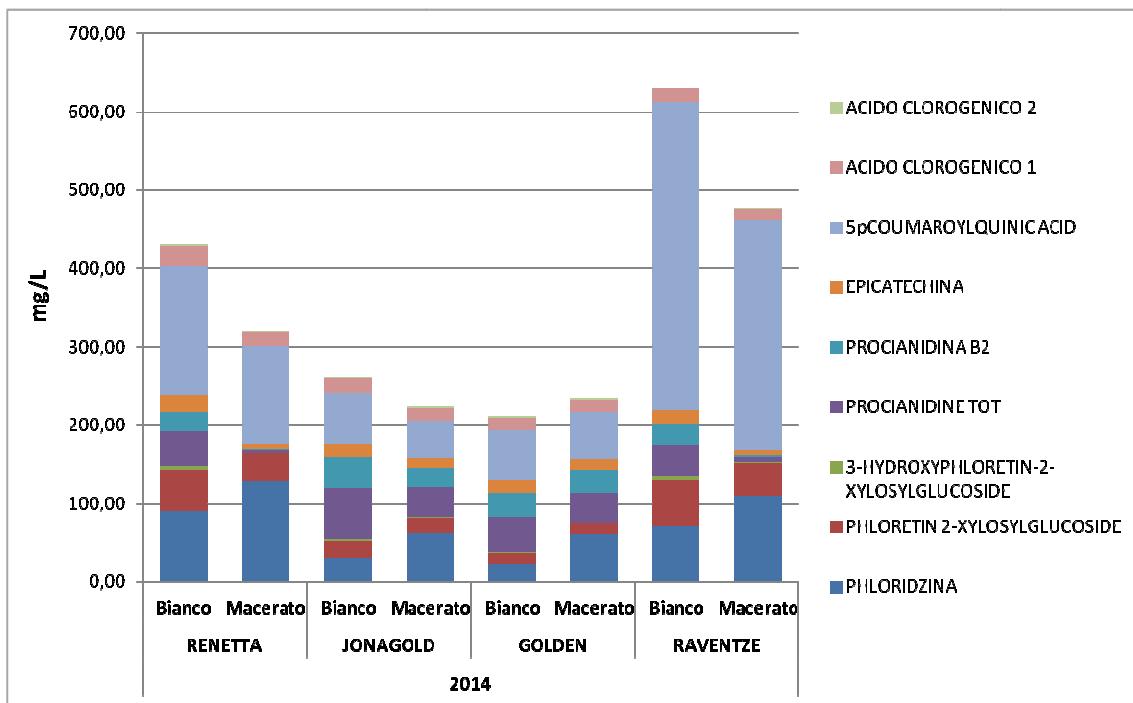


Figura 9. Profilo polifenolico dei mosti della seconda annata di trasformazione.

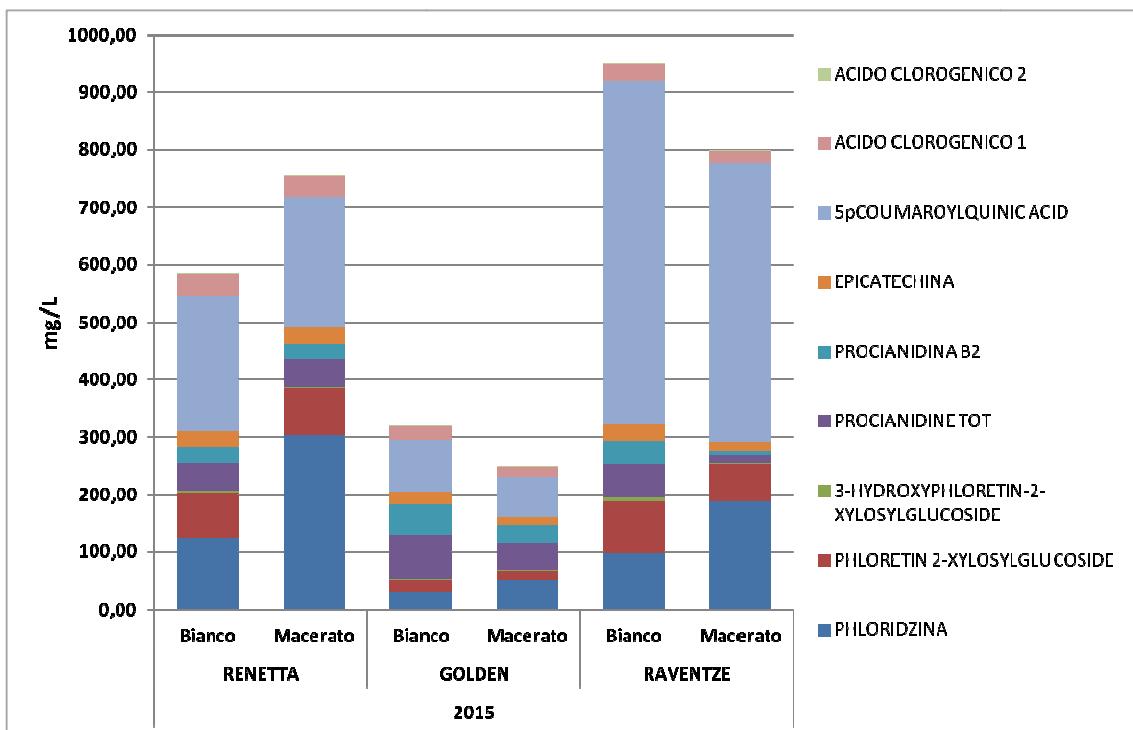


Figura 10. Profilo polifenolico dei mosti della terza annata di trasformazione.

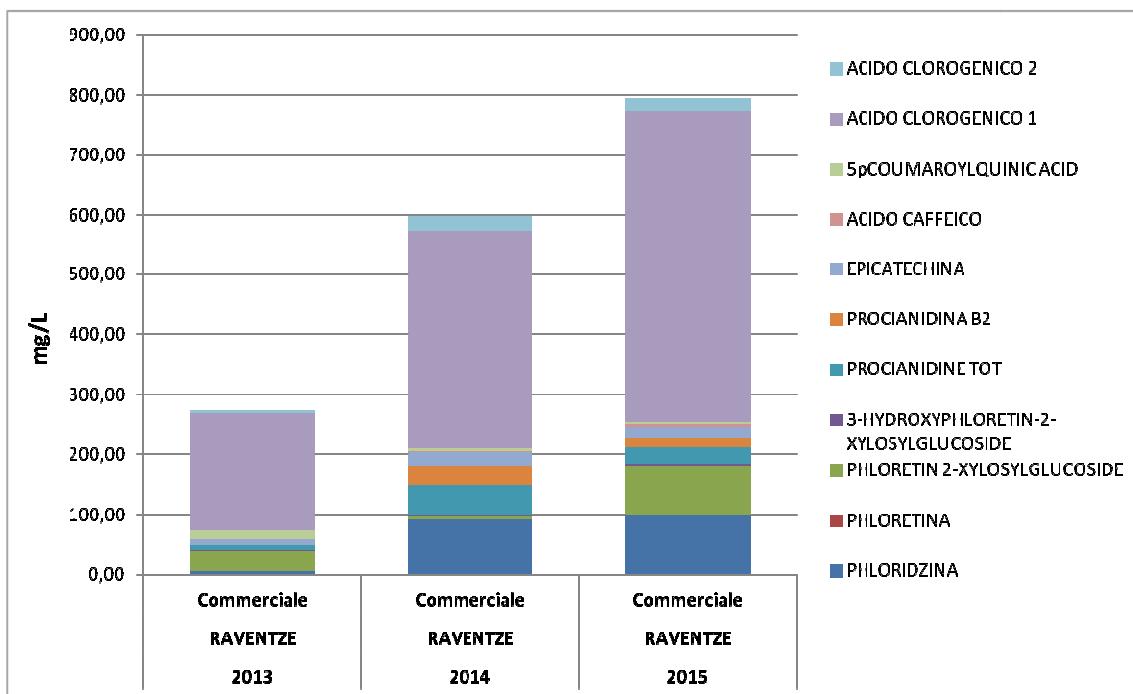


Figura 11. Profilo polifenolico dei mosti commerciali delle tre annate di trasformazione.

Come si può osservare, esiste una variabilità intravarietale relativa alle singole molecole come sono confermate anche le differenze relative al confronto tra lavorazione in bianco e lavorazione macerata. Queste differenze riguardano non tanto il profilo delle molecole maggiormente presenti, che risulta pressoché identico, quanto la concentrazione in cui si trovano queste molecole nel mosto derivato dalla pigiatura delle 4 varietà nelle due condizioni di processo tecnologico (in bianco o macerazione). È presentato anche il grafico relativo al prodotto commerciale *Ravèntze* (figura 11), che come si può osservare presenta notevoli differenze rispetto a quello sperimentale: in questo prodotto le molecole relativamente più abbondanti all'interno del profilo sono acidi clorogenici, presenti anche nel prodotto sperimentale ma a concentrazioni notevolmente più basse; le molecole che invece caratterizzano il prodotto sperimentale sono gli acidi idrossicinnamici, in particolare l'abbondanza di 5p-coumaroylquinic acid. Ciò che invece accomuna i due prodotti è la florizina, molecola già presente a concentrazioni importanti negli estratti di tutte le varietà. Tale confronto è visibile in figura 12 dove è rappresentato il profilo medio dei polifenoli maggiormente presenti in tutti i mosti sperimentali, ottenuti con due diverse tecniche di produzione, e in quello commerciale.

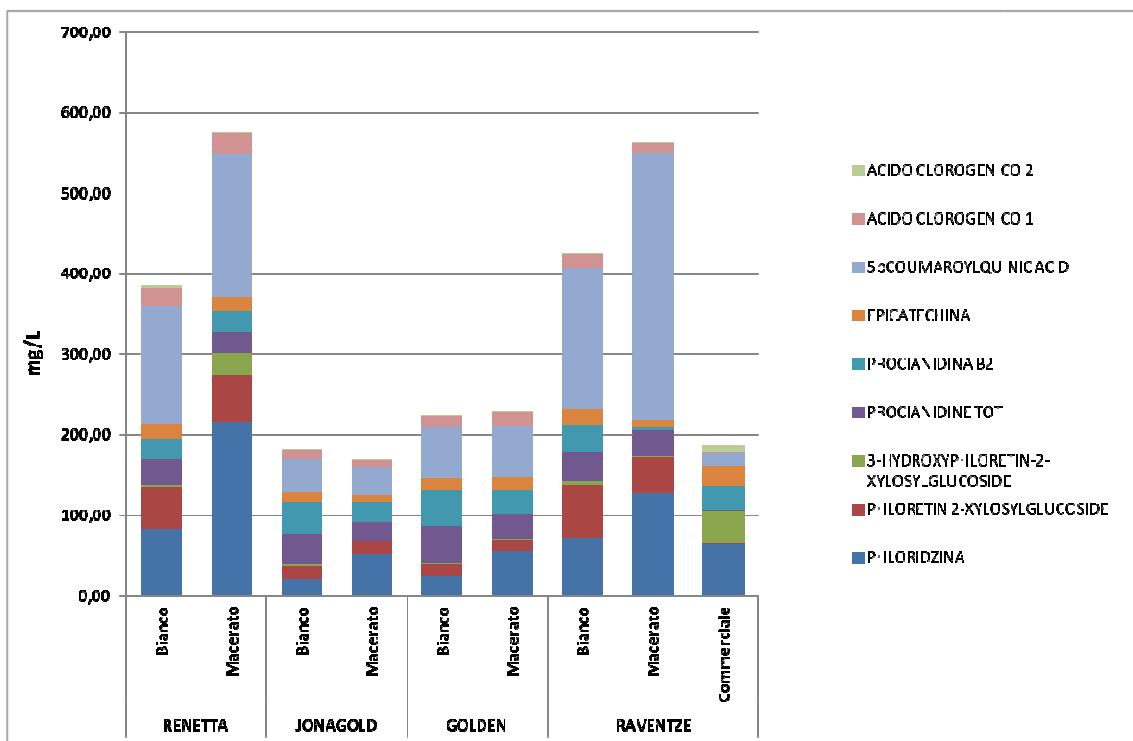


Figura 12. Profilo medio dei polifenoli contenuti nei mosti ottenuti da differenti lavorazioni (in bianco, macerato, commerciale)

In primo luogo, si può notare come il profilo della lavorazione sperimentale sia pressoché identico, fatta eccezione per alcune differenze di concentrazione dovuto alla varietà e al tipo di trasformazione: la lavorazione con macerazione infatti, se da un lato comporta una perdita di polifenoli totali probabilmente, come già detto, per fenomeni ossidativi, dall'altro sembrerebbe incrementare la concentrazione di alcune molecole. In particolare la macerazione sembrerebbe influire positivamente sulla concentrazione di Florizina e di 3-Hydroxyphloretin-2-Xylosylglucoside nella varietà *Renetta* (che presenta la concentrazione più elevata, rispetto alle altre). È interessante notare che la lavorazione commerciale, come anticipato in precedenza, presenta delle differenze di profilo polifenolico rispetto a quella sperimentale, tutto questo a riprova che la scelta del tipo di trasformazione possa influenzare la presenza di molecole a concentrazioni differenti. Nel caso del mosto commerciale si ha una concentrazione superiore di 3-Hydroxyphloretin-2-Xylosylglucoside, rispetto alla lavorazione sperimentale ottenuta con la stessa varietà (*Ravèntze*).

Nelle figure 13, 14, 15, 16 sono rappresentati i profili polifenolici dei sidri finiti ottenuti da ciascuna delle quattro varietà in maniera sperimentale con quattro differenti tipologie di produzione (in bianco fermo, in bianco spumante, macerato fermo e macerato spumante); solo per la varietà *Ravèntze* abbiamo anche il confronto con la produzione commerciale. I riisulati riguardano solo due annate di produzione in quanto nel terzo anno non c'è stata la possibilità di proseguire con la trasformazione per mancanza di tempo.

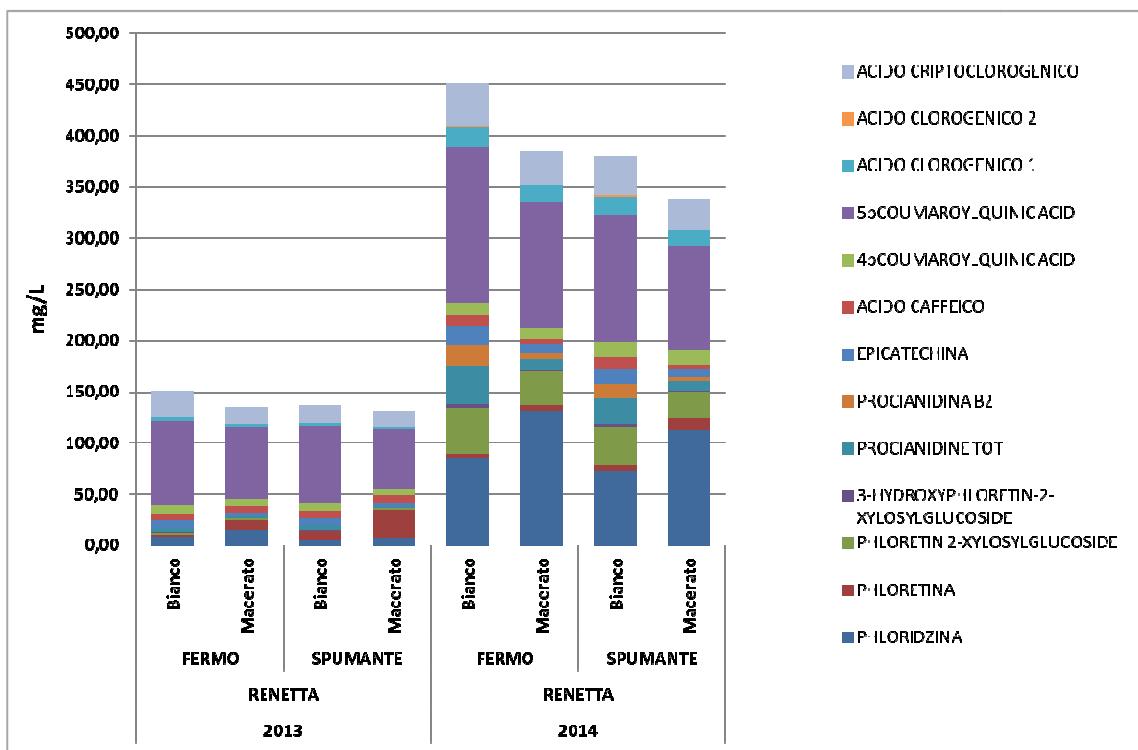


Figura 13. Profilo polifenolico dei sidri sperimentali ottenuti dalla varietà Renetta nei due anni di progetto.

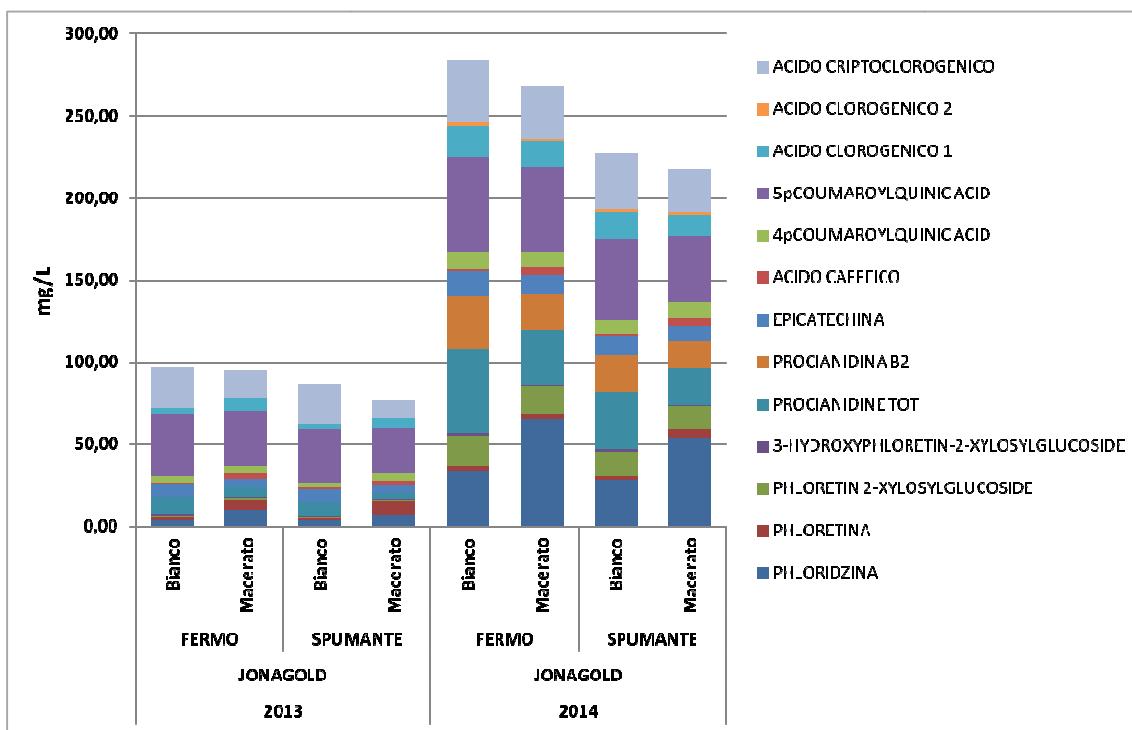


Figura 14. Profilo polifenolico dei sidri sperimentali ottenuti dalla varietà Jonagold nei due anni di progetto.

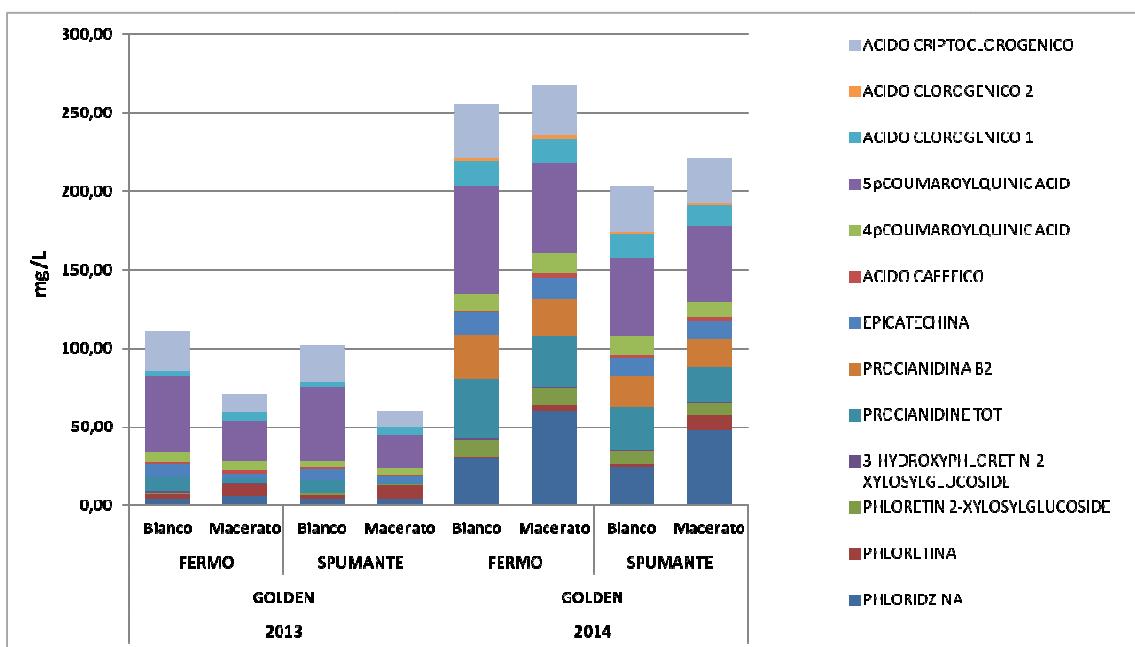


Figura 15. Profilo polifenolico dei sidri sperimentali ottenuti dalla varietà Golden nei due anni di progetto.

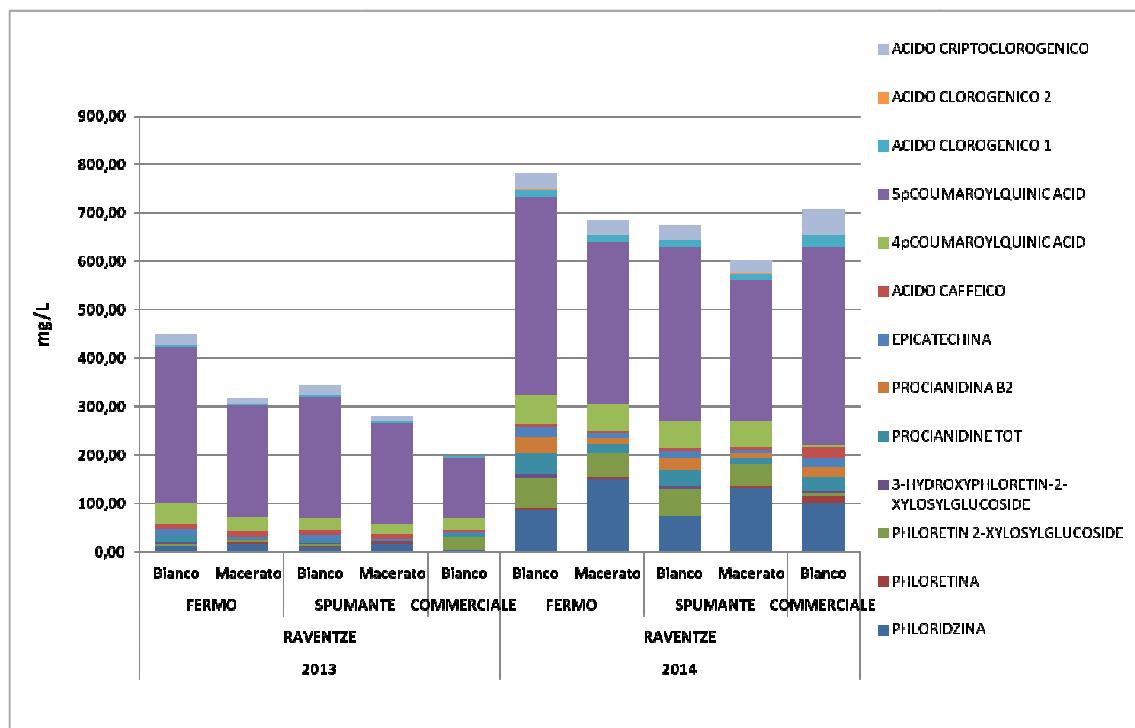


Figura 16. Profilo polifenolico dei sidri sperimentali ottenuti dalla varietà Ravèntze nei due anni di progetto, sia in maniera sperimentale che commerciale.

Come si può notare, per quanto riguarda i sidri sperimentali non vi sono differenze sostanziali per quello che è il profilo delle molecole antiossidanti maggiormente presenti nel prodotto finito; quello che si differenzia sono le concentrazioni delle singole molecole a seconda della varietà di partenza e del processo tecnologico utilizzato, come già osservato per i mosti.

Da una attenta analisi statistica effettuata sia sui mosti e sui sidri sia sperimentali che commerciali, emergono alcune interessanti differenze dovute sia ai vari passaggi che vengono eseguiti durante il processo di trasformazione sia alle tecniche di produzione utilizzate.

I vari passaggi tecnologici che vengono effettuati da mosto a sidro finito fermo o spumante hanno una influenza sulle molecole antiossidante presenti. Tra le molecole che sembrano essere influenzate in maniera statisticamente significativa sono: l'acido caffeoico e la quercetina che risultano presenti in buone concentrazioni nel sidro finito sia fermo che spumante, mentre nel mosto le concentrazioni di queste molecole sono significativamente inferiori ( $p<0.001$ ), le procianidine totali che invece sono significativamente più elevate nel mosto ( $p<0.05$ ) rispetto al sidro spumante così come l'acido criptoclorogenico. Per quanto riguarda la lavorazione in bianco o con macerazione, si osservano delle differenze significative a livello delle seguenti molecole: molecole come le procianidine totali, la procianidina B2, l'epicatechina e l'acido criptoclorogenico risultano significativamente più alte ( $p<0.001$ ) nella lavorazione in bianco, mentre floretina e florizina più elevate ( $p<0.001$ ) nei sidri ottenuti con macerazione. Quest'ultimo dato è particolarmente interessante poiché va a contrapporsi con la netta diminuzione del contenuto in polifenoli totali che la lavorazione macerata presenta. In effetti, non sempre l'andamento del totale dei polifenoli può essere sovrapposto a quello delle singole molecole che compongono il profilo, come in questo caso.

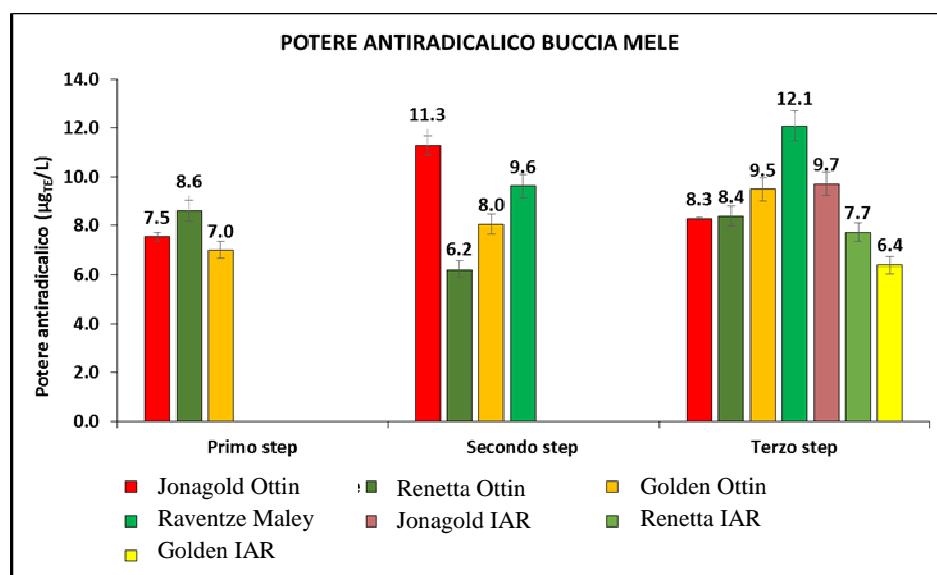
Alcune differenze sono state osservate anche dal confronto tra lavorazione sperimentale e quella commerciale; in particolare nel sidro sperimentale risulta più elevato l'acido 4p-cumaroilquinico ( $p<0.001$ ), nel sidro commerciale invece gli acidi clorogenico ( $p<0.05$ ) e criptoclorogenico sono maggiormente concentrati ( $p<0.001$ ).

## VALUTAZIONE DEL POTERE ANTISSIDANTE

### Risultati annata 2013

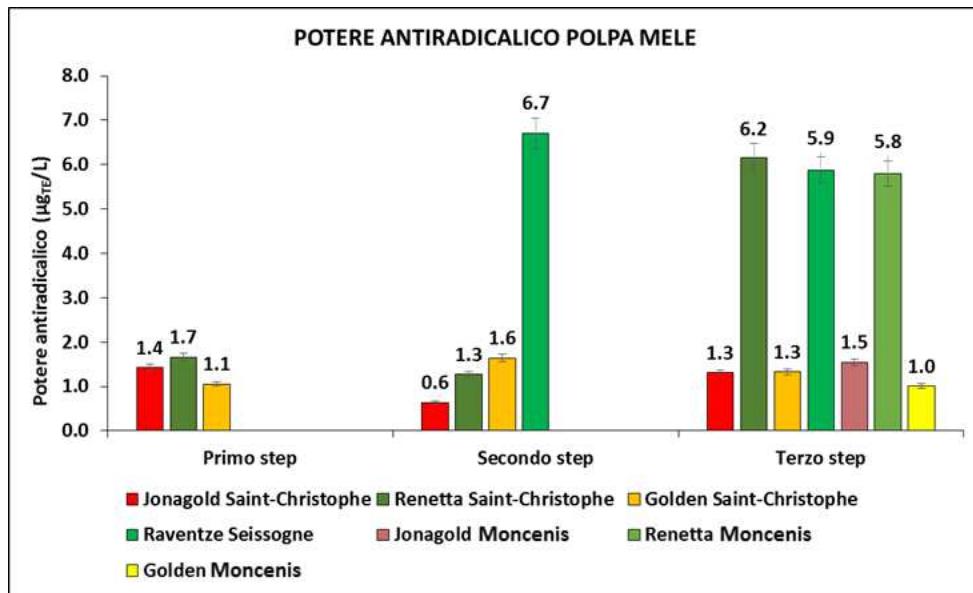
In Figura 1 è riportato l'andamento del potere antiradicalico degli estratti ottenuti dalle bucce delle mele ai tre step di raccolta.

Come si può vedere i valori ottenuti non presentano sostanziali differenze; in particolare, la cultivar che al momento della raccolta ha portato ad un estratto più attivo è la Raventze ( $12.1 \mu\text{g}_{\text{TE}}/\text{L}$ ). È interessante osservare come per Jonagold (Ottin) il massimo del potere antiradicalico sia al secondo step di raccolta ( $11.3 \mu\text{g}_{\text{TE}}/\text{L}$ ) mentre per Golden (Ottin) si vede un incremento del potere antiossidante fino al momento della raccolta vera e propria ( $9.5 \mu\text{g}_{\text{TE}}/\text{L}$ ).

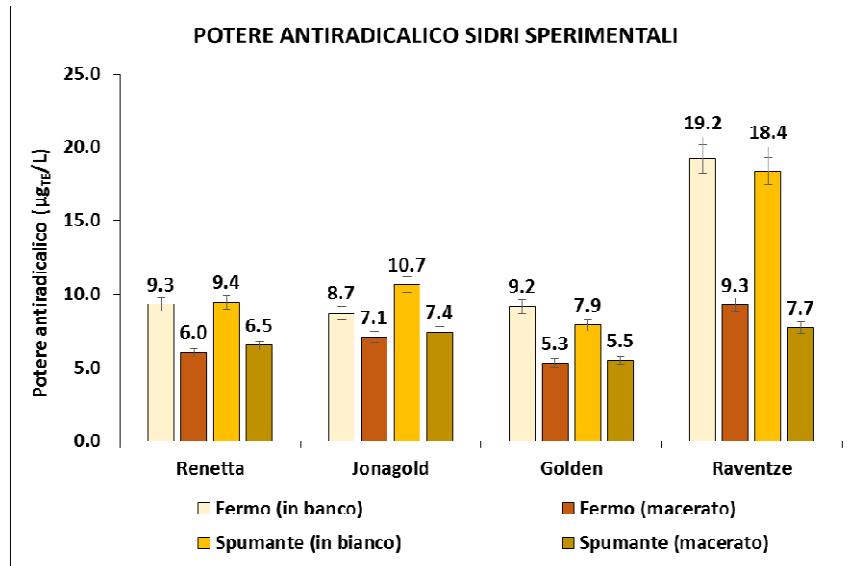


**Figura 11.** ARP degli estratti da bucce

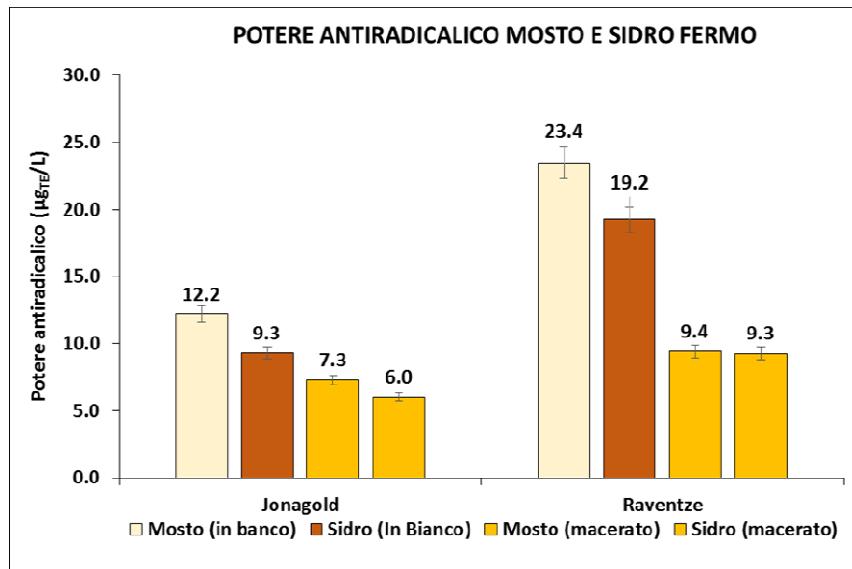
Per quanto riguarda gli estratti da polpe (Figura 2), si osservano valori nettamente inferiori rispetto ai corrispondenti da bucce. Raventze presenta comunque per entrambi gli step di raccolta valori elevati (6.7 e  $5.9 \mu\text{g}_{\text{TE}}/\text{L}$ ). La varietà Renetta, che presenta per il primo e secondo step di raccolta valori confrontabili con Jonagold e Golden, al momento della raccolta (terzo step) vede un forte incremento del potere antiossidante degli estratti, con valori simili a quelli osservati per le bucce.

**Figura 2.** ARP degli estratti da polpe

I sidri ottenuti dalla varietà di mele studiate vedono poteri antiradicalici confrontabili con gli estratti da bucce (Figura 3). In generale, i sidri sperimentali (sia fermi che spumantizzati) ottenuti da macerazione presentano poteri antiradicalici inferiori rispetto agli stessi “in bianco”. Elevati poteri antiossidanti sono stati osservati per i prodotti ottenuti dalla varietà Raventze (19.2 e 18.4 µg<sub>TE</sub>/L).

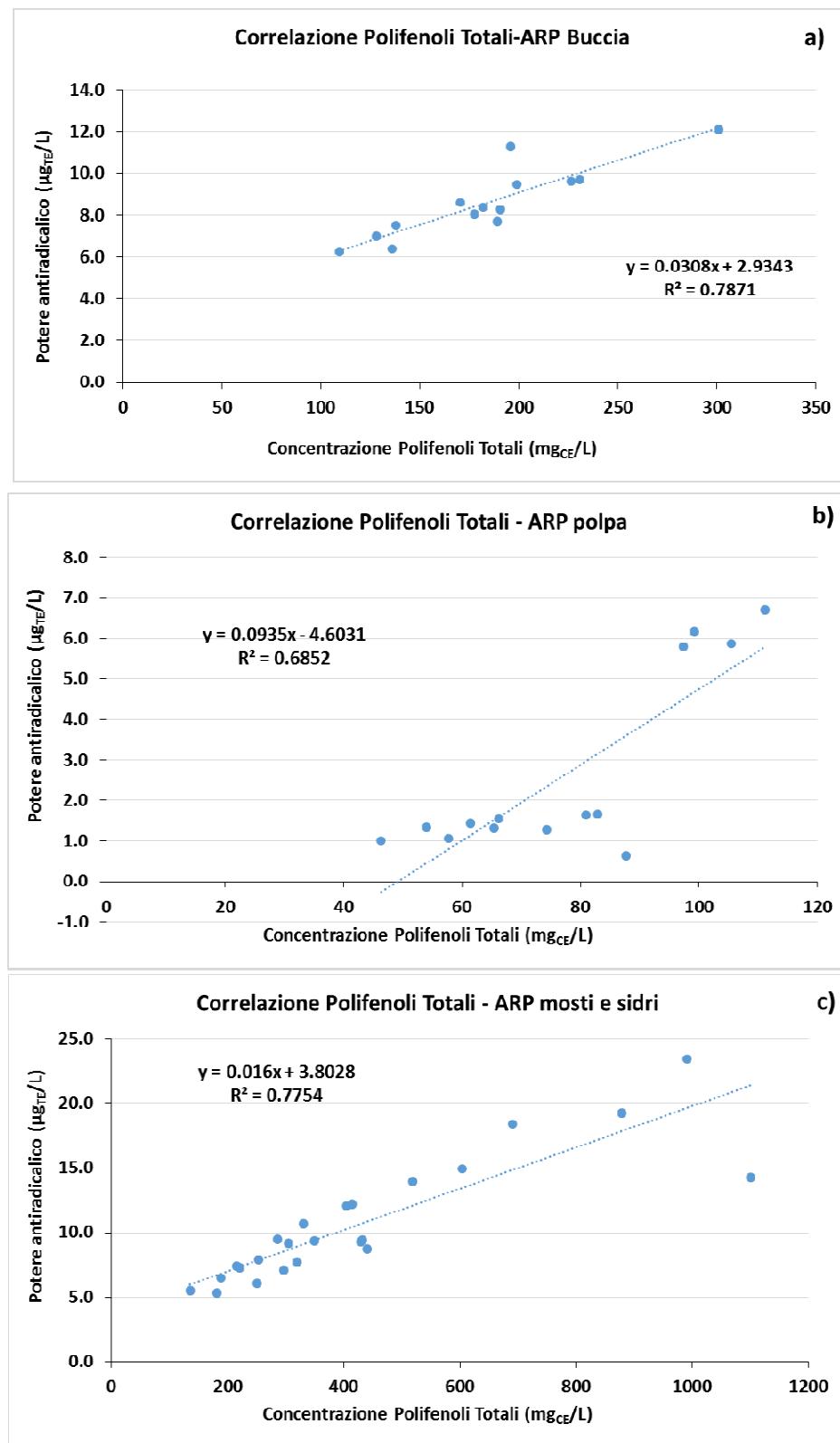
**Figura 3.** ARP di sidri da microsidrificazione

In Figura 4 sono riportati i risultati relativi a mosti e sidri fermi ottenuti mediante metodologia classica e macerazione da Raventze e Jonagold. Si può già osservare per i mosti macerati come l'ARP sia inferiore rispetto alle corrispondenti prove in bianco. In generale, il passaggio da mosto a sidro vede un naturale decremento del potere antiossidante.



**Figura 4.** ARP di mosti e sidri

Al fine di confrontare il contenuto in polifenoli totali degli estratti e il relativo potere antiossidante, risulta utile valutare la correlazione dei risultati ottenuti. In Fig. 5a, b e c sono riportate le correlazioni tra gli ARP di bucce (a), polpe (b) e mosti/sidri (c) con i rispettivi contenuti in polifenoli totali degli estratti analizzati.



**Figura 5a,b,c.** Correlazione tra potere antiradicalico e polifenoli totali per bucce (a), polpe (b) e mosti/sidri (c).

Si osserva una buona correlazione ( $R^2=0.7871$ ) tra il contenuto in polifenoli degli estratti di bucce e il loro potere antiradicalico, discorso analogo può essere fatto per mosti e sidri ( $R^2=0.7756$ ) mentre per le polpe non è stato possibile ottenere una buona correlazione ( $R^2=0.6852$ ).

Per quanto riguarda la valutazione dell'ARP mediante DPPH<sup>·</sup> i risultati ottenuti sono riassunti in Fig. 26 e confrontati con gli analoghi ottenuti mediante metodo colorimetrico TEAC (radicale ABTS<sup>+</sup>).

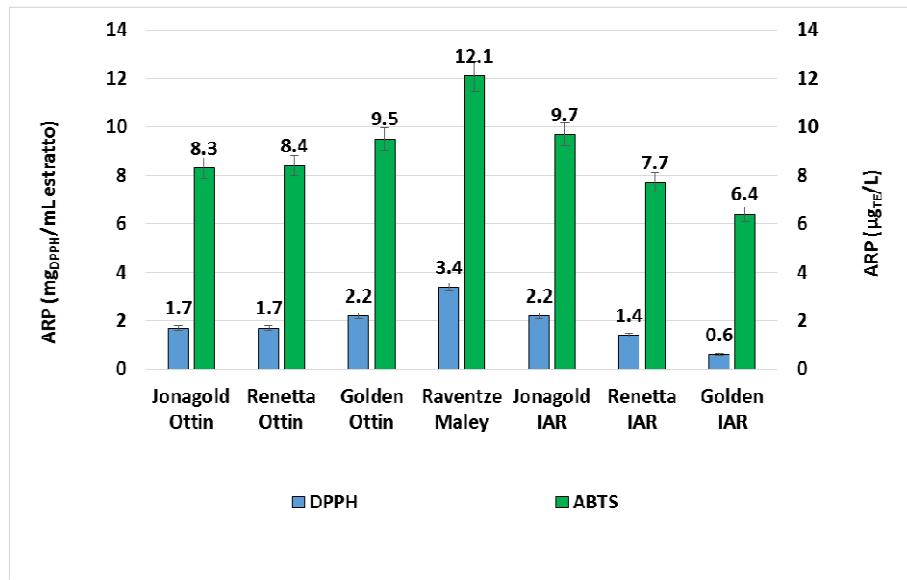


Figura 6. Confronto tra potere antiradicalico valutato mediante i test DPPH<sup>·</sup> e TEAC.

I valori relativi ai singoli estratti sono differenti (come generalmente accade confrontando metodiche differenti aventi unità di misura differenti) ma l'andamento risulta comunque confrontabile.

### Risultati annata 2014

In Figura 7 è riportato il grafico relativo al potere antiradicalico degli estratti di bucce di mele in Trolox equivalenti. Come si può osservare per le varietà Renetta, Golden e Jonagold Ottin non si notano sostanziali variazioni del potere antiossidante dell'estratto al variare del periodo di raccolta.

L'estratto della varietà Raventze ha presentato un incremento del potere antiradicalico al momento della raccolta (quarto step), arrivando a 13.5 μg<sub>TE</sub>/L<sub>estratto</sub>. Valori simili sono stati osservati per Renetta IAR (13.1 μg<sub>TE</sub>/L<sub>estratto</sub>).

L'andamento dei polifenoli totali risulta simile a quello del potere antiradicalico, anche se la correlazione (Figura 8) non è soddisfacente ( $R^2 = 0.4339$ ). Sembra infatti che, all'aumentare della concentrazione di polifenoli, il potere antiradicalico degli estratti non aumenti in modo lineare.

In letteratura sono presenti pochi lavori riguardanti l'estrazione di antiossidanti da bucce di mela e il relativo potere antiossidante. Massias et al. (2015) hanno osservato, in estratti ottenuti da bucce di mele (varietà Golden Delicious), valori di ARP compresi tra 1 e 6 mg<sub>acido ascorbico equivalenti</sub>/mL<sub>estratto</sub>. Tali valori risultano inferiori rispetto a quelli osservati e riportati nel presente studio per gli estratti da bucce Golden. Bisogna tenere in considerazione che gli autori hanno impiegato una differente metodica estrattiva, utilizzando fluidi supercritici ed etanolo come cosolvente. Tale metodica può portare ad un'incompleta estrazione dei polifenoli con una conseguente sottostima dell'effettivo ARP dell'estratto.

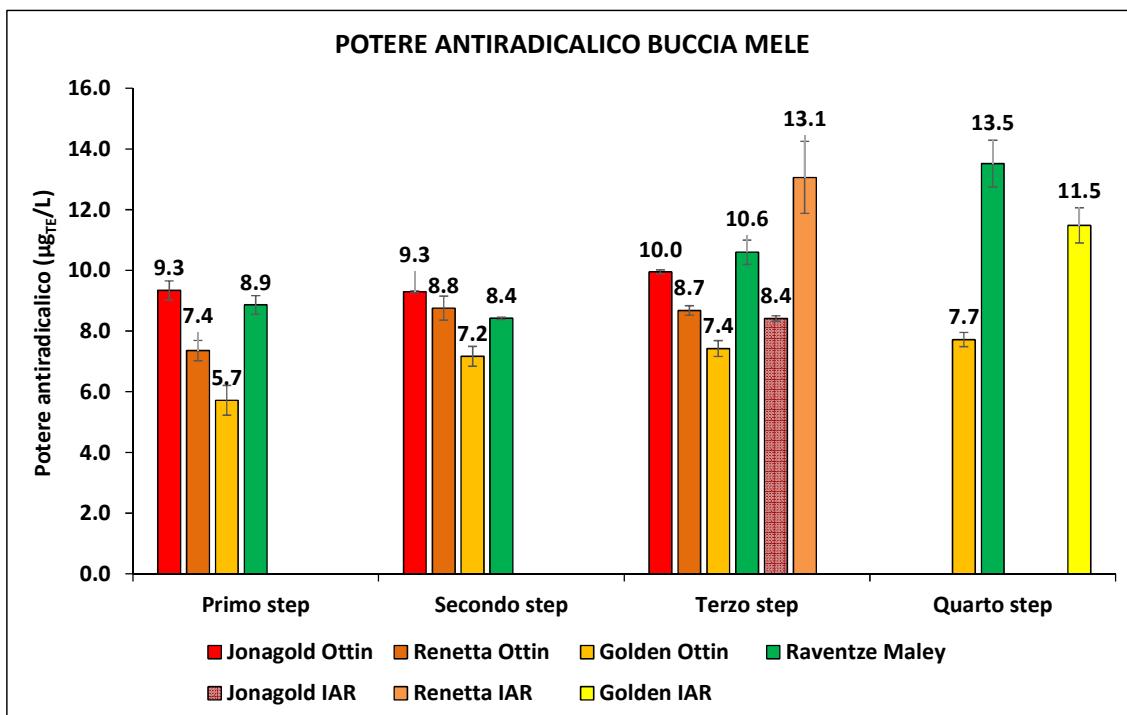


Figura 7. Potere antiradicalico degli estratti da bucce di mele

Lee et al. (2003) hanno estratto la frazione fenolica da sei differenti varietà di mele impiegando una metodica che vedeva l'utilizzo di ultrasuoni (20 min) e di metanolo (80%) come solvente. Gli autori riportano differenti ARP in funzione della qualità dell'estratto fenolico, a parità di polifenoli totali, evidenziando come non tutti i singoli composti fenolici possiedano uguale potere antiradicalico nei confronti dell'ABTS<sup>•+</sup>. In particolare, sembra che la quercetina sia il composto con maggiore attività antiossidante seguito da epicatechina, procianidrina, acido clorogenico e floretina.

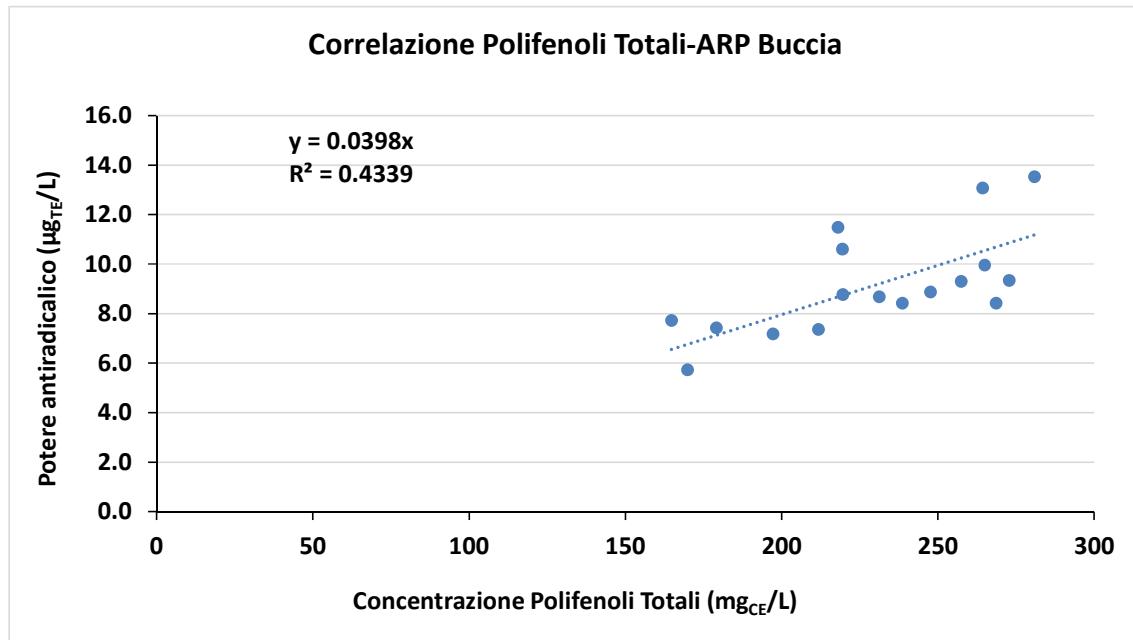


Figura 8. Correlazione tra concentrazione in polifenoli totali e potere antiradicalico per gli estratti da bucce di mele

Per quanto riguarda l'analisi degli estratti delle polpe, in generale è stato osservato un effetto antiradicalico nettamente inferiore rispetto agli estratti da bucce (Figura 9). È interessante osservare come per Jonagold e Renetta, durante gli step di maturazione, l'effetto antiradicalico degli estratti da polpa risulti diminuire fino al momento della raccolta, passando da 3.8 a 1.7  $\mu\text{g}_{\text{TE}}/\text{L}_{\text{estratto}}$  e da 3.1 a 1.9  $\mu\text{g}_{\text{TE}}/\text{L}_{\text{estratto}}$  rispettivamente. Al momento della raccolta, le polpe delle varietà Jonagold IAR e Raventze hanno dato il più elevato ARP, rispettivamente con 2.9 e 2.5  $\mu\text{g}_{\text{TE}}/\text{L}_{\text{estratto}}$ . Differentemente dal 2013 (Tabella 1), per la raccolta del 2014 la varietà Renetta (IAR e Ottin) ha presentato valori confrontabili con la varietà Golden.

Come per le bucce, anche gli estratti da polpa non presentano correlazione tra ARP e concentrazione in polifenoli totali, con un  $R^2$  di appena 0.1916 (Figura 10).

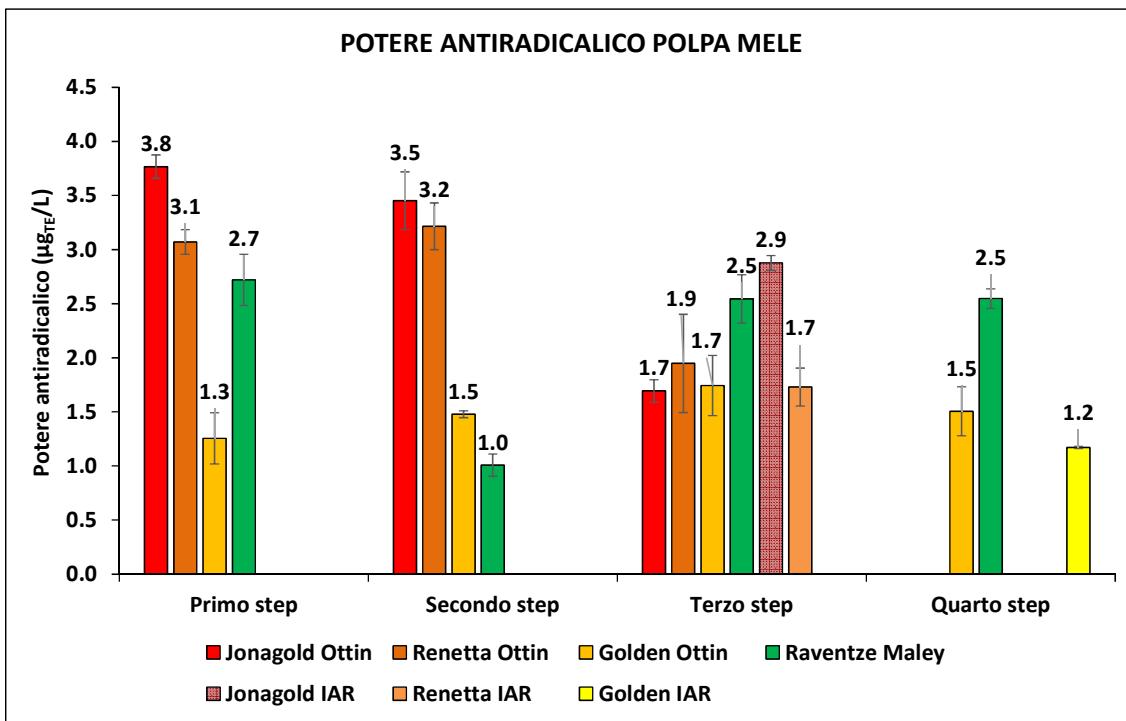


Figura 9. Potere antiradicalico degli estratti da polpa di mela.

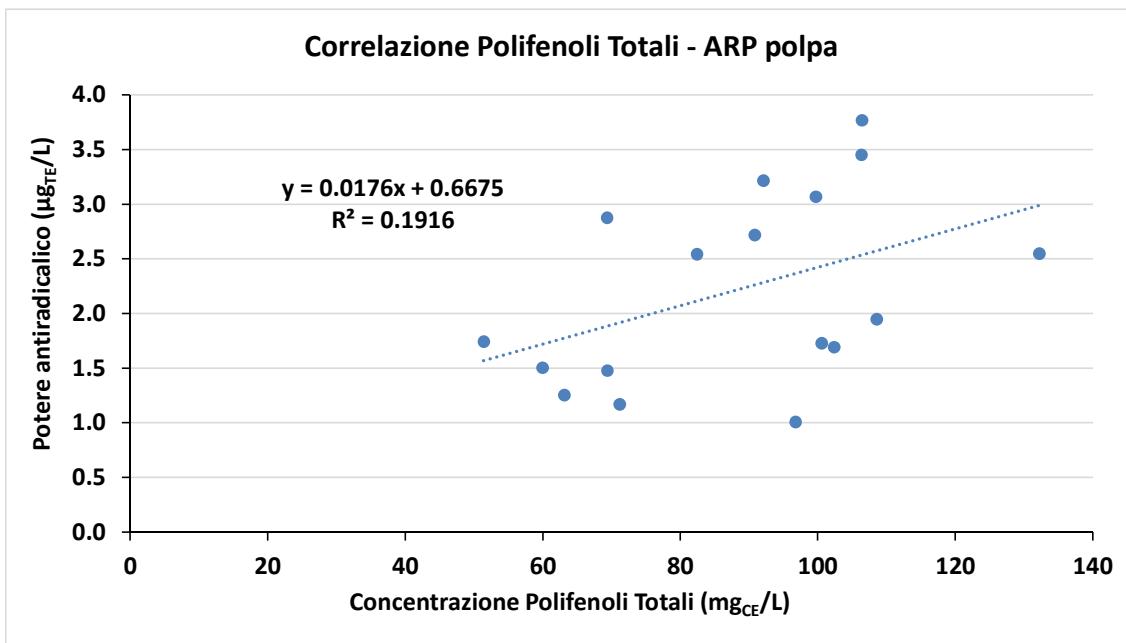


Figura 10. Correlazione tra concentrazione in polifenoli totali e potere antiradicalico per gli estratti da polpa di mela

In Figura 11 è mostrato un confronto fra i valori di ARP determinati mediante le due differenti metodiche ABTS<sup>•+</sup> e DPPH<sup>•</sup>. Si può osservare un andamento molto simile tra i due test con valori in genere inferiori per il radicale DPPH.

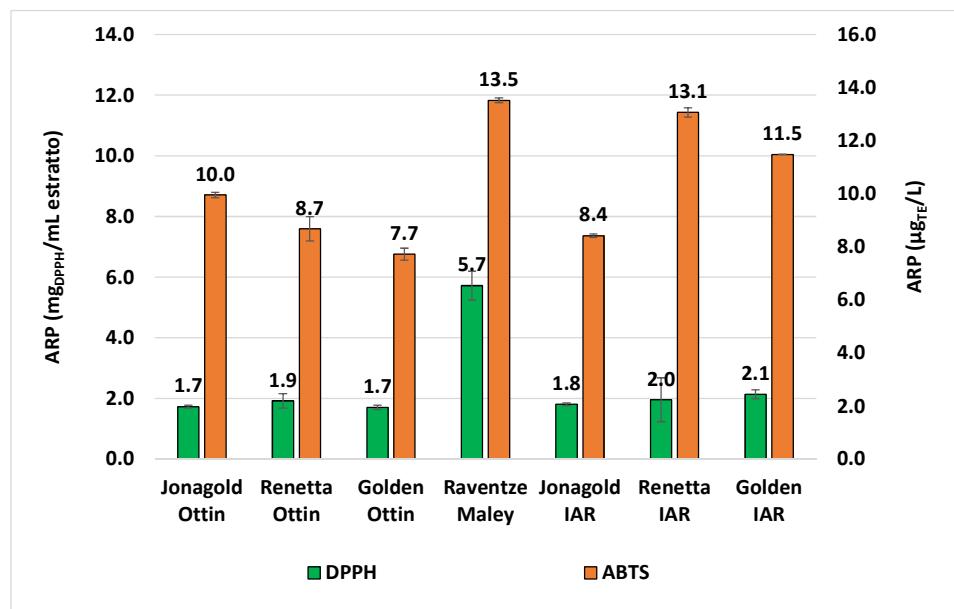


Figura 11. Confronto tra potere antiradicalico ottenuto mediante metodica ABTS<sup>•+</sup> e DPPH<sup>•</sup> per le bucce di mela alla raccolta

I mosti di sidro ottenuti con le quattro varietà di mele presentano livelli di ARP superiori a quelli degli estratti da bucce (Figure 12 e 13). Com'era già stato osservato per i mosti del 2013, il processo di macerazione porta ad un impoverimento del potere antiradicalico del prodotto sia in Renetta sia in Raventze, mentre per Jonagold e Golden si osservano risultati confrontabili tra bianco e macerato.

Durante la fermentazione del sidro si osserva un decremento del potere antiradicalico per tutte le prove effettuate, sia per i prodotti fermi sia spumantizzati, in tutti i casi il sidro macerato ha presentato valori di ARP inferiori se paragonato al rispettivo bianco.

Piccinelli Lobo et al. (2009) hanno analizzato e caratterizzato in termini di potere antiradicalico (DPPH e FRAP) 44 sidri reperibili sul mercato australiano. Gli autori hanno osservato valori molto differenti a seconda del campione analizzato, ed una netta diminuzione dell'ARP passando dall'analisi della polpa al sidro. Tale decremento, secondo gli autori, potrebbe essere dovuto sia ad un'ossidazione dei polifenoli più sensibili (come i Flavan-3-oli) sia ad un assorbimento/adsorbimento degli stessi all'interno della polpa esausta che si comporterebbe da forte adsorbente. Inoltre gli autori affermano che il potere antiradicalico dei sidri risulta confrontabile con quello di molti vini bianchi.

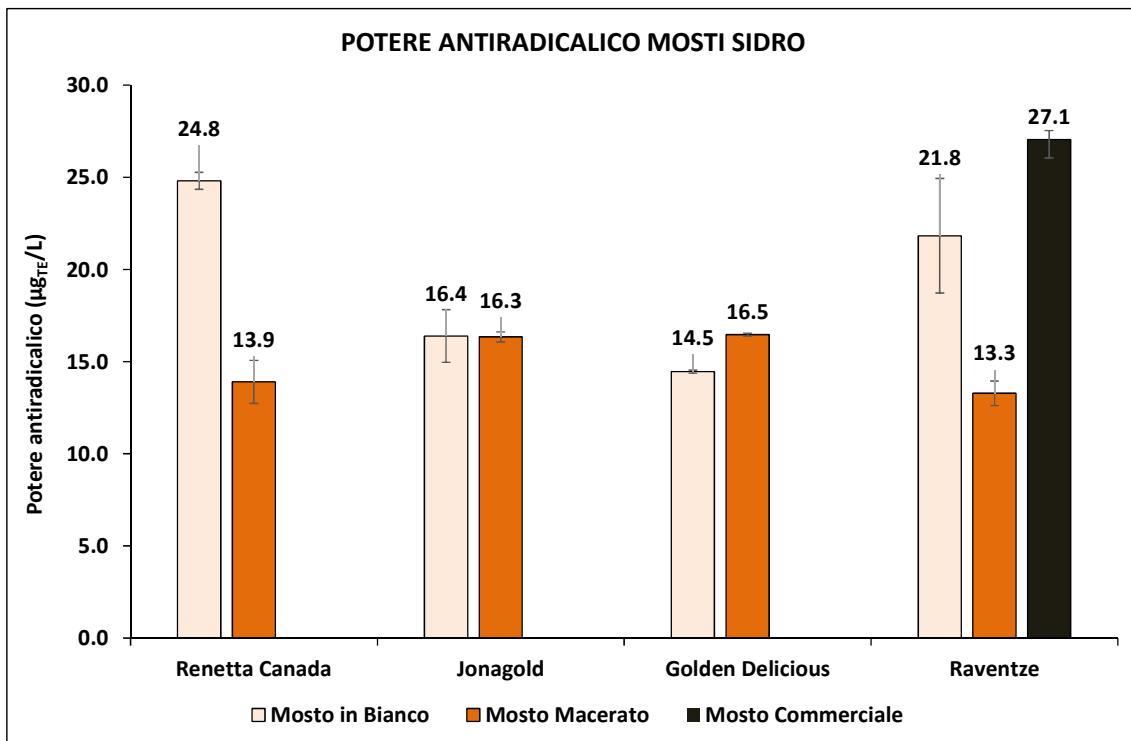


Figura 12. Potere antiradicalico di mosti in bianco e macerati

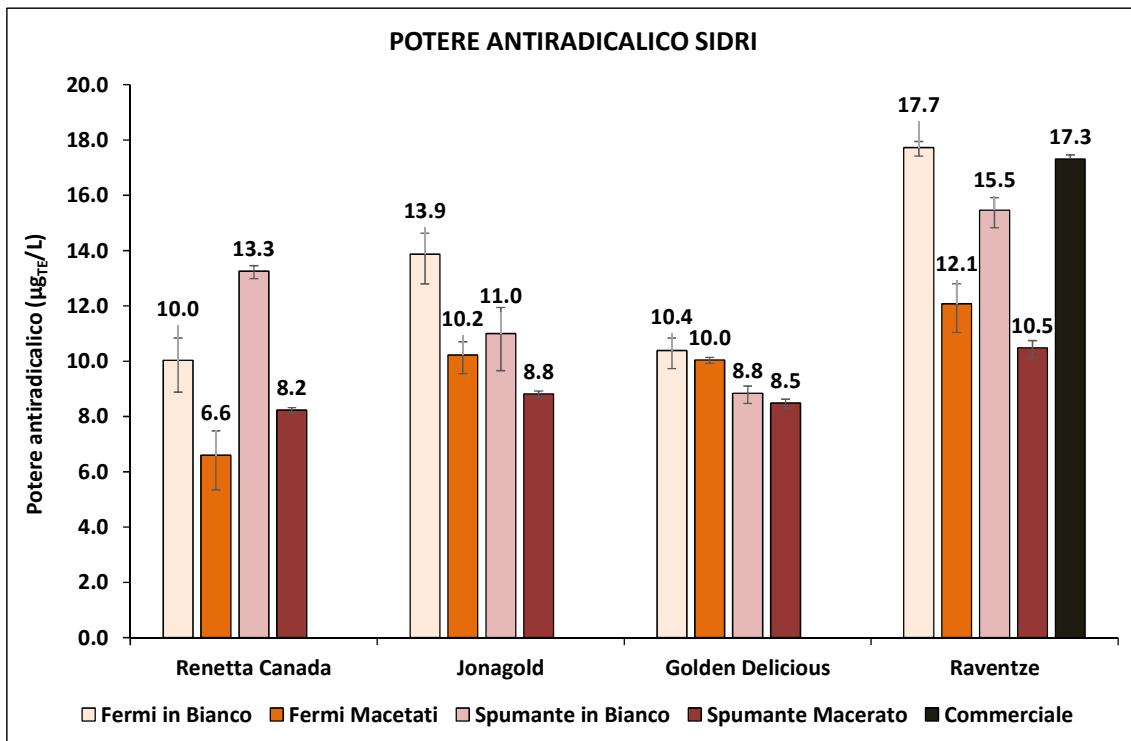


Figura 13. Potere antiradicalico di sidri fermi e spumanti sia in bianco che macerati

### Risultati annata 2015

Gli estratti da buccia (Figura 14) presentano ARP inferiori rispetto a quelli osservati nelle annate precedenti. In particolare la varietà Raventze, che ha sempre dato estratti con elevata attività antiossidante, nella raccolta 2015 mostra valori confrontabili con Golden e inferiori a Renetta. Osservando la concentrazione in polifenoli totali l'andamento conferma quanto osservato per il potere antiradicalico.

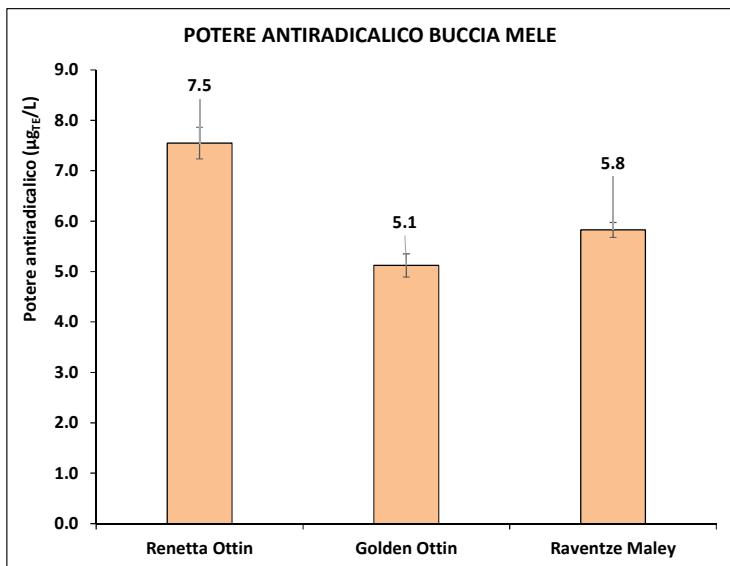


Figura 14. Potere antiradicalico degli estratti da bucce di mele al momento della raccolta

Contrariamente a quanto osservato per le bucce, gli estratti delle polpe delle tre varietà hanno dato livelli di ARP (Figura 15) nettamente superiori a quelli osservati per il 2014 ma per le cultivar Renetta e Raventze comunque inferiori alla raccolta del 2013.

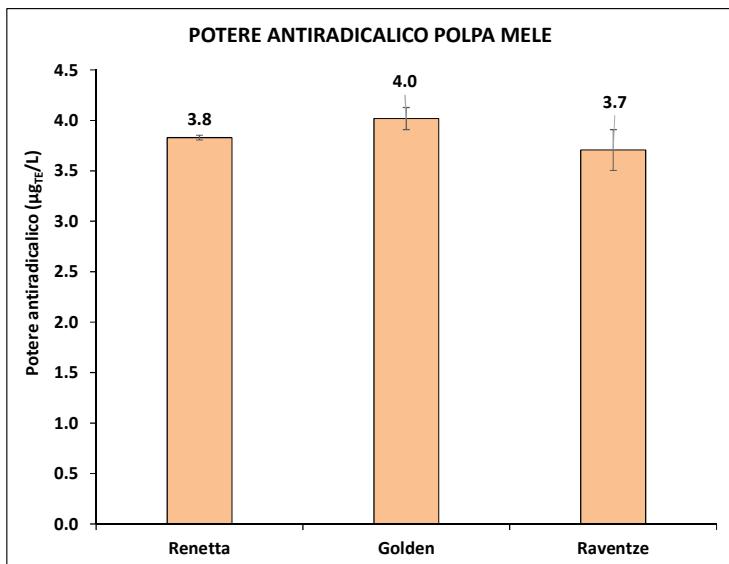


Figura 15. Potere antiradicalico degli estratti da polpa di mela.

In Figura 16 è riportata la correlazione tra polifenoli totali degli estratti di buccia e polpa e il relativo potere antiradicalico. Rispetto alle precedenti correlazioni (vedi terza relazione e prima parte della quarta relazione) sono stati presi in considerazione tutti gli estratti in quanto un numero di dati inferiori a 4 non avrebbero fornito una risposta attendibile. Come si può vedere l' $R^2$  (0.6542) è accettabile ed osservando la retta si può notare come solamente per le polpe, a differenti concentrazioni di polifenoli totali corrispondano ARP simili.

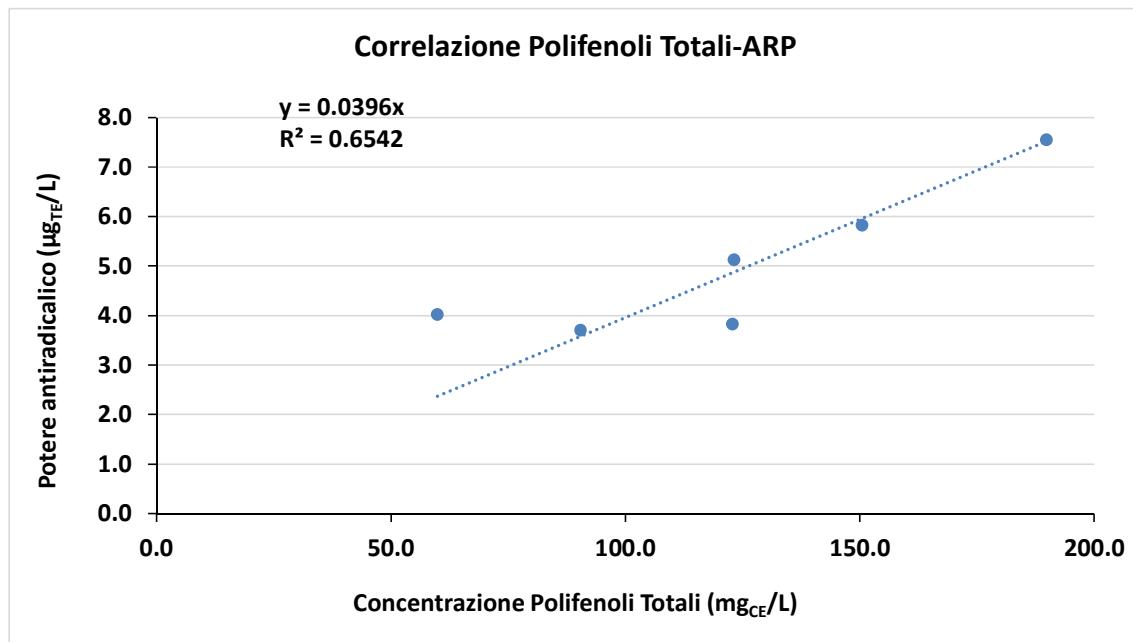


Figura 16. Correlazione tra concentrazione in polifenoli totali e potere antiradicalico per gli estratti da buccia e polpa di mele

Nelle tabelle 2 e 3 sono messi a confronto i poteri antiradicalici di tutti gli estratti da bucce (Tabella 2) e da polpe (Tabelle 3) per le annate 2013, 2014 e 2015.

Dai dati appare evidente come l'ARP non solo vari a seconda della varietà e in base al periodo di raccolta, quindi allo stato di maturazione delle mele, ma anche in funzione dell'annata, con attività nel 2013 nettamente superiori al 2014 e con una tendenza ad un nuovo aumento nel 2015.

L'andamento del potere antiradicalico dei mosti di sidro da microsidrificazione risulta confrontabile con quelli osservati nel 2013 e 2014, anche se i valori risultano inferiori. In generale la macerazione porta ad un impoverimento della caratteristica antiossidante del prodotto.

Tabella 1. Confronto del potere antiradicalico degli estratti di bucce per le tre annate studiate (2013, 2014 e 2015)

Varietà	Produttore	Step di raccolta	Potere antiradicalico					
			2013		2014		2015	
			ABTS	Dev.St.	ABTS	Dev.St.	ABTS	Dev.St.
Jonagold	Ottin	1	7.5	0.3	9.3	0.4	-	-
Jonagold	Ottin	2	11.3	0.6	9.3	0.0	-	-
Jonagold	Ottin	3 RACCOLTA	8.3	0.1	10.0	0.1	-	-
Jonagold	IAR	3 RACCOLTA	9.7	0.4	8.4	0.1	-	-
Renetta	Ottin	1	8.6	0.5	7.4	0.5	-	-
Renetta	Ottin	2 RACCOLTA	6.2	0.0	8.8	0.6	-	-
Renetta	Ottin	3 PREMATURAZIONE	8.4	0.3	8.7	0.2	7.5	0.4
Renetta	IAR	3 PREMATURAZIONE	7.7	0.3	13.1	1.7	-	-
Golden	Ottin	1	7.0	0.0	5.7	0.7	-	-
Golden	Ottin	2	8.0	0.7	7.2	0.5	-	-
Golden	Ottin	3	-	-	7.4	0.4	-	-
Golden	Ottin	4 RACCOLTA	9.5	0.2	7.7	0.3	5.1	0.3
Golden	IAR	4 RACCOLTA	6.4	0.5	11.5	0.8	-	-
Raventze	Maley	1	-	-	8.9	0.4	-	-
Raventze	Maley	2	9.6	0.1	8.4	0.1	-	-
Raventze	Maley	3	-	-	10.6	0.6	-	-
Raventze	Maley	4 RACCOLTA	12.1	0.2	13.5	1.1	5.8	0.2

Tabella 2. Confronto del potere antiradicalico degli estratti di polpa per le tre annate studiate (2013, 2014 e 2015)

Varietà	Produttore	Step di raccolta	Potere antiradicalico					
			2013		2014		2015	
			ABTS	Dev.St.	ABTS	Dev.St.	ABTS	Dev.St.
Jonagold	Ottin	1	1.4	0.2	3.8	0.2	-	-
Jonagold	Ottin	2	0.6	0.0	3.5	0.4	-	-
Jonagold	Ottin	3 RACCOLTA	1.3	0.1	1.7	0.1	-	-
Jonagold	IAR	3 RACCOLTA	1.5	0.1	2.9	0.1	-	-
Renetta	Ottin	1	1.7	0.1	3.1	0.2	-	-
Renetta	Ottin	2 RACCOLTA	1.3	0.0	3.2	0.3	-	-
Renetta	Ottin	3 PREMATURAZIONE	6.2	0.0	1.9	0.6	3.8	0.0
Renetta	IAR	3 PREMATURAZIONE	5.8	0.0	1.7	0.2	-	-
Golden	Ottin	1	1.1	0.1	1.3	0.3	-	-
Golden	Ottin	2	1.6	0.1	1.5	0.0	-	-
Golden	Ottin	3	-	-	1.7	0.4	-	-
Golden	Ottin	4 RACCOLTA	1.3	0.0	1.5	0.3	4.0	0.2
Golden	IAR	4 RACCOLTA	1.0	0.0	1.2	0.0	-	-
Raventze	Maley	1	-	-	2.7	0.3	-	-
Raventze	Maley	2	5.9	0.1	1.0	0.1	-	-
Raventze	Maley	3	-	-	2.5	0.3	-	-
Raventze	Maley	4 RACCOLTA	6.7	0.2	2.5	0.1	3.7	0.3

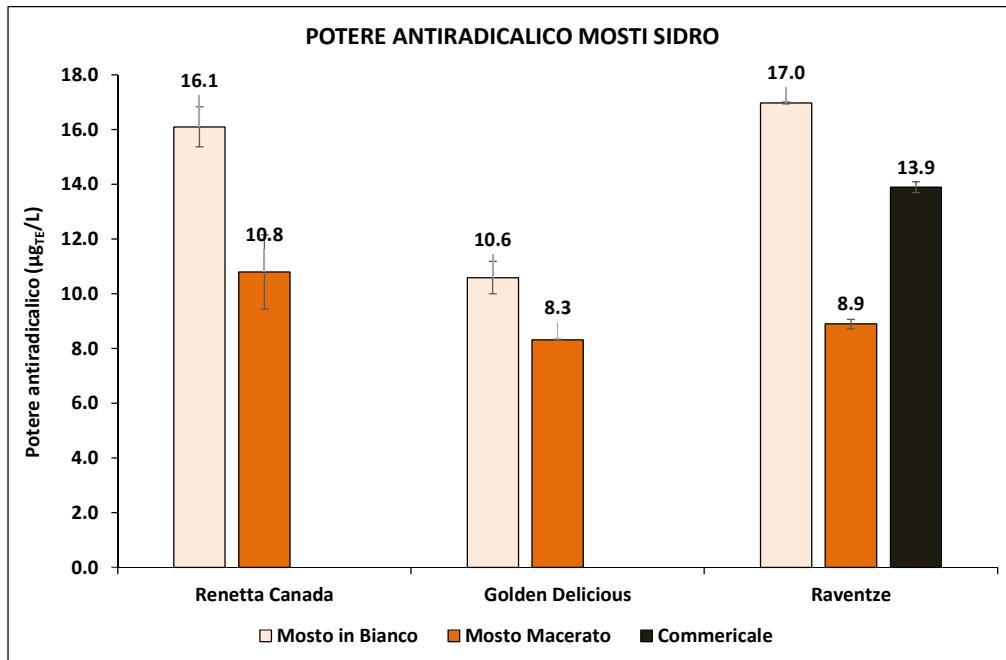


Figura 17. Potere antiradicalico di mosti in bianco e macerati

## ANALISI DEL PROFILO AROMATICO DEI SIDRI

### *Analisi qualitativa*

L'analisi qualitativa del profilo aromatico dei sidri, sperimentali e commerciali, di entrambe le annate studiate ha portato all'identificazione di 45 composti volatili differenti per i sidri provenienti dalle varietà *Golden* e *Jonagold*, di 48 per quelli provenienti dalla varietà *Renetta* e di 43 per i sidri di *Raentze*. L'insieme delle molecole volatili individuate è possibile suddividerlo in 3 classi. La prima è la classe degli esteri, conosciuti per essere responsabili delle note fruttate e a cui appartiene la maggior parte dei composti identificati. La seconda classe è rappresentata dagli alcoli, indispensabili nel generare l'aroma globale del sidro in quanto supportano l'espressione aromatica di altre molecole. L'ultima classe, quella degli acidi, risulta la meno numerosa, ma comunque rilevante in quanto possono imprimere caratteristiche organolettiche al prodotto finito. Il totale delle molecole identificate, suddivise per classe di appartenenza, per ciascuna varietà studiata è mostrato nell'allegato 4.

### *Analisi semiquantitativa*

È stata effettuata un'analisi semiquantitativa dei dati provenienti da entrambe le annate oggetto di studio. Il 2-ottanolo, scelto come standard interno, ha permesso di ottenere misure di abbondanza relativa basate sull'area dei picchi cromatografici. Questo ci permette di poter confrontare fra di loro i campioni analizzati in termini di ricchezza relativa delle molecole presenti. In figura 1 sono mostrati i risultati medi di tre ripetizioni per due anni relativi al totale dei composti organici volatili identificati (VOCs) in tutti i sidri sperimentali fermi. L'andamento è molto variabile a seconda del tipo di lavorazione, in bianco e macerata. Nel primo caso si nota una differenza altamente significativa fra il sidro ottenuto dalla varietà *Golden* rispetto a quello ottenuto da *Renetta* e *Raentze* che mostrano un quantitativo di VOCs nettamente inferiore. Questo dato conferma quanto già evidenziato il primo anno di analisi. Osservando invece il grafico relativo alla lavorazione macerata le differenze indicate il primo anno fra le varietà utilizzate non risultano significative se consideriamo i dati relativi ai due anni.

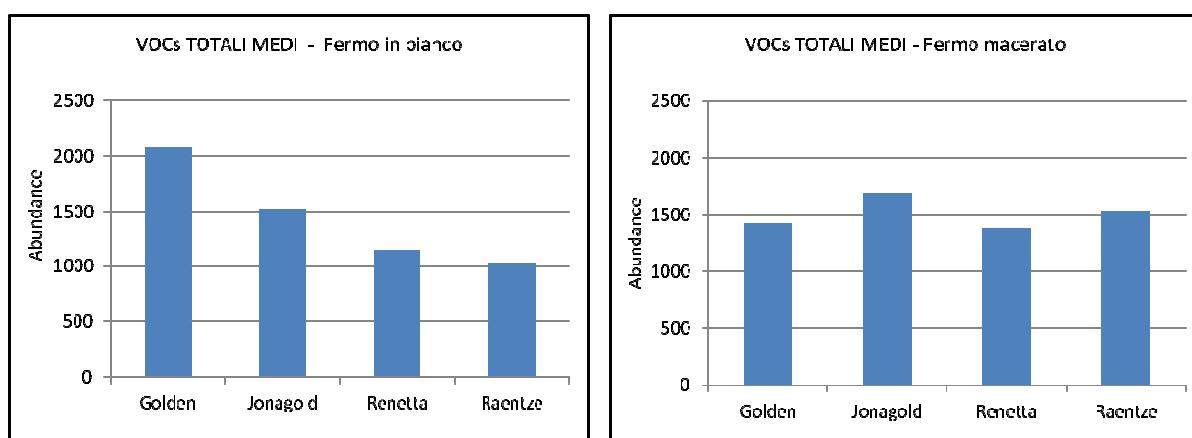


Figura 1. Abbondanza relativa dei composti organici volatili (VOCs) totali nei sidri sperimentali per il metodo fermo, lavorazione in bianco e macerata (valori medi di tre ripetizioni per due anni).

In figura 2 sono riportati i risultati dei VOCs relativi a due anni di spumantizzazione, sia sperimentale che commerciale. Anche in questo caso le differenze osservate fra le varietà per le due lavorazioni, in bianco e macerata, non risultano significative.

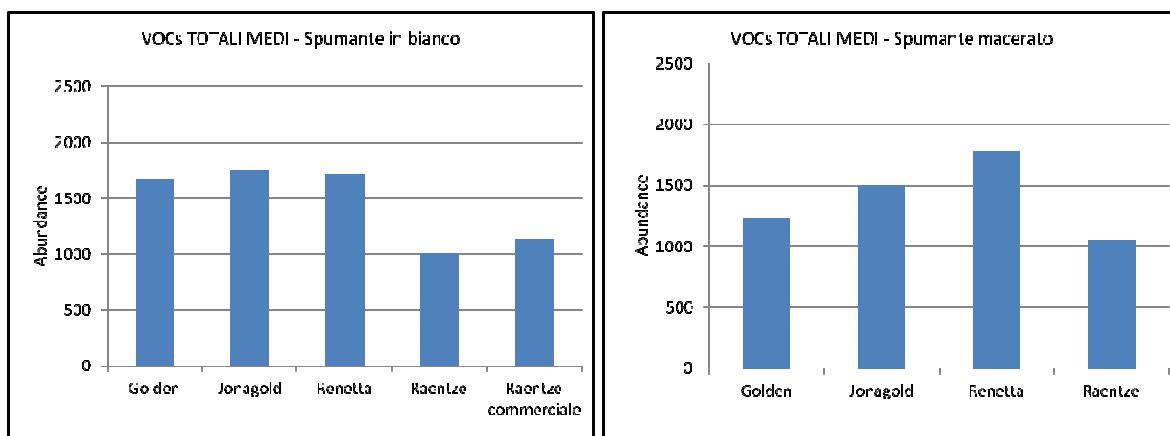


Figura 2. Abbondanza relativa dei composti organici volatili (VOCs) totali nei sidri sperimentali e commerciali per il metodo spumante, lavorazione in bianco e macerata (valori medi di tre ripetizioni per due anni).

In figura 3 sono presenti quattro grafici relativi a VOCs, esteri totali, alcoli totali ed acidi totali medi dei sidri sperimentali fermi. Possiamo confrontare le varietà all'interno della stessa lavorazione, in bianco o macerata e, contemporaneamente, i sidri lavorati in bianco e con macerazione per la stessa varietà. Come si può osservare, per gli aromi totali medi si evidenziano differenze fra le due tecniche per la stessa varietà ma, in ogni caso, non risultano significative come lo erano invece il primo anno per *Golden* e *Jonagold*. Gli esteri totali medi risultano significativamente più concentrati nel sidro di *Golden* e meno in quello di *Raentze* per la tenica in bianco. Sempre per questi composti non si osservano, invece, differenze fra varietà per il sidro fermo macerato. La *Renetta* risulta l'unica a possedere una maggior quantità di esteri nel sidro macerato rispetto al fermo, per le altre, le differenze che si osservano non sono significative. Gli alcoli totali medi sono la classe più abbondante per quanto riguarda il sidro in bianco della *Golden* e la meno abbondante per il sidro in bianco di *Renetta*. Le differenze fra varietà che si osservano per il sidro fermo macerato non risultano invece significative. Solamente per la *Golden* possiamo affermare che il sidro in bianco mostra concentrazioni significativamente più elevate in alcoli, rispetto alla lavorazione in bianco, a conferma di quanto già rilevato il primo anno di lavoro. Infine, per gli acidi totali medi le differenze fra varietà per la tecnica che prevede macerazione non risultano significative mentre, si osserva una differenza significativa fra le concentrazioni in acidi del sidro in bianco di *Ravèntze* e di *Jonagold* (concentrazione

maggiori). Per quest'ultima varietà, inoltre, si osserva una concentrazione significativamente più elevata in acidi nel sidro in bianco rispetto al corrispettivo lavorato con macerazione.

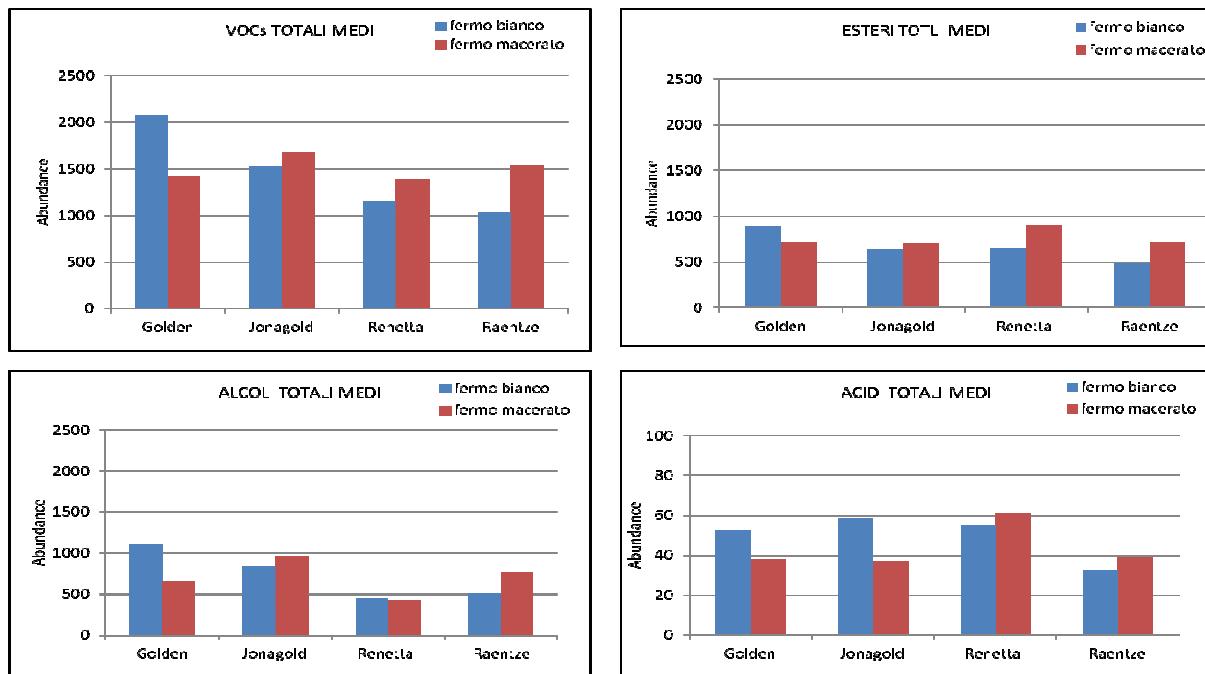


Figura 3. Abbondanza relativa dei composti organici volatili (VOCs) totali suddivisi per classi riferiti ai sidri sperimentali fermi, confronto fra lavorazione in bianco e macerata (valori medi di tre ripetizioni per due anni).

In figura 4 sono presenti quattro grafici relativi a VOCs, esteri totali, alcoli totali ed acidi totali medi dei sidri sperimentali spumantizzati. Possiamo confrontare, anche in questo caso, le varietà all'interno della stessa lavorazione, in bianco o macerata e, contemporaneamente, i sidri lavorati in bianco e con macerazione per la stessa varietà. Per quanto riguarda aromi ed alcoli totali medi non è stata rilevata alcuna differenza significativa intravarietà tra lavorazione in bianco e lavorazione macerata. Questo conferma solo per i VOCs quanto già rilevato durante il primo anno di lavorazione. Gli esteri totali medi sono risultati presenti in misura inferiore ( $p < 0,01$ ) sia nei sidri in bianco che in quelli macerati di mela *Raentze*, rispetto alle altre varietà, considerando le due lavorazioni separatamente. Solo per la varietà *Golden* queste molecole risultano meno concentrate ( $p < 0,01$ ) nel sidro fermo rispetto al corrispondente macerato. Infine per gli acidi totali medi si riscontra solo una differenza altamente significativa fra i sidri di *Golden* e *Renetta* macerati. Il primo, oltre ad avere la concentrazione in acidi minore fra le varietà spumantizzate con lavorazione macerata, è anche significativamente meno ricco in acidi rispetto al corrispettivo in bianco. Quest'ultimo dato conferma quanto già osservato nel primo anno di sperimentazione.

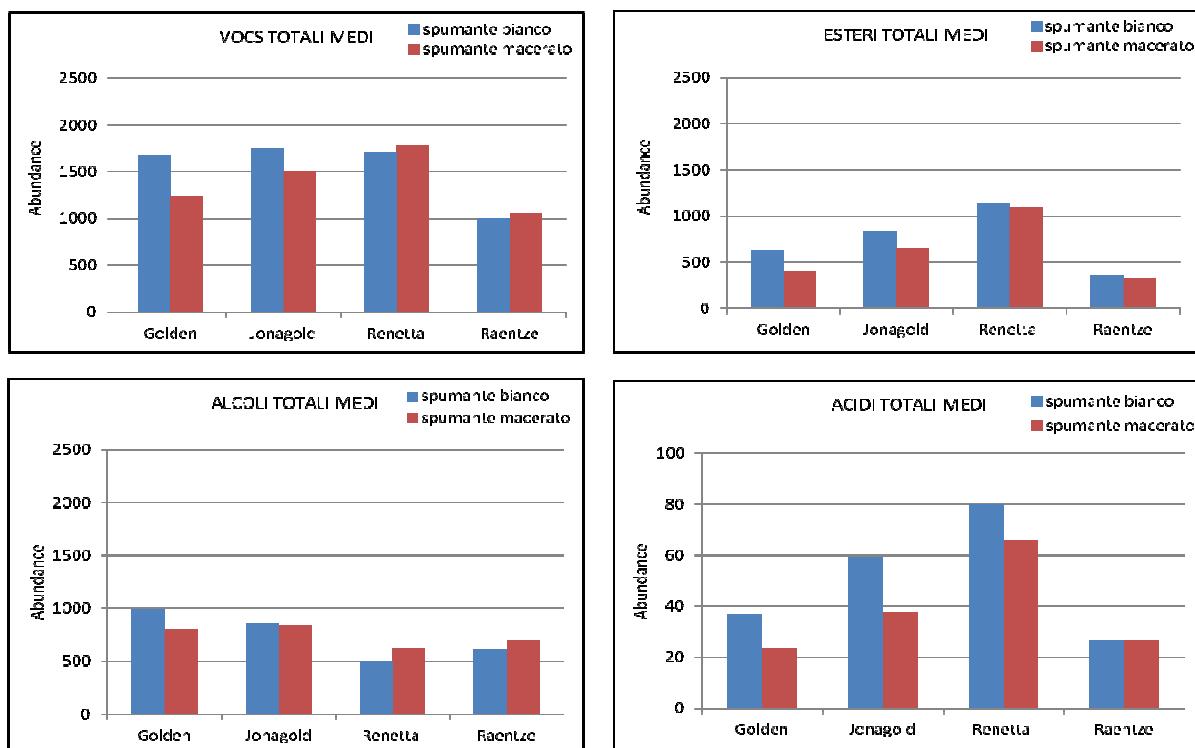


Figura 4. Abbondanza relativa dei composti organici volatili (VOCs) totali suddivisi per classi riferiti ai sidri sperimentali spumante, confronto fra lavorazione in bianco e macerata (valori medi di tre ripetizioni per due anni).

Analizzando separatamente il sidro sperimentale spumantizzato in bianco di *Raentze* e confrontandolo con il prodotto commerciale (Figura 5) si conferma quanto osservato il primo anno di analisi solo per gli acidi totali medi che risultano presenti in misura significativamente maggiore nel prodotto presente sul mercato.

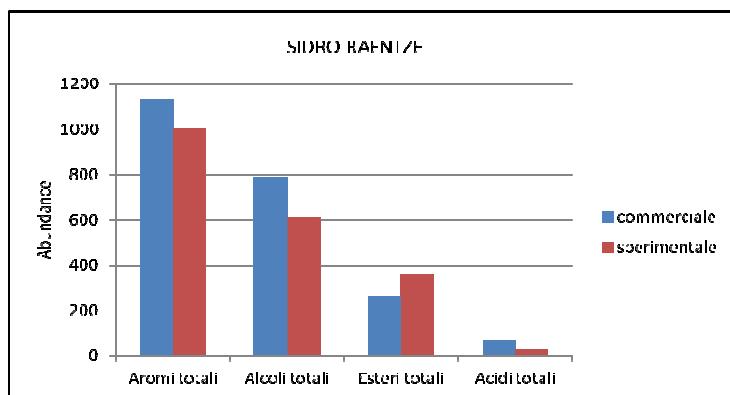


Figura 5. Abbondanza relativa dei composti organici volatili (VOCs) totali suddivisi per classi riferiti al confronto fra i sidri spumantizzati in bianco sperimentale e commerciale (valori medi di tre ripetizioni per due anni).

Considerando i risultati riportati fin qui, si ritiene di dover ricercare le molecole responsabili delle differenze significative fra varietà, solo per la lavorazione che porta al prodotto finito sidro fermo in bianco.

Risulta infatti, che per questo tipo di lavorazione la mela *Golden* sia la più adatta mentre, *Renetta* e *Raventze*, le varietà meno indicate. Per gli altri tre tipi di sidro studiati invece risulterebbe che la varietà non influisce sul risultato finale in termini di profilo aromatico complessivo. Probabilmente questo risultato dipende dalla grande variabilità osservata fra le due annate di produzione.

Sono la classe degli esteri e quella degli alcoli totali medi ad incidere positivamente sul profilo aromatico riscontrato per la mela *Golden* meno quella degli acidi totali medi. Infatti tutti gli esteri (Figura 6) e gli alcoli (Figura 7) risultati statisticamente differenti fra i sidri bianchi fermi di mela *Golden* e quelli di mela *Raventze/Renetta* si trovano in concentrazione superiore nel sidro fermo bianco di mela *Golden*. Inoltre vi sono alcune molecole fra gli esteri (isobutil decanoato, ottanoico ac. etilestere, eptanoico ac. etilestere e 3-esenoico ac. etil estere) e fra gli alcoli (3-esen-1-olo e 1-propanolo 3-methylthio) presenti solo nel sidro bianco fermo di mela *Golden*.

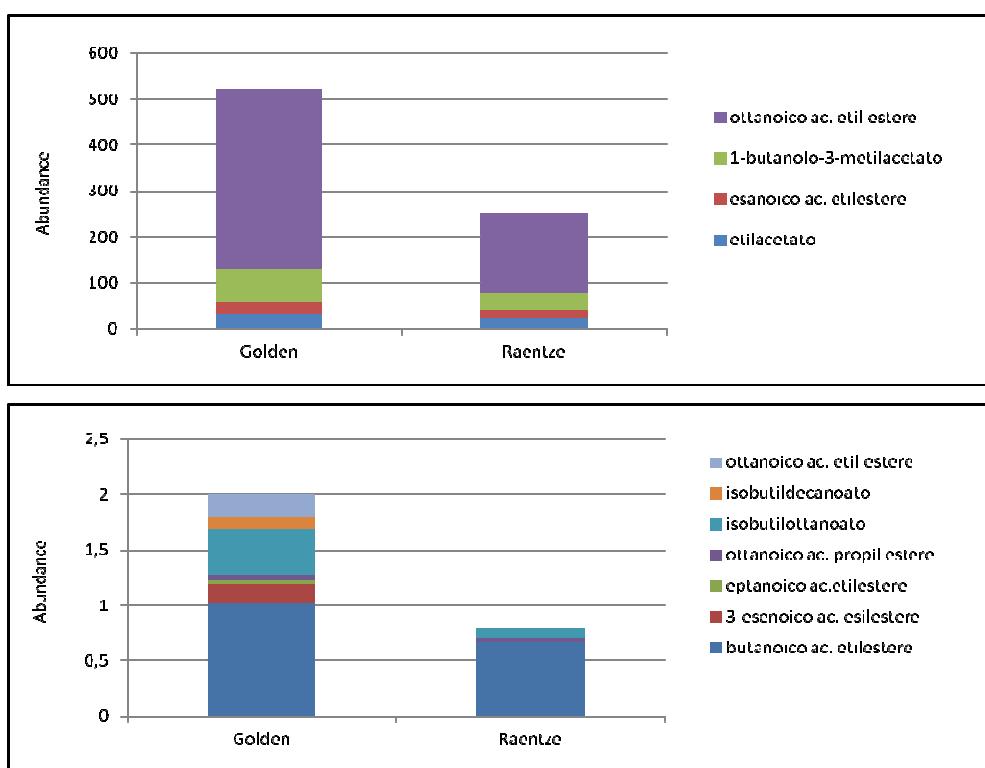


Figura 6. Abbondanza relativa delle molecole appartenenti alla classe degli esteri che risultano statisticamente differenti fra i sidri bianchi fermi di mela *Golden* e quelli di mela *Raentze* (valori medi di tre ripetizioni per due anni).

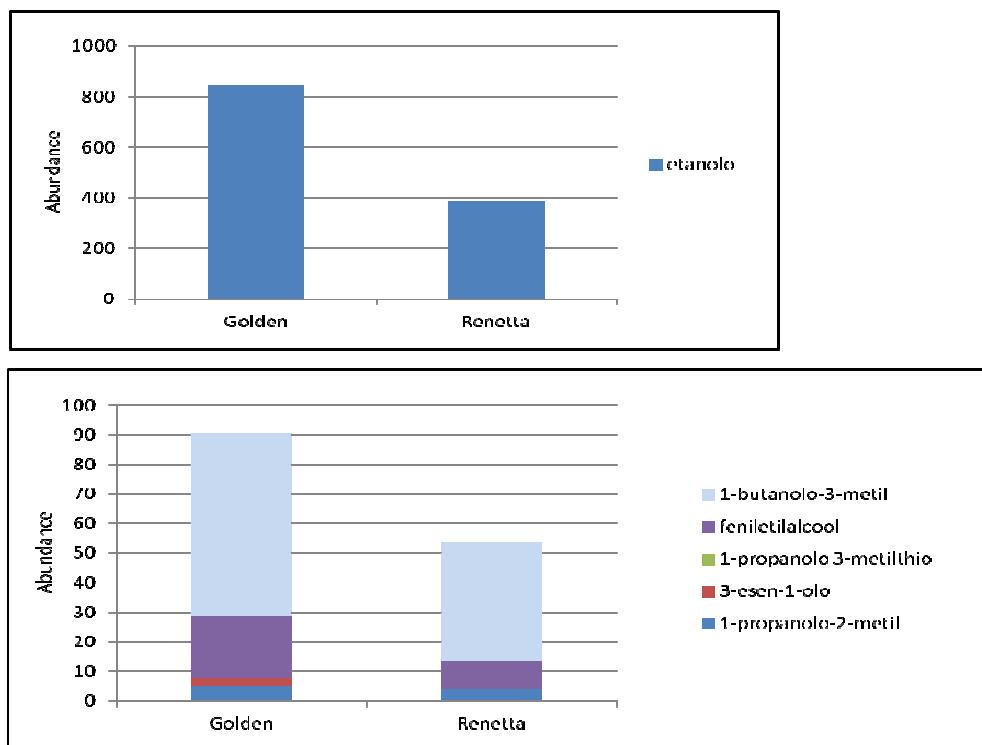


Figura 7. Abbondanza relativa delle molecole appartenenti alla classe degli alcoli che risultano statisticamente differenti fra i sidri bianchi fermi di mela *Golden* e quelli di mela *Renetta* (valori medi di tre ripetizioni per due anni).

Un ultimo approfondimento riguarda le molecole appartenenti alla classe degli acidi risultate, nei due anni, essere le uniche responsabili delle differenze individuate fra il sidro sperimentale spumantizzato in bianco ed il corrispondente commerciale. Come si può osservare dalla figura 8 è il sidro commerciale ad avere una concentrazione maggiore in acidi ottanoico e decanoico, gli unici risultati statisticamente differenti fra esso ed il sidro sperimentale.

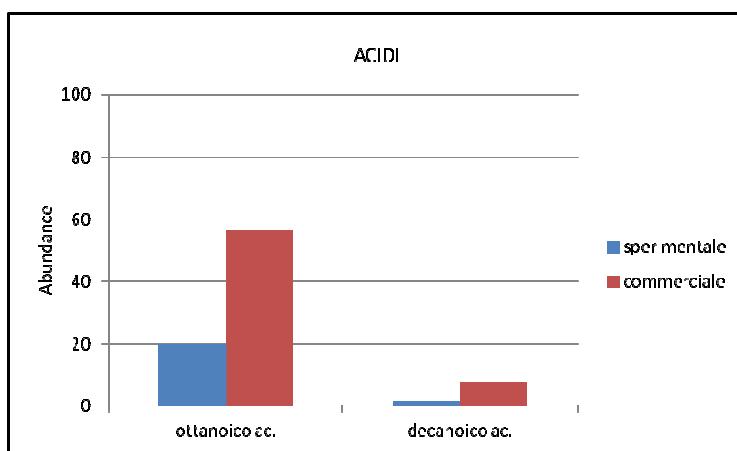


Figura 8. Abbondanza relativa delle molecole appartenenti alla classe degli acidi che risultano statisticamente differenti fra i sidri spumantizzati in bianco sperimentale e commerciale (valori medi di tre ripetizioni per due anni).

## CONCLUSIONI

L'attività svolta da NUTRALP VdA nei due anni e 6 mesi (settembre 2013-dicembre 2015), nell'ambito del progetto "Longevità in un sorso di mela", ha dimostrato la presenza di sostanze nutraceutiche, cioè molecole appartenenti alla classe dei polifenoli con attività potenzialmente benefica per la salute, in mela e i suoi prodotti di trasformazione, il mosto (paragonabile ad un succo) e il sidro. La concentrazione delle molecole bioattive è risultata essere particolarmente elevata soprattutto per antiche varietà autoctone come la mela Ravèntze che ha mostrato valori di polifenoli delle bucce di molto superiori (1220 mg/100g bucce essiccate) ad altre varietà diffuse anche in altre regioni italiane come la Golden Delicious (840 mg/100g bucce essiccate).

I trasformati rispecchiano i risultati della materia prima di partenza, in particolare, il mosto e il sidro di Ravèntze sono risultati quelli a più alto contenuto in polifenoli totali, dimostrando come il processo produttivo sia in grado di mantenere intatte le proprietà nutraceutiche nei prodotti finiti.

La caratterizzazione dei prodotti è stata completata da una validazione biologica, sia degli estratti ottenuti da mela e uva che dei trasformati, mosto e sidro, al fine di verificarne i potenziali effetti benefici specialmente a livello della patologia cardiovascolare. Per questo sono state condotte sia analisi di laboratorio, che uno studio di bioinformatica atto ad individuare i target molecolari dei nutraceutici identificati e le concentrazioni necessarie perché si esplichi un effetto benefico. I risultati ottenuti in tal senso, hanno mostrato un potenziale effetto benefico di tutti gli estratti e dei trasformati, particolarmente quelli di Ravèntze; in particolare è emersa una buona attività antiossidante esercitata attraverso l'azione anti radicali liberi contrastandone l'azione dannosa a livello del DNA. Non è stato possibile, se non per estratti di alcune varietà, dimostrare un'azione direttamente antiinfiammatoria a protezione della disfunzione endoteliale, ma sicuramente l'attività antiossidante, osservata e dimostrata sia attraverso metodi analitici che attraverso studi di bioinformatica, potrebbe potenzialmente, in maniera indiretta, dare un effetto positivo nella protezione cardiovascolare (es. rallentando la formazione delle placche aterosclerotiche).

I risultati raggiunti dall'UdR NUTRALP VdA hanno contribuito a dare un valore aggiunto ai prodotti principi dell'agricoltura valdostana, consentendo di veicolarli non solo come prodotti di qualità attraverso l'immagine della Valle d'Aosta, ma anche perché prodotti naturalmente benefici per la salute, rispondenti quindi alla crescente richiesta da parte del consumatore che è sempre più attento all'interazione alimentazione e salute.

La conoscenza approfondita del valore salutistico di alcuni prodotti della nostra regione si può tradurre in tutela e innovazione dei prodotti tipici anche trasformati, elementi essenziali per lo sviluppo del territorio e la competitività delle imprese. Inoltre, tale conoscenza, acquisita grazie al progetto NUTRALP VdA, ha portato all'individuazione di composti bioattivi che potrebbero essere effettivamente utilizzabili per lo

sviluppo di nuovi integratori alimentari e alimenti funzionali sempre più presi in considerazione dal consumatore per una prevenzione di una serie di patologie cronico-degenerative come diabete e aterosclerosi, patologie cardiovascolari e tumori.