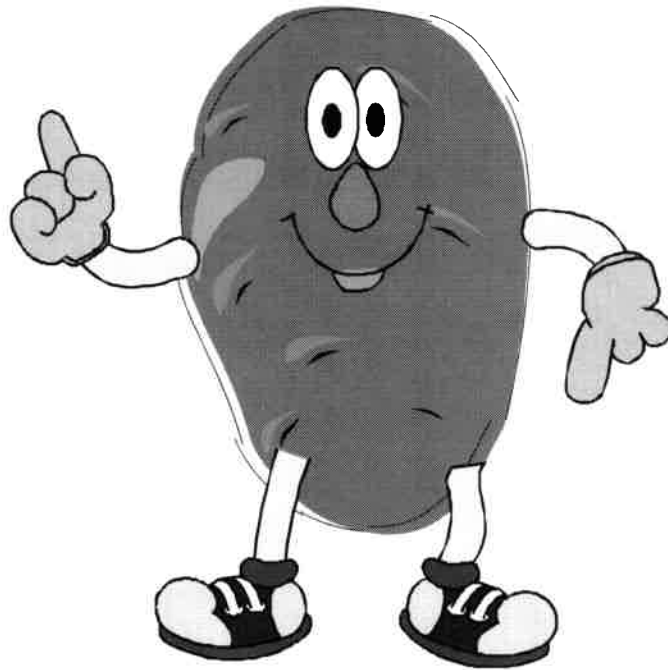


***VALORIZZAZIONE DELLA PATATA IN
AMBIENTI MONTANI: RECUPERO E
REINTRODUZIONE DI ALCUNI ECOTIPI
LOCALI DELLA BIODIVERSITÀ ALPINA ED
INDIVIDUAZIONE DI PREGI QUALITATIVI
LEGATI ALL'AMBIENTE DI COLTIVAZIONE***



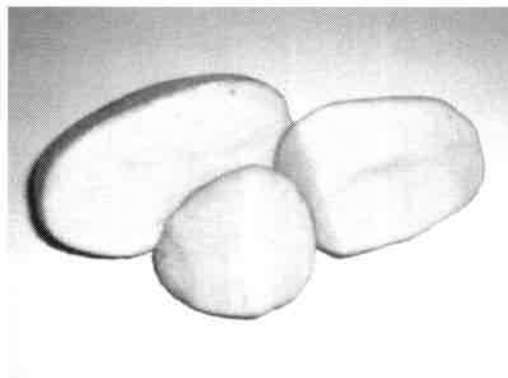
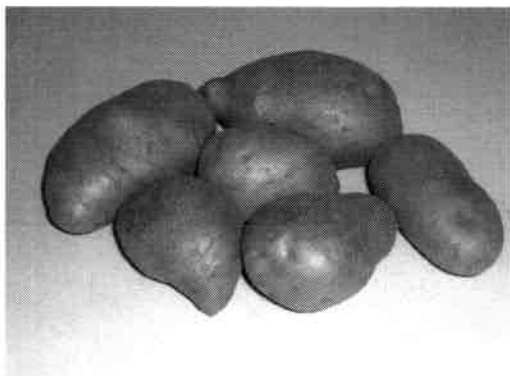
Relazione finale 1° anno

Le cultivar utilizzate

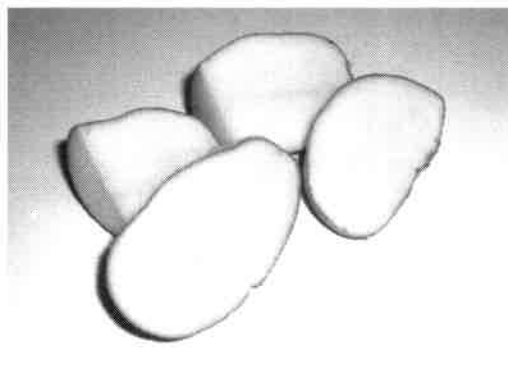
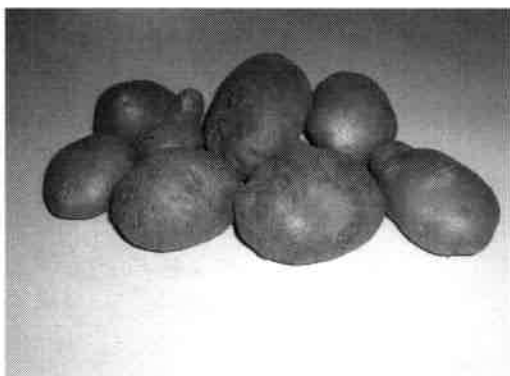
Le analisi sono state effettuate su cinque varietà di patate. I campioni provenivano da aziende site a Condove (TO) a circa 800 m s.l.m. ed a Sauze d'Oulx (TO) a circa 1.500 m s.l.m. Prima di effettuare le analisi i campioni sono stati conservati per circa due mesi in cella refrigerata a 6°C, per permetterne una completa maturazione.

In particolare le varietà esaminate sono state:

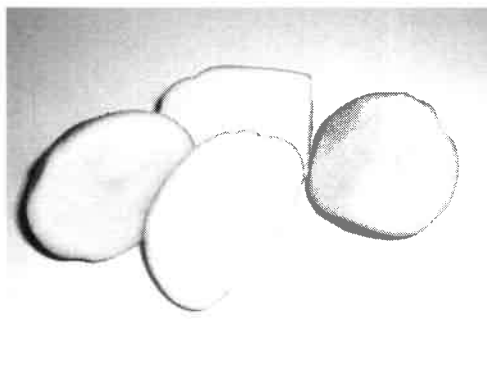
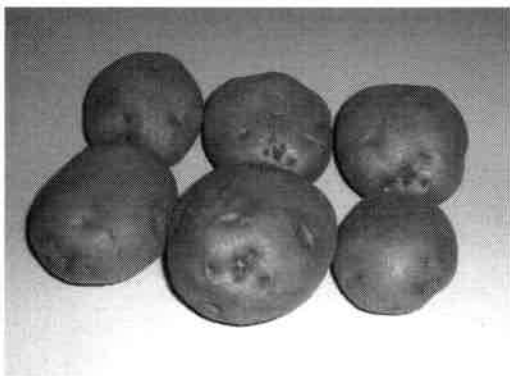
- Agria



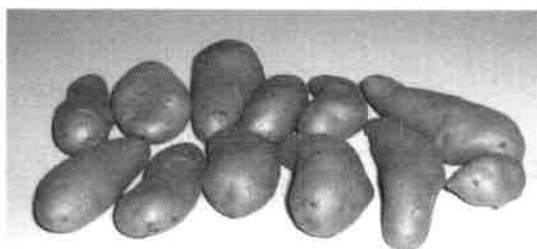
- Desirée



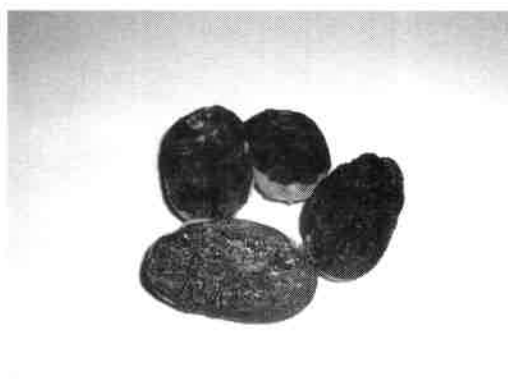
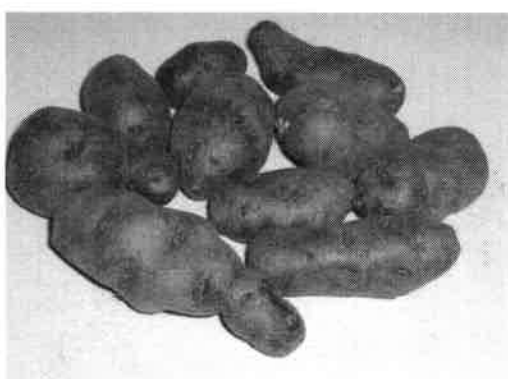
- Piatlina



- Ratta o Patata del Bur



- Viola



Analisi sensoriali

Per poter effettuare l'analisi sensoriale le patate sono state pelate, lavate e cotte al vapore per 40 minuti in 1,5 L di acqua oligominerale.



Al termine della fase di cottura il campione è stato esaminato caldo, programmando opportunamente i tempi, da un panel di assaggiatori non professionisti. L'esame sensoriale è stato effettuato mediante un test descrittivo libero con una valutazione finale del gradimento complessivo in scala centesimale mediante la scheda seguente.

Scheda descrittiva-valutativa libera		
Data:	Degustatore:	
Campione	Descrizione	Punti (0-100)

Le descrizioni fornite dagli assaggiatori sono state raccolte e sintetizzate raggruppando le sinonimie, mentre le valutazioni sono state normalizzate per ciascuna varietà e sito di provenienza.

Contemporaneamente è stata effettuata una valutazione visiva della polpa del prodotto ed una classificazione dello stesso secondo i parametri EAPR (www.eapr.net).

Categoria EAPR	Valutazione visiva della polpa dopo cottura a vapore
A	Tuberi che non scuociono, pasta molto fine, soda e umida (varietà indicate per insalata e minestrone)
B	Tuberi di media consistenza, debolmente farinosi, struttura fine, poco umidi (patate per tutti gli usi)
C	Patate che si aprono dopo cottura, polpa tenera, farinosa, piuttosto asciutta, a struttura grossolana (purée)
D	Patate alquanto farinose che si sfaldano dopo cottura, asciutte e di sapore ruvido (non adatte per il consumo umano)

Relativamente al sito di Condove si evidenzia una maggiore presenza di patate di Categoria B, quindi con polpa di media consistenza, debolmente farinose e poco umide, rispetto a patate di categoria A con polpa più compatta ed umida, mentre risultano assenti quelle di tipo C.

Risultati dell'analisi sensoriale effettuata sulle patate provenienti dal sito di Condove

Cultivar	Classificazione EAPR	Descrizione riassuntiva valutatori	Valutazione sensoriale (punti su 100)
Agria	B	Colore giallo intenso poco uniforme. Odore gradevole, delicato, classico di amido. Pasta morbida, leggermente granulare, farinosa, pastosa, insipida. Aroma poco intenso.	69
Desirée	A	Colore giallo intenso abbastanza uniforme. Odore intenso, gradevole, dolce, di amido. Pasta morbida e compatta al taglio, pastosa, poco adesiva, non friabile, dolce.	76

Retrogusto di castagna.			
Piatlina	B	Colore giallo chiaro. Odore poco intenso, delicato, gradevole, di patata bollita. Pasta molto morbida al taglio, farinosa, insipida, amara, pastosa. Aroma di vegetale e di terra.	65
Ratta (Patata Del Bur)	A	Colore giallo chiaro. Odore poco intenso, delicato, di cotto. Pasta compatta, buona struttura, pastosa, insipida, poco acida, asciutta, equilibrata.	74
Viola	B	Colore viola tipico da uniforme a maculato. Odore di cotto, odore intenso di castagna bollita. Pasta asciutta, compatta al taglio, molto farinosa, dolce intenso, impasta la bocca, acida sul finale.	72

Per quanto riguarda i risultati relativi al sito di Sauze d'Oulx sono presenti maggiormente patate di categoria B, mentre si ha l'assenza di patate di categoria A e la presenza di una cultivar in categoria C.

Questo risultato sembra evidenziare un effetto positivo del sito di provenienza sulle caratteristiche strutturali e sensoriali del prodotto, ma sono necessari ovviamente ulteriori approfondimenti per confermare questa indicazione.

Risultati dell'analisi sensoriale effettuata sulle patate provenienti dal sito di Sauze d'Oulx

Cultivar	Classificazione EAPR	Descrizione riassuntiva valutatori	Valutazione sensoriale (punti su 100)
Agria	C	Colore giallo paglierino intenso uniforme. Odore intenso ma non gradevole di vegetale ed amido. Pasta farinosa e friabile, leggermente dolce, insipida, adesiva, sapore poco consistente.	65
Desirée	B	Colore giallo paglierino poco intenso e poco uniforme. Odore non gradevole erbaceo intenso. Pasta compatta, farinosa, molto dolce, amara sul finale, ricorda il pesce. Aroma di vegetale.	66
Piatlina	B	Colore giallo chiaro. Odore di cotto, intenso, aromatico. Pasta morbida, poco dolce, insipida, pastosa. Retrogusto vegetale. Leggermente acida.	73
Ratta (Patata del Bur)	B	Colore giallo intenso. Odore di cotto, intenso, di amido. Pasta asciutta, consistente ma adesiva, leggero sentore di castagna bollita, sapida. Retrogusto di vegetale.	73
Viola	B	Colore tipico viola intenso da uniforme a maculato. Odore di castagna bollita, profumo tipico poco marcato. Pasta compatta, morbida ma asciutta, leggermente farinosa, dolce, amarognola, sapida. Aroma intenso, retrogusto di terra e di vegetale, acido.	79

Esaminando le cultivar dal punto di vista delle valutazioni sensoriali, risulta evidente che la Viola è quasi sempre la più gradita, indipendentemente dal sito considerato, seguita dalla Ratta.

L'Agria risulta in genere la cultivar meno gradita, indipendentemente dal sito di provenienza, forse per l'odore poco intenso, a volte con sentore vegetale e considerato in alcuni casi poco gradevole.

Valutazioni sensoriali medie fornite dagli assaggiatori per le cinque cultivar di patata nei due siti

Cultivar	Sito	Valutazione sensoriale (punti su 100)
Agria	Condove	69
	Sauze d'Oulx	65
Desirée	Condove	76
	Sauze d'Oulx	66
Piatlina	Condove	65
	Sauze d'Oulx	73
Ratta (Patata del Bur)	Condove	74
	Sauze d'Oulx	73
Viola	Condove	72
	Sauze d'Oulx	79

Valutazione utilizzo

Presso l'Istituto Professionale Statale per i Servizi Alberghieri e della Ristorazione "N. Bobbio" di Carignano (TO) le patate sono state utilizzate nella preparazione di tre piatti: gli gnocchi, le patate fritte e le patate al forno. Per ciascuna portata sono state utilizzate delle procedure di preparazione standardizzate e sono state effettuate dagli operatori delle valutazioni sulla idoneità delle singole cultivar alla trasformazione sia durante che al termine delle preparazioni stesse (Allegato 1).

Nelle tabelle seguenti sono riportate per ogni patata in esame i risultati di queste valutazioni sia in termini descrittivi che in termini numerici.

Patate del sito di Condove

DESIRE'E		
TIPO DI COTTURA	DESCRIZIONE SENSORIALE LIBERA	MEDIA DEI PUNTEGGI ASSEGNATI
PATATE AL FORNO	Adatte/abbastanza adatte, aspetto gradevole, croccanti all'esterno, morbide all'interno, abbastanza/troppo farinose, soffice, dorata, sapore persistente, trattengono troppo olio, andrebbero cotte di più, tiene molto bene la cottura e la forma, non si sfalda in bocca.	66,39
PATATE FRITTE	Molli sia all'interno che all'esterno, non/poco croccanti, sfatta all'interno, troppo tenera, sapore persistente, eccessivamente farinose, non unte, gustose, senza crosta di doratura, tiene bene la cottura.	63,06
GNOCCHI	Molli, gustosi, compatti, sia prima della cottura che dopo, sapore intenso, gradevole, eccessivamente collosi, pastosi elastici, non/poco solubili. Morbidi, gommosi, mantengono la forma, si attaccano al palato, ottima consistenza, tengono bene la cottura, gustosi, sapidi.	69,71

AGRIA		
TIPO DI COTTURA	DESCRIZIONE SENSORIALE LIBERA	MEDIA DEI PUNTEGGI ASSEGNATI
PATATE AL FORNO	Croccante, ben dorata, morbida all'interno, ottimo sapore e consistenza, non farinose, molto adatta per questa preparazione	77,37
PATATE FRITTE	Farinosa, sembra bollita non cotta all'interno, se si cuoce troppo si spappola e si sfalda, se si cuoce meno rimane cruda ed eccessivamente molle e unta, assorbe troppo olio durante la cottura., pastosa, isocromia tra interno ed esterno, non è apprezzabile né la croccantezza del prodotto, né la doratura, infatti l'interno e l'esterno hanno la stessa consistenza, inadatta per questo tipo di cottura.	38,95
GNOCCHI	Ottima la consistenza, compatti, tengono bene la cottura e la forma morbidi e delicati, dolci, saporiti, leggermente collosi, tendono ad attaccarsi al palato, ben levigati, solubili, pastosi. Adatte per questo tipo di preparazione.	73,22

PIATLINA		
TIPO DI COTTURA	DESCRIZIONE SENSORIALE LIBERA	MEDIA DEI PUNTEGGI ASSEGNATI
PATATE AL FORNO	Le patate tendono a sfaldarsi, non mantengono la forma dopo la cottura e al minimo tocco. Tendono ad assorbire troppo olio, nel complesso risultano abbastanza croccanti all'esterno e morbide e farinose all'interno., gusto metallico, amarognolo, fastidioso, farinosa, solubile, poco consistente, dolce. Non adatta per questo tipo di preparazione.	61,47
PATATE FRITTE	Adatte. Tiene bene la cottura, mantengono bene il colore chiaro iniziale, sapore ottimo, mantengono bene la forma, talvolta croccanti, morbida all'interno, non unte, asciutte, solubili.	61,05
GNOCCHI	Molto chiari alla vista, leggermente collosi, sapore caratteristico di difficile percezione, poco persistente, dolciastri, buona la consistenza, compatti, pastosi, farinosi. Morbidi, estremamente solubili, non collosi, non gommosi. Tengono bene la forma.	58,33

DEL BUR		
TIPO DI COTTURA	DESCRIZIONE SENSORIALE LIBERA	MEDIA DEI PUNTEGGI ASSEGNATI
PATATE AL FORNO	Aspetto gradevole, doratura sufficiente, croccanti all'esterno, farinose, morbide, gustose, sapore dolce, intenso, persistente.	72,43
PATATE FRITTE	Consistenza troppo molle, poco o per niente croccanti, farinose, dolci, poco o per niente unte, nel complesso saporite,	51,90
GNOCCHI	Si sciolgono in bocca, morbidi, dolciastri, saporiti, lievemente farinosi, molto solubili, non elastici e non gommosi. Adatti per questo tipo di preparazione.	74,74

VIOLA		
TIPO DI COTTURA	DESCRIZIONE SENSORIALE LIBERA	MEDIA DEI PUNTEGGI ASSEGNATI
PATATE AL FORNO	Dure, croccanti, troppo secche, interno cavo, poco morbide all'interno, leggermente asciutte e farinose, amare, ricordano il sapore della castagna. Non adatte per questo tipo di cottura	40,35
PATATE FRITTE	Croccanti all'esterno, asciutte, quasi secche, poco saporite, amare, leggermente molli e farinose. Non adatte per questa cottura.	51,45
GNOCCHI	Giusta consistenza, saporiti, leggermente collosi. A tratti grumosi, compatti, lisci, tengono bene la forma, e la cottura. Poco farinosi, non adesivi. Adatte per questo tipo di preparazione.	71,11

Patate del sito di Sauze d'Oulx

DESIRE'E		
TIPO DI COTTURA	DESCRIZIONE SENSORIALE LIBERA	MEDIA DEI PUNTEGGI ASSEGNATI
PATATE AL FORNO	Aspetto: nonostante l'eccessiva doratura, sono poco croccanti all'esterno anche appena sfornate, molto-troppo farinose e morbide all'interno. Sapore amarognolo e poco gustose. Tendono a disfarsi internamente, assobono olio. Non adatta per questo tipo di preparazione.	44,42
PATATE FRITTE	Poco croccanti, molto saporite, assobono troppo olio durante la cottura. Consistenza: molle. Perdono di croccantezza a breve distanza dalla cottura. Poco adatte per questo tipo di preparazione.	48,68
GNOCCHI	Aspetto e consistenza ottimi. Molto morbidi, solubili, lievemente adesivi, non gommosi. Mantengono adeguatamente la compattezza in cottura. Adatte per questo tipo di preparazione.	74,56

AGRIA		
TIPO DI COTTURA	DESCRIZIONE SENSORIALE LIBERA	MEDIA DEI PUNTEGGI ASSEGNATI
PATATE AL FORNO	Buona doratura. Gustose di sapore dolciastro, molto caratteristico. Troppo morbide e leggermente farinose all'interno tendenti a disfarsi, abbastanza croccanti all'esterno. Assorbono olio. Leggera adesività.	61,58
PATATE FRITTE	Abbastanza-molto croccanti. Buona doratura, molto saporite, tendono ad assorbire troppo olio in cottura.	67,63
GNOCCHI	Di aspetto non gradevole, ma bel colore. Non omogenei, tendono a disfarsi in fase di cottura, non tengono la forma, consistenza non adeguata, disomogenei, ma il sapore è ottimo. Leggermente farinosi e grumosi, troppo morbidi, lievemente adesivi.	58,33

PIATLINA		
TIPO DI COTTURA	DESCRIZIONE SENSORIALE LIBERA	MEDIA DEI PUNTEGGI ASSEGNATI
PATATE AL FORNO	Crocquantezza perfetta appena sfonate, ma la perdono assai rapidamente. Morbide all'interno, compatte, non si sfaldano, saporite, leggermente farinose, tendono ad assorbire molto olio. Hanno sapore particolare con sentori metallici.	64,38
PATATE FRITTE	Buona la cottura, assorbono molto olio, sufficientemente croccanti, saporite, morbide, non si sfaldano.	69,23
GNOCCHI	Aspetto gradevole, omogenei, farinosi, molto morbidi, adesivi, sapore sgradevole con sentori metallici inconsueti molto accentuati. Compatti non si sfaldano in cottura. Non adatti per questo tipo di preparazione.	50,83

DEL BUR		
TIPO DI COTTURA	DESCRIZIONE SENSORIALE LIBERA	MEDIA DEI PUNTEGGI ASSEGNATI
PATATE AL FORNO	Buona doratura, consistenti, tengono bene la forma, tendono a sfaldarsi, molto croccanti, morbide all'interno, leggermente farinose, dolciastre, saporite, assorbono troppo olio.	60,59
PATATE FRITTE	Per nulla croccanti, decisamente molli, si sfaldano, disomogenee, non tengono la forma durante la cottura, eccessivamente unte. Non adatte per questo tipo di preparazione.	36,47
GNOCCHI	Molto compatti, tengono molto bene la consistenza in cottura, molto solubili, consistenza perfetta. Sapore molto gradevole. Perfetti per questo tipo di preparazione.	81,88

VIOLA		
TIPO DI COTTURA	DESCRIZIONE SENSORIALE LIBERA	MEDIA DEI PUNTEGGI ASSEGNATI
PATATE AL FORNO	Media crocquantezza, molto compatte, stoppose, non assorbono olio, il sapore e la consistenza ricordano quello della castagna. Mantengono inalterata la forma.	62,31
PATATE FRITTE	Crocquantezza perfetta, molto compatte, per nulla unte, il sapore di castagna svanisce con questo tipo di cottura. Molto asciutte. Risultano adatte per questo tipo di preparazione.	70,38
GNOCCHI	Ottimo e inconsueto aspetto. Consistenza perfetta, molto morbidi, solubili, il sapore di castagna non è presente. Leggermente adesivi, molto omogenei, compatti.	60,42

Nella tabella seguente sono riportati i valori medi dei punteggi ottenuti dalle diverse cultivar per le tre tipologie di preparazioni.

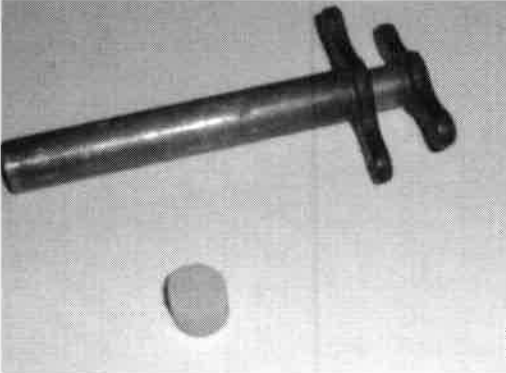
		Patate al forno	Patate fritte	Gnocchi
Condove	Desirée	66.39	63.06	69.71
	Agria	77.37	38.95	73.22
	Piatlina	61.47	61.05	58.33
	Del Bur	72.43	51.90	74.74
	Viola	40.35	51.45	71.11
Sauze d'Oulx	Desirée	44.42	48.68	74.56
	Agria	61.58	67.63	58.33
	Piatlina	64.38	69.23	50.38
	Del Bur	60.59	36.47	81.88
	Viola	62.31	70.38	60.42

Per la preparazione al forno spicca quindi la Agria e la Patata del Bur mentre per la produzione di patate fritte si presta bene la Viola ed abbastanza bene la Piatlina benché nessuna delle cultivar esaminate risulti particolarmente indicata per questo tipo di preparazione. Al contrario per la produzione di gnocchi molte cultivar risultano particolarmente indicate benché i risultati migliori si abbiano con la Patata del Bur.

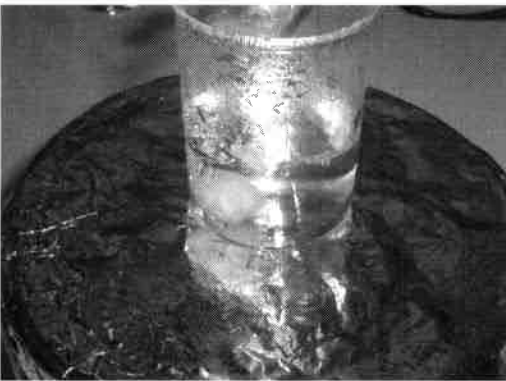
Non sembra esservi alcun legame con il sito di produzione benché i prodotti provenienti da Condove forniscano in genere prodotti migliori per tutte le diverse preparazioni.

Analisi di struttura

Per eseguire l'analisi di struttura sono state scelte cinque patate per ciascuna cultivar e per ogni sito di provenienza. Da ciascuna è stata ricavata una fetta spessa 1 cm, quindi con un carotatore ne è stato estratto un cilindretto di 12 mm di diametro. Il cilindretto è stato quindi immerso in 50 mL di acqua deionizzata, portata ad ebollizione, per un tempo di 6 minuti.

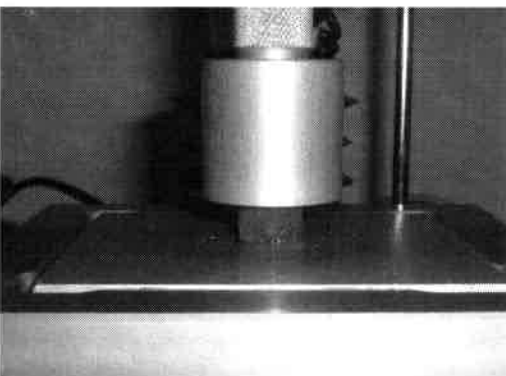


Carotatore e cilindretto di patata

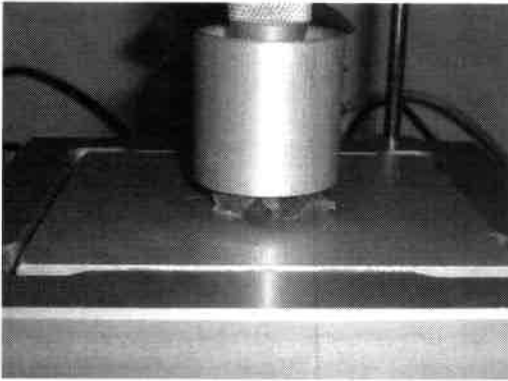


Cottura del cilindro di patata

Al termine della cottura i cilindretti sono stati sgocciolati e posizionati sul ripiano del Texture Analyzer per poter effettuare l'analisi di struttura. L'analisi è stata condotta utilizzando un Universal Testing Machines TA-TX2/® Texture Analyzer (Stable Micro Systems, UK) equipaggiato con un cilindro di 35 mm di diametro. Per l'esecuzione del test è stata utilizzata una cella di carico di 5 Kg, una velocità di 0,8 mm/s ed una deformazione del 75% dell'altezza originale.

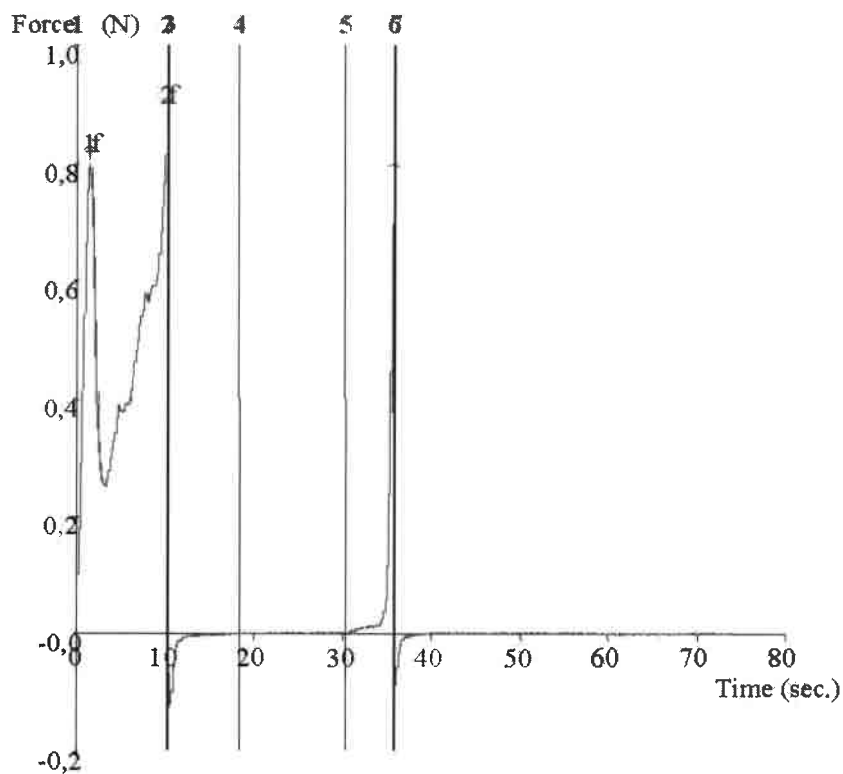


Cilindretto di patata sottoposto al *Texture Analyzer*



Cilindretto di patata al termine della compressione

In seguito alla Texture Profile Analysis (TPA) sono stati estrapolati otto parametri meccanici: la fratturabilità, la durezza, la coesività, l'adesività, la gommosità, la masticabilità, l'elasticità e la resilienza.



Curva caratteristica della TPA per un campione di patata

L'analisi della varianza fattoriale eseguita per gli otto parametri strutturali considerati evidenzia che la coesività, la resilienza e la gommosità non risultano significativamente differenti né fra i siti né fra le varietà. La durezza e la masticabilità presentano invece una bassa ($P < 0,05$) significatività rispetto al sito di produzione, mentre l'elasticità e la durezza presentano differenze significative per $P < 0,01$ fra le varietà indipendentemente dal sito di produzione. Per

quanto riguarda l'adesività si può evidenziare una differenza altamente significativa fra i siti di produzione indipendentemente dalle varietà, mentre la fratturabilità presenta differenze significative sia in base al sito di produzione che alla varietà e così è anche per la loro interazione.

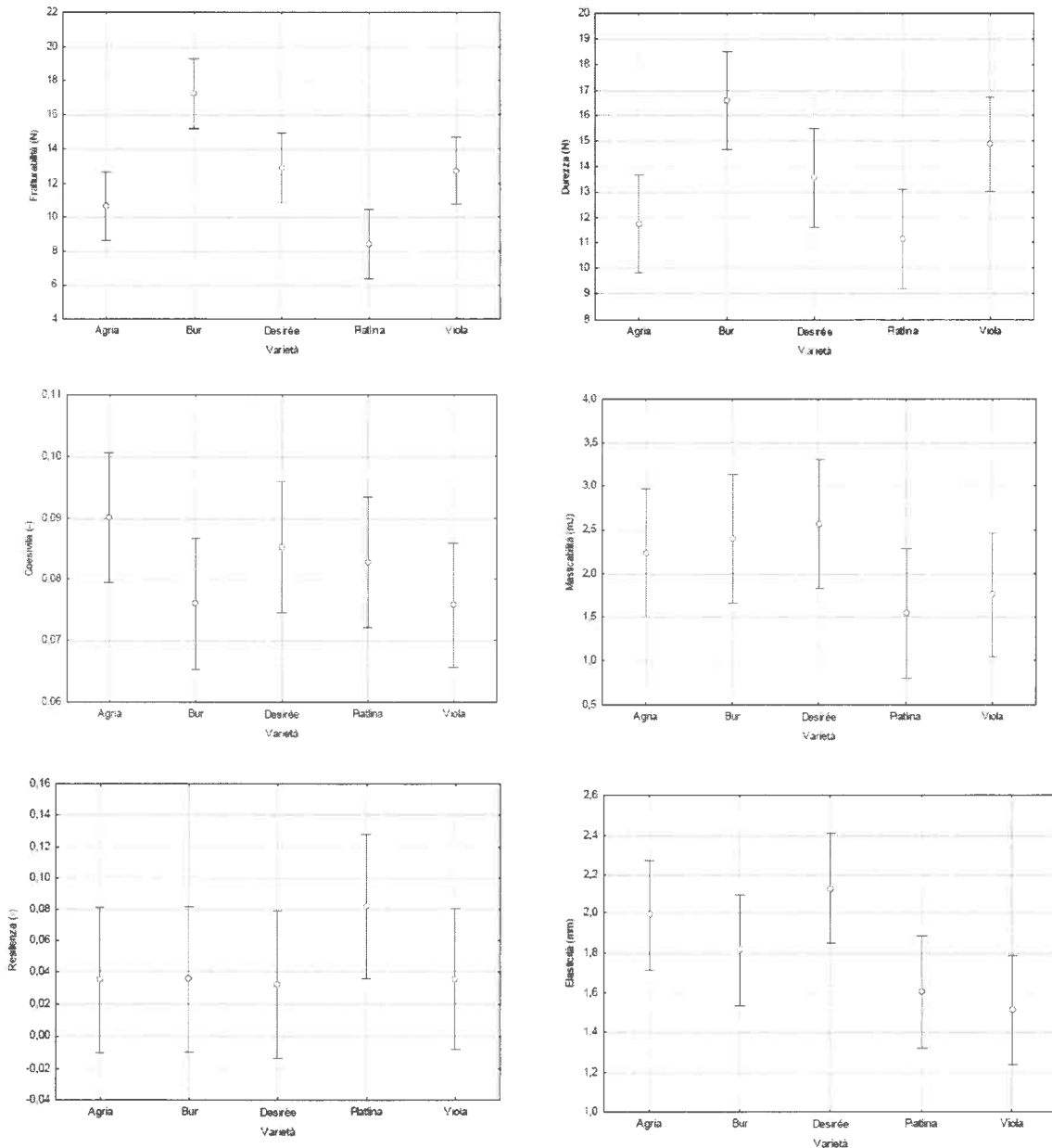
Risultati dell'analisi della varianza fattoriale eseguita per gli otto parametri rilevati con il TPA

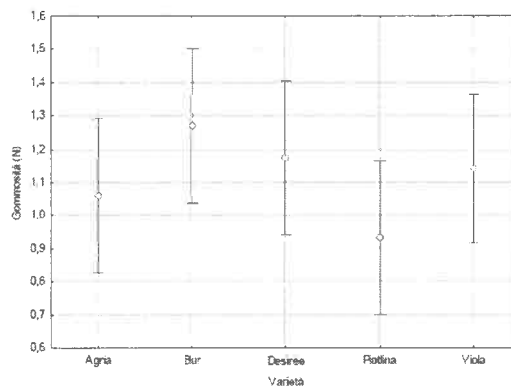
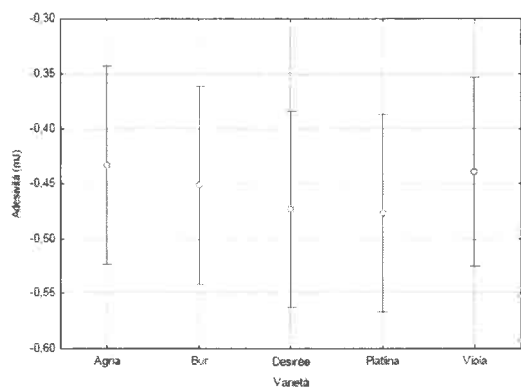
	Fratturab.	Durezza	Adesiv.	Coesiv.	Resil.	Masticab.	Elast.	Gomm.
Sito	***	*	***	n.S.	n.S.	*	n.S.	n.S.
Varietà	***	**	n.S.	n.S.	n.S.	n.S.	**	n.S.
Interazione	**	n.S.	n.S.	n.S.	n.S.	n.S.	n.S.	n.S.

(* P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; n.s. = non significativo)

Nella figura seguente sono riportati i valori medi e le relative deviazioni standard per ciascuna delle varietà considerate e ciascuno dei parametri calcolati della TPA.

Valori medi e relative deviazioni standard calcolate per ciascun parametro strutturale e ciascuna varietà in esame





Indipendentemente dal sito di produzione, la fratturabilità risulta correlata alla durezza con i massimi valori per la Ratta (o patata del Bur) ed il minimo per la Piatina .

Adesività e coesività risultano elevate per la Ratta e la Viola confermando così quanto evidenziato dall'analisi sensoriale in cui gli assaggiatori le hanno indicate come patate adesive, che impastano la bocca.

L'elasticità presenta un valore molto elevato per la Désirée, che all'analisi sensoriale presenta del resto una pasta compatta e morbida, ed un minimo per la Viola, che presenta invece una pasta compatta ma più asciutta.

La gommosità risulta bassa nella Piatina ed alta nella Ratta, che peraltro nell'analisi sensoriale viene indicata come una patata con polpa soda e consistente, a differenza della Piatina ritenuta compatta ma più farinosa, quindi più facile da disgregare.

Analisi nutrizionali

Nelle tabelle che seguono sono riportate i principali parametri compositivi delle cinque cultivar esaminate, per ciascuno dei siti di coltivazione ed i valori medi forniti dall'INRAN. I dati sono riferiti a 100 g di prodotto crudo fresco.

	AGRIA		DESIRÉE		PIATLINA	
	Condove	Sauze d'Oulx	Condove	Sauze d'Oulx	Condove	Sauze d'Oulx
Valore energ.(Kcal)	69	58	70	62	65	62
Valore energ. (KJ)	295	248	298	262	277	262
Proteine (g)	2,1	2,2	2,1	2	2,5	2,6
Grassi (g)	0,2	< LQ	0,3	< LQ	0,1	< LQ
Carboidrati (g)	14,8	12,4	14,8	13,4	13,6	12,8
Fibre Alimentari (g)	2,2	2,5	2,4	2,4	1,9	2,5
Cont. in acqua (g)	79,3	82,1	79,2	81,5	80,5	81,2
Ceneri (g)	1,37	0,76	1,22	0,7	1,38	0,92
Calcio (mg)	4,1	3,1	5,8g	3,5g	3,5	3,9
Ferro (mg)	58,1	40,6	76,9g	37,2g	88,7	49,3
Fosforo (mg)	71,9	31,7	79,7g	30,2g	81,4	31,2
Magnesio (mg)	26,5	21,9	27,1g	21,5g	23,4	21,4
Manganese (mg)	12,6	13,4	20,2g	18,2g	14,4	13,1
Potassio (mg)	56,9	40,9	5,4g	38,7g	54,1	53,8
Rame (mg)	20,6	12,5	22,4g	12,7g	36,6	12,3
Selenio (mg)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Sodio (mg)	21,8	17,9	28,1g	12,2g	24,8	12,9
Zinco (mg)	34,4	26,1	41,1g	24,6g	52,9	24,9
Vitamina C (mg)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ

	RATTA		VIOLA		Composizione media (INRAN)
	Condove	Sauze d'Oulx	Condove	Sauze d'Oulx	
Valore energetico (Kcal)	80	66	90	93	85
Valore energetico (KJ)	339	282	383	396	354
Proteine (g)	1,8	2,2	2	1,6	2.1
Grassi (g)	0,2	< LQ	0,2	< LQ	1
Carboidrati (g)	17,7	14,4	20,1	21,7	17,9
Fibre Alimentari (g)	2,3	2,4	2	2,4	1,6
Contenuto in acqua (g)	76,7	80,3	74,1	73,3	78,5
Ceneri (g)	1,34	0,75	1,65	1,02	nr
Calcio (mg)	6,3	5,7	5,0	11,2	10
Ferro (mg)	67,8	49,9	79,5	47,1	0.6
Fosforo (mg)	84,8	42,7	81,4	52,5	54
Magnesio (mg)	31,5	20,8	31,9	24,9	28
Manganese (mg)	16,2	14,6	29,1g	15,9	nr
Potassio (mg)	60,9	45,7	67,4	56,5	570
Rame (mg)	20,8	1,6	20,6	14,3	0.19
Selenio (mg)	< LQ	< LQ	7	< LQ	tr
Sodio (mg)	28,7	39,2	39,4	33,8	7
Zinco (mg)	44,8	34,9	46,9	21,5	1.24
Vitamina C (mg)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	15

(nr – non riportato, tr - tracce)

In generale i prodotti provenienti dal sito di Condove evidenziano una maggiore presenza di macro e micro elementi, rispetto a quelli del sito di Sauze d'Oulx. Ciò è riscontrabile in tutte le cv prese in esame ed questo è sicuramente imputabile alle tecniche agronomiche praticate nel sito di "pianura".

Molto scarso il selenio che risulta presente solo nelle patate appartenenti alla varietà Viola, proveniente dal sito di Condove. Assente la Vitamina C in tutti i campioni.

Se si confrontano i valori rilevati per la cultivar in studio con quelli medi riportati dall'INRAN si possono evidenziare alcune interessanti differenze.

Il quantitativo di lipidi e di potassio contenuti nelle cultivar locali sono leggermente minori mentre il contenuto di sodio, di ferro, di fosforo, di zinco sono decisamente maggiori.

Il contenuto di acqua, di proteine, di carboidrati, di fibre alimentari e di magnesio sono pressoché simili. Il quantitativo di calcio è invece nettamente inferiore nelle varietà prese in considerazione nel presente lavoro, a differenza delle patate della cv Viola proveniente dal sito di Sauze d'Oulx, che ne contiene un quantitativo all'incirca simile.

Determinazione di acidi e zuccheri

Per la determinazione del contenuto in acidi 5 g di patata sono stati uniti a 25 mL di etanolo 80% e frullati, alla velocità di 8000 rpm per 1 minuto, mediante Ultraturrax T25. La sospensione così ottenuta è stata quindi bollita per 15 minuti, raffreddata e filtrata su carta riconducibile al tipo Whatman n. 4, procedendo ad alcuni lavaggi del residuo con etanolo 80%. Il liquido è stato infine portato a 50 mL, filtrato su membrana 0,20 µm ed iniettato in HPLC.

Nel caso invece degli zuccheri 5 g di patata sono stati posti in 25 mL di H₂SO₄ 0,0008 N, frullati alla velocità di 8000 rpm per 1 minuto mediante Ultraturrax T25 (IKA, DK) e centrifugati (7000 rpm per 5 minuti). Il surnatante è stato infine filtrato su membrana 0,20 µm ed iniettato in HPLC.

Sono state effettuate, sia per gli zuccheri che per gli acidi, tre estrazioni per ciascun campione

Le condizioni cromatografiche utilizzate per entrambe le determinazioni sono state le seguenti:

- Colonna Aminex HPX-87H 300 mm × 7,8 mm i.d. (Bio-Rad Laboratoires, CA, US) alla temperatura di 75°C;
- Fase mobile: H₂SO₄ 0,0008 N, flusso 0,8 mL/min;
- Detector DAD impostato a 214 nm per la determinazione degli acidi;
- Detector RI per la determinazione degli zuccheri.

Valori medi (mg/100 g di prodotto fresco) e relative deviazioni standard calcolate per il contenuto in zuccheri ed acidi delle patate esaminate

		Saccarosio	Glucosio	Fruttosio
Agria	Condove	575±204	128±72	54±38
Agria	Sauze	156±28	530±37	452±29
Desirée	Condove	442±131	261±37	191±54
Desirée	Sauze	138±17	940±70	1022±63
Piatlina	Condove	699±90	216±60	137±59
Piatlina	Sauze	149±13	273±10	210±5
Ratta	Condove	642±82	241±47	135±42
Ratta	Sauze	514±28	1173±6	432±24
Viola	Condove	543±28	524±125	275±179
Viola	Sauze	485±64	743±70	481±29

		Ossalico	Citrico	Tartarico	Malico	Fumarico	Succinico
Agria	Condove	21.4±3.4	216.0±8.9	1.7±0.6	32.7±4.6	0.5±0.2	41.1±10.4
Agria	Sauze	13.9±4.2	152.8±21.2	0.5±0.2	47.5±10.9	0.4±0.1	29.2±3.0
Desirée	Condove	35.0±5.5	128.4±22.7	0.7±0.3	29.4±7.0	0.3±0.1	38.1±4.3
Desirée	Sauze	31.7±29.7	89.4±10.3	0.3±0.3	42.3±21.4	0.3±0.1	24.3±4.1
Piatlina	Condove	93.9±47.3	120.4±59.5	5.9±0.7	147.5±111.4	1.8±0.3	36.7±8.8
Piatlina	Sauze	94.5±30.0	117.6±14.1	0.5±0.3	37.9±6.1	0.3±0.1	52.4±21.2
Ratta	Condove	37.7±10.9	153.7±16.1	1.6±0.5	38.4±13.6	0.5±0.2	47.4±5.1
Ratta	Sauze	65.0±52.8	93.2±52.6	0.3±0.2	107.7±52.7	0.8±0.3	44.2±5.0
Viola	Condove	16.9±5.7	126.3±26.0	4.2±1.3	36.5±4.8	0.2±0.1	43.2±7.7
Viola	Sauze	22.6±6.0	124.5±12.5	1.5±1.2	21.8±2.3	0.1±0.0	40.9±19.9

Nel caso degli zuccheri risultano evidenti le differenze fra i due siti: nei campioni provenienti da quello di Condove vi è sempre una maggiore presenza di saccarosio ed una minore di glucosio e fruttosio. Fra le cultivar spicca la Desirée che presenta le concentrazioni più elevate di zuccheri confermando appieno quanto evidenziato dall'assaggio. Valori molto elevati anche per la Viola anch'essa indicata all'assaggio come prodotto dolce.

Per quanto riguarda gli acidi la situazione è molto più complessa e le differenze fra i siti sono correlabili all'acido considerato. Così i prodotti provenienti dal sito di Condove risultano in genere più ricchi in acido citrico e tartarico ed in alcuni casi in acido malico. Fra le cultivar spicca la Piatlina per il suo contenuto molto elevato in acido malico e tartarico. Al contrario la Viola di Sauze che presenta il contenuto in acido malico minore.

Determinazione delle sostanze fenoliche

La preparazione dei campioni per la determinazione delle sostanze fenoliche si è basata su tre fasi:

- ✓ la surgelazione criogenica;
- ✓ la liofilizzazione;
- ✓ l'estrazione dei composti fenolici.

I campioni sono stati quindi sbucciati, tagliati a pezzi ed immediatamente surgelati con azoto liquido. I pezzi sono stati posti in sacchetti plastici e conservati a -18°C sino al momento dell'analisi. Questi sono poi stati posti in liofilizzatore per 96 h. Al termine di questa fase, il liofilizzato è stato ridotto in polvere, saturato con N_2 e conservato in essiccatore, al riparo da fonti di luce, fino all'inizio delle estrazioni.

Sono state utilizzate due tecniche di estrazione, entrambe ricavate dalla bibliografia.

Estrazione n°1

Circa 2 g di liofilizzato sono stati posti in una provetta da centrifuga da 40 mL e sospesi con 10 mL di una soluzione di metanolo in acqua (80/20 v/v). Il tutto è stato saturato con N_2 .

La provetta è stata poi posta in un bagno ad ultrasuoni per 60 min al fine di aumentare la resa di estrazione. Per separare la fase liquida da quella solida, si è centrifugato a 12.000 rpm a 5°C per 10 min e si è raccolto il surnatante in un *vial* ambrato facendolo passare in un filtro in PTFE da $0,45\ \mu\text{m}$ e saturando infine con N_2 . L'estratto così ottenuto è stato conservato a -18°C fino al momento delle analisi al fine di evitare modifiche strutturali degli analiti.

L'estrazione è stata compiuta in duplicato.

Estrazione n°2

Circa 2 g di liofilizzato sono stati posti in una provetta da centrifuga da 40 mL e sospesi con 20 mL di una soluzione di acetone in acqua (50/50 v/v). Il tutto è stato saturato con N_2 . La provetta è stata poi posta in agitatore per 15 h al fine di aumentare la resa di estrazione. Per separare la fase liquida da quella solida, si è centrifugato a 12.000 rpm a 5°C per 10 min e si è raccolto il surnatante in un *vial* ambrato purificandolo mediante un filtro in PTFE da $0,45\ \mu\text{m}$.

Si è infine fatto evaporare l'acetone con N_2 per circa 1 h. L'estratto così ottenuto è stato conservato a -18°C fino al momento delle analisi al fine di evitare modifiche strutturali degli analiti.

L'estrazione è stata compiuta in duplicato.

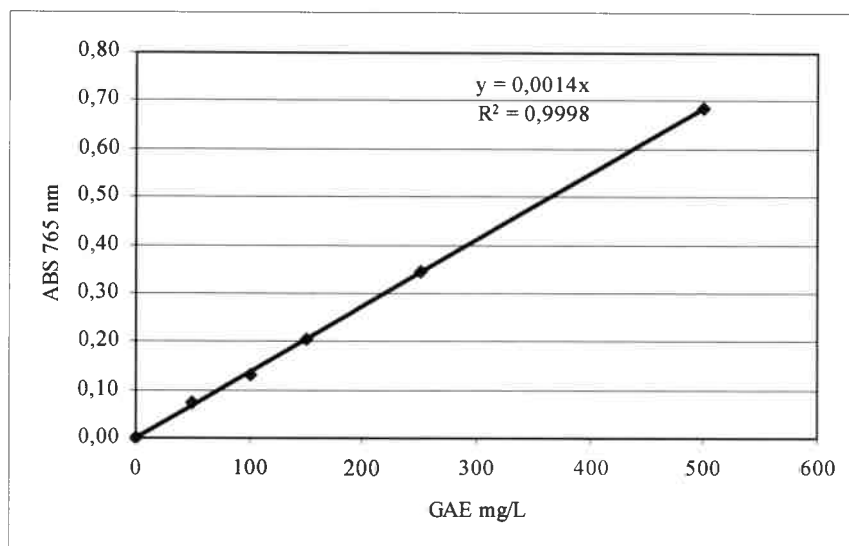
Analisi del contenuto in polifenoli totali

Di ciascun estratto è stato stimato il contenuto in polifenoli totali per via spettrofotometrica. Il metodo, basato su una reazione colorimetrica di ossido/riduzione, utilizza quale reagente il Folin-Ciocalteu e la quantità di sostanze fenoliche presenti è espressa come mg/g di acido gallico equivalente (GAE) per g di prodotto.

A $50\ \mu\text{L}$ di ciascun campione sono stati aggiunti $250\ \mu\text{L}$ del reattivo Folin-Ciocalteu e 3 mL di acqua. Dopo 3 minuti sono stati aggiunti $750\ \mu\text{L}$ di una soluzione di carbonato di sodio (2 g/100 mL). Dopo agitazione la miscela è stata fatta reagire per 2 h, a temperatura ambiente, in condizioni di ridotta luminosità. Contemporaneamente è stato preparato un bianco costituito da una identica miscela nella quale il campione è stato sostituito con $50\ \mu\text{L}$ di acqua. Trascorso il tempo di reazione è stata effettuata la lettura dell'assorbanza a 765 nm utilizzando uno spettrofotometro Shimadzu, UV-1700.

Per ciascuna delle due repliche estrattive sono state condotte tre misurazioni.

Il contenuto in polifenoli totali è stato determinato interpolando la retta di taratura riportata nella figura seguente.



Retta di taratura relativa al contenuto in polifenoli

Tale retta è caratterizzata dall'equazione:

$$x = y / 0,0014$$

dove x il corrispondente valore di acido gallico equivalente ed y rappresenta l'assorbanza del campione.

Nella tabella seguente sono riportati i contenuti di polifenoli, espressi in mg/g di acido gallico equivalente, determinati mediante il test di Folin-Ciocalteu, e valutati per le due miscele testate.

Valori medi e relative deviazioni standard del contenuto in polifenoli totali (mg GAE/g di prodotto) determinati mediante il test di Folin-Ciocalteu in funzione delle due miscele estraenti utilizzate.

	Etanolo/H ₂ O (80/20 v/v)				Acetone/H ₂ O (50/50 v/v)			
	CONDOVE		SAUZE D'OULX		CONDOVE		SAUZE D'OULX	
	MEDIA	DEV. STD.	MEDIA	DEV. STD.	MEDIA	DEV. STD.	MEDIA	DEV. STD.
AGRIA	1,3847	0,1504	0,6241	0,0317	2,8684	0,1699	1,4535	0,1296
DESIRÉE	1,2747	0,1009	0,8576	0,0142	2,5900	0,1234	2,8769	0,0569
PIATLINA	0,5590	0,0855	0,3246	0,1532	1,5419	0,0781	1,2775	0,1086
RATTA	0,8976	0,0800	0,8724	0,0723	2,5900	0,1234	1,8411	0,1471
VIOLA	3,2124	0,0654	2,7498	0,1165	4,0890	0,6576	3,0546	0,1165

L'analisi della varianza fattoriale eseguita sui valori ottenuti mediante il test di Folin-Ciocalteu evidenzia per entrambe le miscele testate differenze altamente significative sia in base al sito di produzione, che alla varietà e così è anche per la loro interazione .

Risultati dell'analisi della varianza fattoriale eseguita per le due miscele estraenti

	acetone/H ₂ O	etanolo/H ₂ O
Sito	***	***
CV	***	***
Interazione	***	***

(* P < 0,05; ** P < 0,01; ***P < 0,001; n. s. = non significativo)

La *cultivar* più ricca in polifenoli è risultata la Viola in tutti i siti e con tutte le miscele estraenti. Situazione intermedia per Agria, Desirée e Piatlina pur con alcune differenze legate al sito ed al solvente.

I minori contenuti di acidi fenolici li ha evidenziati invece la Ratta pur con qualche variazione in funzione del sito e del solvente. Per quanto concerne i siti, è quello di Condove che evidenzia in genere i contenuti più elevati di polifenoli. La maggiore azione estraente è svolta infine dalla miscela Acetone:H₂O (50:50 v/v) per tutte le *cv* ed i siti considerati.

Analisi mediante HPLC/DAD e HPLC/MS

L'analisi dei composti fenolici è stata condotta mediante un sistema HPLC dotato di doppia pompa (Spectrasystem P2000, Thermo), di auto-campionatore, di una colonna apolare con fase solida C₁₈ RP Lichrosphere (250 × 4.6mm, 5µm) dotata di precolonna e di un rivelatore UV a serie di diodi (DAD) dotato di una cella di 5 cm di lunghezza.

I solventi utilizzati per l'eluizione sono stati una miscela di acido trifluoroacetico in acqua (0,1% in v/v) (solvente A) e metanolo puro (solvente B).

La programmata della fase mobile (% di A in volume) durante l'analisi è stata la seguente:

- fase di analisi
- 0' 95% solvente A
- 20' 85% solvente A
- 30' 80% solvente A
- 38' 30% solvente A
- 40' 30% solvente A
- 43' 0% solvente A
- fase di equilibratura
- 44' 0% solvente A
- 55' 95% solvente A

Il flusso della fase mobile è stato impostato a 1 mL/min ed il campione è stato iniettato, utilizzando il *sampling loop* con un volume di 20 µL.

Il riconoscimento degli analiti è stato eseguito con un rivelatore DAD settato in modalità *fullscan* da 210 e 360 nm e su 2 lunghezze d'onda discrete a 280 (per riconoscere gli acidi fenolici) e 360 nm (per identificare i flavonoidi).

Sono stati analizzati 33 composti fenolici di cui 14 acidi fenolici, 10 flavonoidi, 3 flavonoli glicosidati e 6 composti misti.

Le soluzioni madre di ogni composto fenolico sono state preparate ad una concentrazione di 400 mg/L in soluzione di metanolo/H₂O (80/20 in v/v). Tutte queste soluzioni sono state conservate al buio a -18°C sino al momento delle analisi.

ACIDI FENOLICI		
Nome IUPAC	Famiglia	Nome comune
2-hydroxybenzoic acid	ac. benzoici	salicylic acid
2,3,4-trihydroxybenzoic acid	ac. benzoici	
3,4,5-trihydroxybenzoic acid	ac. benzoici	gallic acid
3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoic acid	ac. benzoici	syringic acid
3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid	ac. benzoici	vanillic acid
4-hydroxybenzoic acid	ac. benzoici	
3-phenyl-2-propenoic acid	ac. cinnamici	cinnamic acid
3-(2-hydroxyphenyl)-2-propenoic acid	ac. cinnamici	o-coumaric acid
3-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-2-propenoic acid	ac. cinnamici	isoferulic acid
3-(3-hydroxyphenyl)-2-propenoic acid	ac. cinnamici	m-coumaric acid
3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoic acid	ac. cinnamici	ferulic acid
3-(4-hydroxyphenyl)-2-propenoic acid	ac. cinnamici	p-coumaric acid
3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid	ac. cinnamici	caffeic acid
3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-2-propenoic acid	ac. cinnamici	sinapic acid

FLAVONOIDI		
Nome IUPAC	Famiglia	Nome comune
2-4(Hydroxy-3-methoxyphenyl)chromenylium-3,5,7-triol	antocianidine	Peonidina aglicone 1
3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxy-3,5 dimethoxyphenyl)chromenium	antocianidine	Malvidina aglicone 1
3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one	flavonoli	kaempferol
2-4(Hydroxy-3-methoxyphenyl)chromenylium-3,5,7-triol	antocianidine	Peonidina aglicone 2
2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,7-dihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one	antocianidine	fisetin
3,5,7-trihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one	flavonoli	myricetin
5-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-7-methoxy-4H-1-benzopyran-4-one	isoflavoni	prunetin
3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxy-3,5 dimethoxyphenyl)chromenium	antocianidine	Malvidina aglicone 2
7-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one	antocianidine	formononetin
2-4(Hydroxy-3-methoxyphenyl)chromenylium-3,5,7-triol	antocianidine	Peonidin

ALTRI COMPOSTI FENOLICI		
Nome IUPAC	Famiglia	Nome comune
2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-chromen-4-one	flavonoli glicosidati	hyperoside
2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-[(2S,3R,4R,5S,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyl-oxan-2-yl]oxy-chromen-4-one	flavonoli glicosidati	quercitrin
2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-[(2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[(2R,3R,4R,5S,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyl-oxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxy-chromen-4-one	flavonoli glicosidati	rutin
5-[[5-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]oxy]-1,4,5-trihydroxycyclohexanecarboxylic acid	misti	chlorogenic acid
[(2S,3S)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-chroman-3-yl] 3,4,5-trihydroxybenzoate	misti	epicatechin gallate
1-[2,4-dihydroxy-6-[(2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-phenyl]-3-(4-hydroxyphenyl)propan-1-one	misti	phloridzin
cis,cis'-4,8'-bi(3,3',4',5,7-pentahydroxyflavane)	misti	procyanidin B2
(2R,3R)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol	misti	Epicatechin
4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde	misti	Syringaldehyde

La colonna cromatografica trattiene gli analiti per polarità:

- nei primi 15 minuti di analisi eluiscono gli acidi idrossibenzoici, le procianidine e l'acido clorogenico;
- tra i 15 e 27 minuti gli acidi idrossicinnamici e le epicatechine;
- tra i 28 e i 33 minuti i flavonoli glicosidati e la ploridzina;
- tra i 33 e i 40 minuti i flavonoidi e l'acido cinnamico non sostituito.

Tempi di ritenzione e massimi di assorbimento degli acidi fenolici

Nome IUPAC	Nome comune	Tr	Max assorbimento (nm)
3,4,5-trihydroxybenzoic acid	Gallic acid	9.40	271
4-hydroxybenzoic acid		17.67	255
3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid	Vanillic acid	20.43	260,291
2,3,4-trihydroxybenzoic acid		14.80	222, 266
3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid	Caffeic acid	21,77	324
3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoic acid	Syringic acid	22.93	275
3-(4-hydroxyphenyl)-2-propenoic acid	4-coumaric acid	27.12	309, 228
3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoic acid	Ferulic acid	29.38	323, 238
3-(3-hydroxyphenyl)-2-propenoic acid	3-coumaric acid	29.87	278, 229
3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-2-propenoic acid	Sinapic acid	30.03	324,236
3-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-2-propenoic acid	isoferulic acid	31.30	325
2-hydroxybenzoic acid	Salicylic acid	31.97	236, 302
3-(2-hydroxyphenyl)-2-propenoic acid	2-coumaric acid	32.72	277, 325, 229
3-phenyl-2-propenoic acid	Cinnamic acid	40.03	277

Tempi di ritenzione e massimi di assorbimento dei flavonoidi

Nome IUPAC	Nome comune	Tempo di ritenzione (minuti)	Max Assorbimento (nm)
3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)chromenium	Malvidina aglicone 1	22,87	291
2-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)chromenylium-3,5,7-triol	Peonidina aglicone	23	291
3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)chromenium	Malvidina aglicone 2	23,35	275
(2S,3R,4S,5R,6R)-2-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-chromen-3-yl]oxy-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol	Cyanidina-3-o-glucoside	31,9	279
2-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)chromenylium-3,5,7-triol	Peonidin	36,43	278
3,5,7-trihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one	Myricetin	46,43	251, 230, 367
2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,7-dihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one	Fisetin	47,6	360, 221, 248
3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one	Kaempferol	55,67	245, 350
7-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one	Formononetin	57,83	248, 301
5-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-7-methoxy-4H-1-benzopyran-4-one	Prunetin	61,6	260

Tempi di ritenzione e massimi di assorbimento di altri composti fenolici esaminati

Nome IUPAC	Nome comune	Tempo di ritenzione (minuti)	Max assorbimento (nm)
cis,cis-4,8'-bi(3,3',4',5',7'-pentahydroxyflavane)	Procyanidin b2 (I)	19.6	226, 278, 355
5-[[5-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]oxy]-1,4,5-trihydroxycyclohexanecarboxylic acid	Chlorogenic acid	20.43	327, 248
(2R,3R)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol	Epicatechin	22.6	278, 356
4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde	Syringaldehyde	25.6	229, 308
[(2S,3S)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-chroman-3-yl] 3,4,5-trihydroxybenzoate	Epicatechin gallate	27.27	224, 277, 354
1-[2,4-dihydroxy-6-[(2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]-3-(4-hydroxyphenyl)propan-1-one	Phloridzin	35.82	285, 226
2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-chromen-4-one	Hyperoside	37.48	258, 358
2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-[(2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[[[(2R,3R,4R,5S,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyl-oxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxy-chromen-4-one	Rutin	37.87	258, 358
2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one	Quercitrin	40.9	258, 350

Al fine di validare il metodo cromatografico e quindi potere effettuare la quantificazione degli analiti, sono state costruite delle rette di taratura per ciascun analita preso in esame utilizzando 4 soluzioni standard a 0.1, 0.5, 1 e 5 mg/L. Nelle tabelle 9 e 10 sono riportati per ciascun composto i valori di R^2 e di LOD definiti in questa fase di validazione. Le deviazioni standard sono risultate inferiori a 0.1 per tutti gli analiti e l' R^2 calcolato è risultato sempre superiore a 0.99, tranne che per gli acidi 3,4- e 2,3,4- triidrossibenzoico che hanno rispettivamente un R^2 di 0.957 e 0.967. Il limite di rilevazione (L.O.D.) è stato inferiore o uguale a 0,1 mg/L per ogni analita (Tab.9).

R² e L.O.D. degli acidi fenolici

Nome IUPAC	Nome comune	R ²	L.O.D. (ppm)
3,4,5-trihydroxybenzoic acid	Gallic acid	0.994	0.1
4-hydroxybenzoic acid		1.000	0.1
3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid	Vanillic acid	1.000	0.1
2,3,4-trihydroxybenzoic acid		0.998	0.1
3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid	Caffeic acid	0.999	0.1
3,5-dimethoxy-4-hydroxybenzoic acid	Syringic acid	0.924	0.1
3-(4-hydroxyphenyl)-2-propenoic acid	4-coumaric acid	0.996	0.1
3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoic acid	Ferulic acid	1.000	0.1
3-(3-hydroxyphenyl)-2-propenoic acid	3-coumaric acid	0.996	0.1
3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-2-propenoic acid	Sinapic acid	1.000	0.1
3-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-2-propenoic acid	isoferulic acid	0.994	0.1
2-hydroxybenzoic acid	Salicylic acid	0,993	0.1
3-(2-hydroxyphenyl)-2-propenoic acid	2-coumaric acid	0.969	0.1
3-phenyl-2-propenoic acid	Cinnamic acid	1.000	0.1

R² e L.O.D. dei flavonoidi

Nome IUPAC	Nome comune	R ²	L.O.D. (ppm)
3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)chromenium	Malvidina aglicone 1	0,994	0.1
2-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)chromenylium-3,5,7-triol	Peonidina aglicone	21.2	0.1
3,5,7-trihidroxi-2-(4-idroxi-3,5-dimetossi-fenil)chromenium	Malvidina aglicone 2	0,994	0.1
(2S,3R,4S,5R,6R)-2-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-chromen-3-yl]oxy-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol	Cyanidina-3-o-glucoside	0,999	0.1
2-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)chromenylium-3,5,7-triol	Peonidin	0,993	0.1
3,5,7-trihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one	Myricetin	0,991	0.1
2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,7-dihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one	Fisetin	0,999	0.1
3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one	Kaempferol	0,998	0.1
7-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one	Formononetin	0,999	0.1
5-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-7-methoxy-4H-1-benzopyran-4-one	Prunetin	0,999	0.1

R² e L.O.D. degli altri composti fenolici esaminati

Nome IUPAC	Nome comune	R ²	L.O.D. (ppm)
cis,cis'-4,8'-bi(3,3',4',5,7-pentahydroxyflavane)	Procyanidin b2 (1)	0,995	0.1
5-[[5-(3,4-dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]oxy]-1,4,5-trihydroxycyclohexanecarboxylic acid	Chlorogenic acid	0,909	0.1
(2R,3R)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol	Epicatechin	0,986	0.1
4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde	Syringaldehyde	1,000	0.1
[(2S,3S)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-chroman-3-yl] 3,4,5-trihydroxybenzoate	Epicatechin gallate	1,000	0.1
1-[2,4-dihydroxy-6-[(2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]-3-(4-hydroxyphenyl)propan-1-one	Phloridzin	1,000	0.1
2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-4-one	Hyperoside	0,997	0.1
2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-[(2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[[[(2R,3R,4R,5S,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyl-oxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxychromen-4-one	Rutin	0,999	0.1
2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-1-benzopyran-4-one	Quercitrin	1,000	0.1

L'identificazione degli analiti è stata effettuata tramite il confronto con gli spettri dei composti puri preventivamente registrati. Sono stati confrontati i massimi e i minimi di assorbimento (con tolleranza ± 2 nm) e il livello di somiglianza (valore di similarità) degli spettri è stato fissato a un minimo di 0.9 per un'identificazione positiva dell'analita nel campione.

Per confermare i dati ottenuti mediante l'utilizzo dell'HPLC/DAD e per individuare eventuali analiti che il rivelatore DAD non fosse in grado di rilevare, i composti sono stati analizzati anche con un sistema HPLC accoppiato a uno spettrometro di massa (MS).

Per questo lavoro è stato utilizzato un sistema a gradiente con pompa binaria (Spectrasystem P2000, Thermo) in grado di separare gli analiti su una colonna apolare Luna Phenomenex C₁₈ (150 × 2.0 mm, 5 μm), dotata di precolonna, accoppiato ad uno spettrometro di massa con ionizzatore elettronico e analizzatore a trappola ionica.

Il flusso della fase mobile è stato impostato a 0,2 ml/min col campione è stato introdotto mediante valvola *Rheodyne*, utilizzando un *sampling loop* da 20 μl.

Al fine di avere la massima risposta strumentale ogni standard è stato infuso in maniera diretta all'interno del rivelatore ad un flusso di 18 μL/min e sono stati eseguiti i settaggi strumentali per ognuno di essi.

Tutti gli analiti sono stati analizzati in ionizzazione negativa (ESI(-)), osservando quindi lo ione molecolare diminuito di una unità. L'analisi è stata condotta in modalità S.I.M. (Single Ion Monitoring) cioè focalizzando lo strumento esclusivamente sul rapporto m/z dello ione ricercato. È stato inoltre osservato e registrato lo spettro di massa dei frammenti (ioni "figlio") generati dalla rottura dello ione principale (ione "genitore"). Tale frammentazione, chiamata spettro ms/ms o ms², è stata osservata per tutti gli analiti, ma nell'analisi solo alcuni sono stati identificati in tal modo.

È stato necessario impostare un valore di energia (energia di collisione) alla quale le molecole di analita subiscono frammentazione in maniera tale che lo ione 'genitore' venga frammentato per il 90%. È importante infatti, nel caso si utilizzi questa tecnica durante un'analisi, poter "seguire" l'andamento della rottura e poter valutare variazioni tra il segnale in S.I.M. e in ms².

Ogni analita ha una determinata massa, un proprio tempo di ritenzione e durante la frammentazione dà origine sempre agli stessi ioni. Per tanto in base al tempo di eluizione si è proceduto a suddividere l'acquisizione cromatografica in "segmenti" temporali, caratterizzati da differenti impostazioni strumentali specifiche. È stato quindi importante ottenere una buona separazione cromatografica per dividere l'analisi in "segmenti" e analizzare solo alcuni analiti.

L'analizzatore di massa lavora in maniera più riproducibile nel momento in cui deve eseguire il minor numero possibile di operazioni. La messa a punto del metodo cromatografico è stata eseguita tenendo conto di questo fatto, dividendo

quindi l'analisi in vari segmenti in ognuno dei quali sono stati eseguiti un massimo di 4 *scan* ripartiti tra S.I.M. e ms^2 e lasciando all'operatore di decidere se lavorare solo in modalità S.I.M. oppure, per avere un sicuro riconoscimento della molecola, anche in ms^2 .

È stato adottato un ulteriore accorgimento per migliorare la sensibilità e abbassare il rumore di fondo. Lo strumento è stato impostato in maniera da acquisire in modalità ms^2 soltanto lo spettro relativo agli ioni 'figlio' aumentando così la sensibilità e la ripetibilità del metodo. Tale impostazione, denominata S.R.M. (Single Reaction Monitoring) setta il rivelatore in maniera che si distinguano uno Ione Quantificatore (lo ione registrato in S.I.M.) il cui segnale serve per l'analisi quantitativa e uno Ione Qualificatore (lo ione registrato in S.R.M.) che ha lo scopo di dare la certezza della presenza o meno di un certo analita mediante lo studio dello spettro di frammentazione.

I solventi utilizzati per l'eluizione sono stati una miscela di acido formico in acqua (0,1/99,9 v/v, solvente A) e metanolo puro (solvente B).

La programmata della fase mobile (% di A in volume) è stata la seguente:

- fase di analisi
- 0 min 90% solvente A
- 5 min 80% solvente A
- 15 min 80% solvente A
- 20 min 60% solvente A
- 23 min 40% solvente A
- 35 min 40% solvente A
- 40 min 0% solvente A
- fase di lavaggio ed equilibratura
- 45 min 0% solvente A
- 50 min 90% solvente A
- 90 min 90% solvente A

Nella tabella sottostante sono riportati per i composti esaminati, il tempo di ritenzione, la massa molecolare (m/z), lo ione molecolare ($m/z-1$), gli ioni che si ottengono dalla frammentazione e l'energia di collisione ottimale applicata.

Nome IUPAC	Nome comune	Tempo di ritenzione (minuti)	Massa	m/z ESI (-)	ms^2 (m/z)	Energia di collisione (eV)
5-[[5-(3,4-Dihydroxyphenyl)-1-oxo-2-propenyl]oxy]-1,4,5-trihydroxycyclohexanecarboxylic acid	Chlorogenic acid	20,1	354,5	353,5	191,3; 179,3	23
[(2S,3S)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-chroman-3-yl] 3,4,5-trihydroxybenzoate	Epicatechin gallate	29,1	442,6	441,6	331,3; 289,3; 397,3; 193,5	26
2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-[(2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[[[(2R,3R,4R,5S,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyl-oxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxy-chromen-4-one	Rutin	30,8	610,5	609,5	301,2; 343,4; 271,5; 591,3	29
2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-chromen-4-one	Hyperoside	30,9	464,5	463,5	271,6; 255,6; 228,6	28
1-[2,4-dihydroxy-6-[(2S,3R,4S,5R,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxy-phenyl]-3-(4-hydroxyphenyl)propan-1-one	Phloridzin	31,3	436,2	435,2	273,4	29
2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3-[(2S,3R,4R,5S,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyl-oxan-2-yl]oxy-chromen-4-one	Quercitrin	31,8	448,7	447,7	301,3; 343,4	26

Sono riportate di seguito le impostazioni strumentali e le molecole analizzate dallo spettrometro di massa.

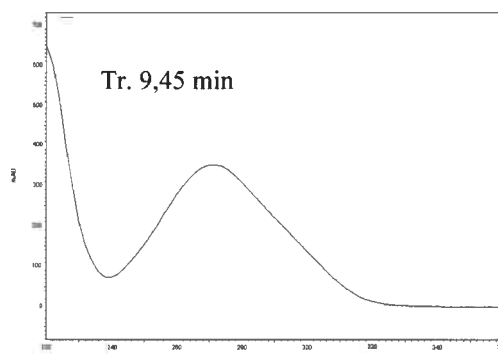
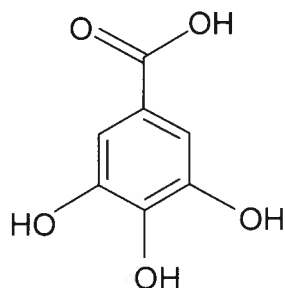
Segmento	Durata (minuti)	Tuning	n° scan event	Scan event	Molecola	Tempo di ritenzione (minuti)
1	17,9	ac. gallico	2	a	fullscan 120-240	acidi fenolici
				b	S.I.M.: 169,3	ac. gallico/ ac. 2,3,4-triidrossibenzoico
2	7,1	ac. clorogenico	2	a	S.I.M.: 353,5	ac. clorogenico
				b	ms ² @ 353,5 --> fullscan	ac. clorogenico
3	4,8	epicatechina gallato	2	a	S.I.M.: 441,5	epicatechina gallato
				b	ms ² @ 441,5 --> fullscan	epicatechina gallato
4	10	ploridzina	1	S.I.M.: 435,2; 447,5; 463,5; 609,5	ploridzina; quercitrina; iperoside; rutina	31,3; 31,8; 30,9; 30,8

La separazione cromatografica per la ploridzina, la quercitrina, l'iperoside e la rutina non è stata completa valle - valle a causa della loro somiglianza strutturale.

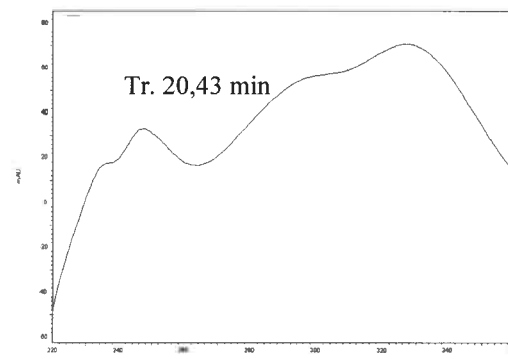
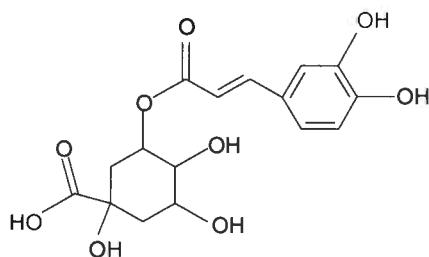
L'identificazione dei composti fenolici rilevati nei campioni di patata è stata effettuata tramite il confronto con gli spettri dei composti puri preventivamente registrati. Sono stati infatti comparati i massimi e i minimi di assorbimento con una tolleranza di ± 2 nm e, per una identificazione positiva dell'analita nel campione, il livello di somiglianza (valore di "Similarità") degli spettri è stato fissato a un minimo di 0,9.

Nei 20 campioni di patate sono stati identificati, 6 composti fenolici. Di seguito sono riportati le formule chimiche, il tempo di ritenzione e gli spettri di assorbimento dei composti identificati.

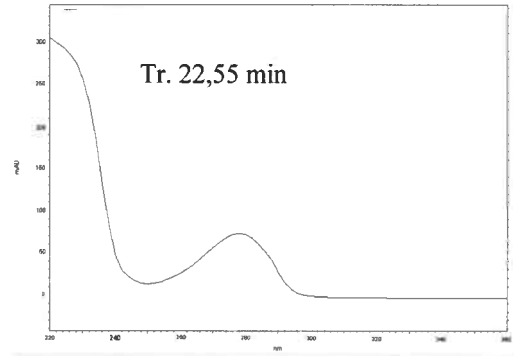
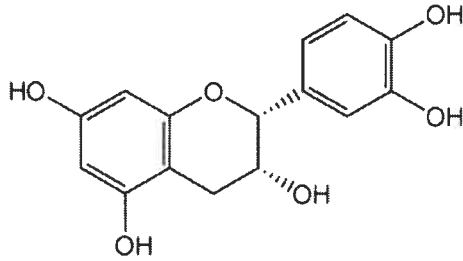
acido gallico



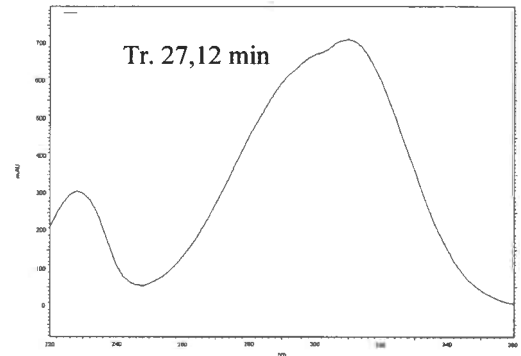
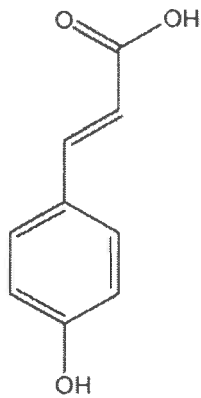
acido clorogenico



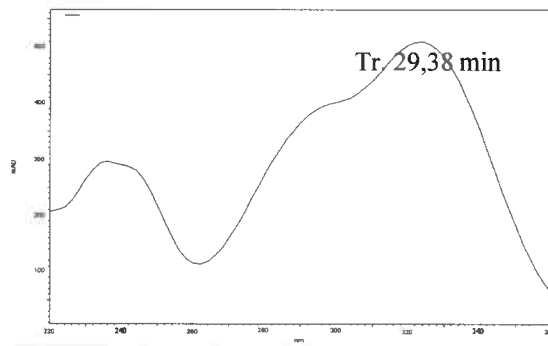
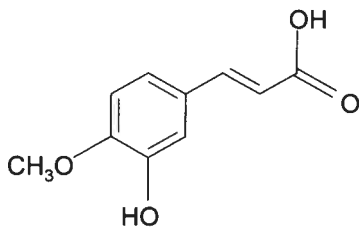
epicatechina



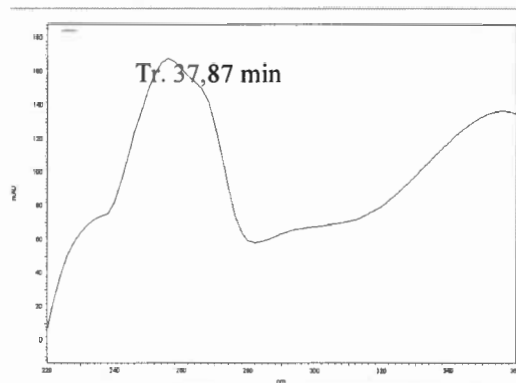
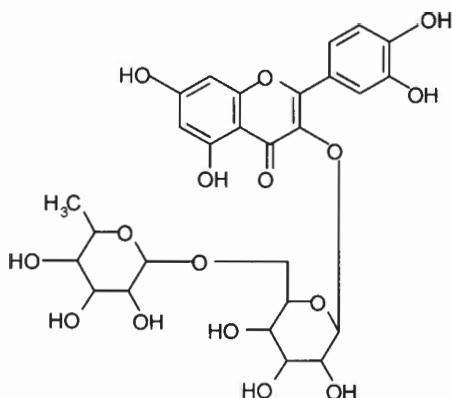
acido 4-cumarico



acido isoferulico



rutina



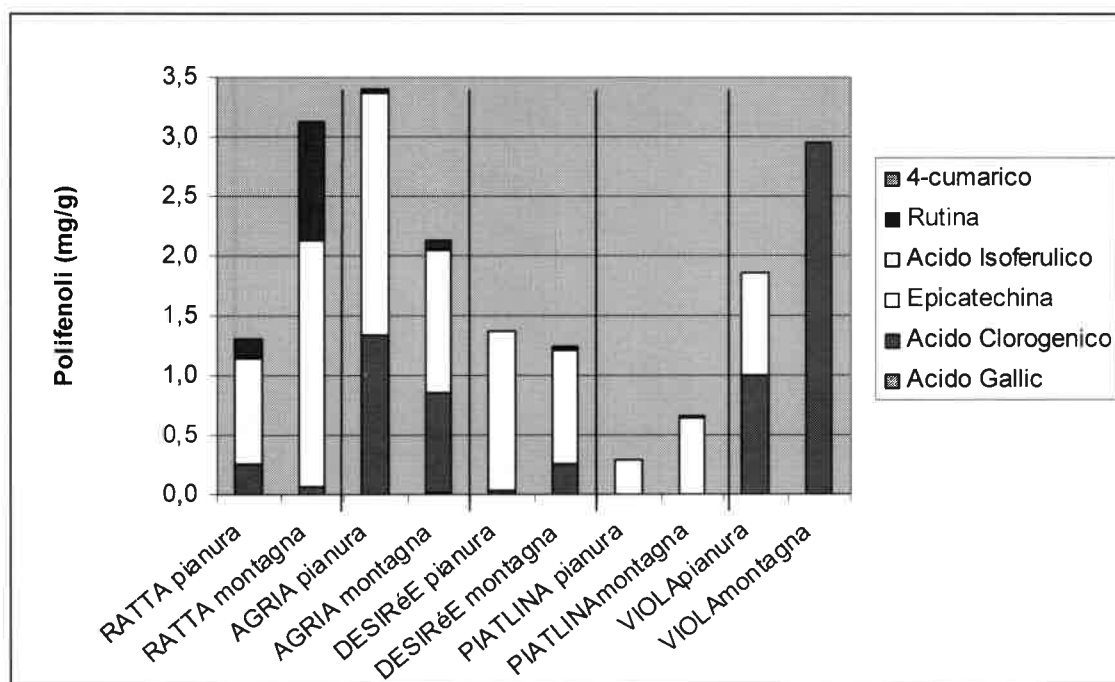
Nella tabella seguente sono riportate le concentrazioni medie espresse in mg/g di liofilizzato estratto con acetone/H₂O, dei composti fenolici rilevati e le relative deviazioni standard determinate mediante l'uso L'HPLC/DAD

Concentrazione medie (mg/g di liofilizzato) e relative deviazioni standard dei composti polifenolici identificati nelle cinque *cultivar* di patate esaminate ed estratte con una miscela acetone/acqua

	AGRIA				DESIRÉE			
	CONDOVE		SAUZE D'OULX		CONDOVE		SAUZE D'OULX	
	media	dev. std.	media	dev. std.	media	dev. std.	media	dev. std.
acido gallico	0,0002	0,0003	0,0082	0,0115	< L.O.D.	-	< L.O.D.	-
acido clorogenico	1,3370	0,0081	0,8400	0,2160	0,0278	0,0311	0,2617	0,0104
epicatechina	2,0269	0,1817	1,1976	0,0196	1,3371	0,3912	0,9553	0,1914
acido isoferulico	< L.O.D.	-	0,0112	0,0006	< L.O.D.	-	0,0120	0,0026
rutina	0,0335	0,0003	0,0715	0,0053	< L.O.D.	-	0,0145	0,0010
acido 4-cumarico	< L.O.D.	-	0,0069	0,0001	< L.O.D.	-	< L.O.D.	-
TOT	3,3974		2,1355		1,3648		1,2435	
	PIATLINA				RATTA			
	CONDOVE		SAUZE D'OULX		CONDOVE		SAUZE D'OULX	
	media	dev. std.	media	dev. std.	media	dev. std.	media	dev. std.
acido gallico	< L.O.D.	-	< L.O.D.	-	< L.O.D.	-	< L.O.D.	-
acido clorogenico	< L.O.D.	-	0,0131	0,0071	0,2602	0,3680	0,0640	0,0905
epicatechina	0,2885	0,0937	0,6436	0,0192	0,8906	0,2434	2,0576	0,3094
acido isoferulico	< L.O.D.	-	0,0118	0,0012	0,0028	0,0038	0,0101	0,0016
rutina	< L.O.D.	-	< L.O.D.	-	0,1604	0,0124	0,9949	0,1544
acido 4-cumarico	< L.O.D.	-	< L.O.D.	-	< L.O.D.	-	< L.O.D.	-
TOT	0,2885		0,6685		1,3140		3,1266	
	VIOLA							
	CONDOVE		SAUZE D'OULX					
	media	dev. std.	media	dev. std.				
acido gallico	< L.O.D.	-	< L.O.D.	-				
acido clorogenico	0,9950	0,9950	2,9518	3,5599				
epicatechina	0,8591	0,0031	< L.O.D.	-				
acido isoferulico	< L.O.D.	-	< L.O.D.	-				
rutina	< L.O.D.	-	< L.O.D.	-				
acido 4-cumarico	< L.O.D.	-	< L.O.D.	-				
TOT	1,8541		2,9518					

Tranne che per Agria e Desirée si può notare come i componenti polifenolici siano maggiori nelle patate provenienti dal sito di montagna. In generale però è la *cv* Viola ad evidenziare il maggior contenuto polifenolico rispetto alle altre varietà prese in esame, in linea con quanto osservato con il test di Folin-Ciocalteu..

Nella figura sottostante, sono riportate le concentrazioni medie dei singoli polifenoli nelle cinque *cultivar* estratte con acetone/H₂O per ciascuno dei due siti.



Si evidenzia la differenza composizionale della frazione polifenolica che caratterizza ogni singola varietà in relazione al sito di provenienza.

La *cultivar* Viola è ad esempio caratterizzata da una quantità maggiore, rispetto alle altre prese in esame, di acido Clorogenico.

La Desirée invece è caratterizzata da una predominanza di Epicatechina, mentre la Ratta ha un notevole contenuto di Rutina.

L'analisi della varianza fattoriale eseguita per alcuni dei composti fenolici rilevati mediante HPLC/DAD negli estratti con la miscela etanolo/H₂O evidenziano che l'acido Clorogenico non risulta significativamente differente né tra i siti né tra le varietà. Per quanto riguarda la Rutina invece si può notare una differenza altamente significativa sia fra i siti di produzione sia fra le varietà. L'acido Isoferulico invece presenta differenza altamente significative sia rispetto sia rispetto al sito di produzione sia rispetto alle *cultivar*, così come la loro interazione.

Per ciò che concerne il contenuto di Epicatechina, questo non risulta significativamente differente fra i siti di produzione mentre presenta una differenza altamente significativa fra le varietà oggetto di analisi.

Risultati dell'analisi della varianza fattoriale eseguita per alcuni dei composti fenolici rilevati con l'HPLC/DAD nei campioni estratti con la miscela acetone/H₂O

	ac. Clorogenico	Epicatechina	ac. Isoferulico	Rutina
Sito	n.s.	n.s.	***	***
cv	n.s.	***	***	***
Interazione	n.s.	***	**	***

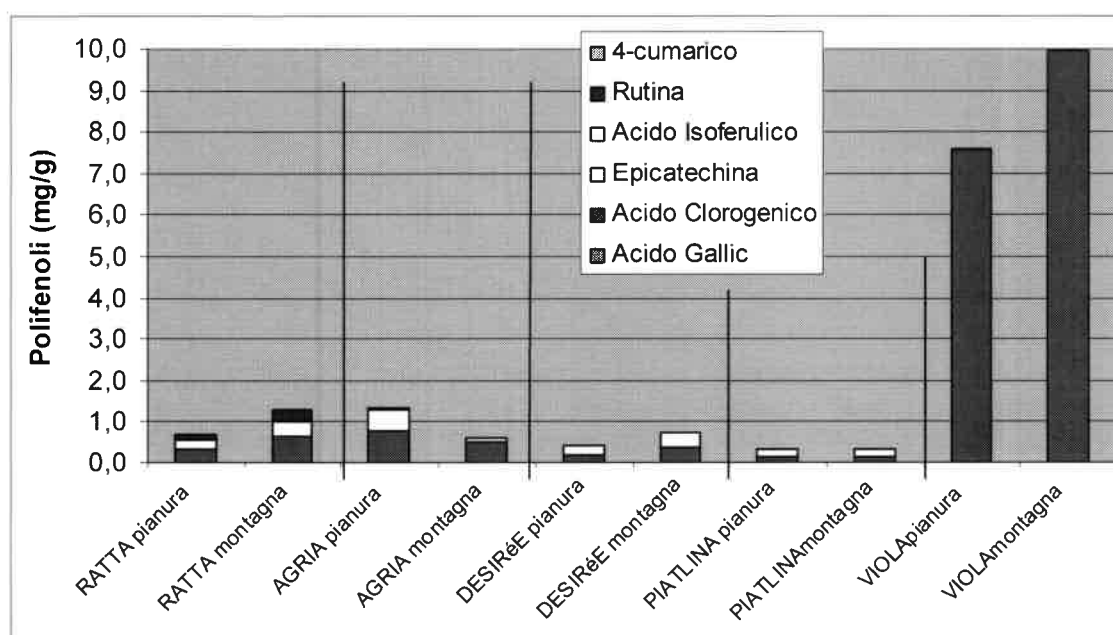
(* P < 0,05; **P < 0.01; *** P < 0.001; n. s. = non significativo)

Nella tabella seguente sono riportate invece le concentrazioni medie in mg/g dei composti fenolici rilevati nelle patate, utilizzando quale solvente estraente una miscela di etanolo/H₂O, relative ai due siti di coltura ed ottenute mediante HPLC/DAD.

Contenuti medi (mg/g di liofilizzato) in polifenoli identificati nelle cinque *cultivar* patate esaminate ed estratte con una miscela etanolo/acqua

	AGRIA				DESIRÉE			
	CONDOVE		SAUZE D'OULX		CONDOVE		SAUZE D'OULX	
	media	dev. std.	media	dev. std.	media	dev. std.	media	dev. std.
acido gallico	< L.O.D.	-	< L.O.D.	-	< L.O.D.	-	< L.O.D.	-
acido clorogenico	0,7886	0,0828	0,4877	0,0026	0,1811	0,2562	0,3630	0,0101
epicatechina	0,5304	0,0193	0,0923	0,0051	0,2513	0,3554	0,3775	0,0007
acido isoferulico	0,0001	-	0,0017	0,0001	< L.O.D.	-	0,0019	-
rutina	0,0109	0,0006	0,0286	0,0011	0,0003	0,0004	< L.O.D.	-
acido 4-cumarico	< L.O.D.	-	< L.O.D.	-	< L.O.D.	-	< L.O.D.	-
TOT	1,3299		0,6103		0,4327		0,7424	
	PIATLINA				RATTA			
	CONDOVE		SAUZE D'OULX		CONDOVE		SAUZE D'OULX	
	media	dev. std.	media	dev. std.	media	dev. std.	media	dev. std.
acido gallico	< L.O.D.	-	< L.O.D.	-	0,0134	0,0016	< L.O.D.	-
acido clorogenico	0,0607	0,0858	0,1444	0,0089	0,2920	0,0413	0,6335	0,0474
epicatechina	0,0900	0,1273	0,1975	0,0193	0,2579	0,0098	0,3774	0,0494
acido isoferulico	< L.O.D.	-	0,0028	0,0006	< L.O.D.	-	< L.O.D.	-
rutina	< L.O.D.	-	< L.O.D.	-	0,1141	0,0773	0,2654	0,0077
acido 4-cumarico	< L.O.D.	-	< L.O.D.	-	< L.O.D.	-	< L.O.D.	-
TOT	0,1507		0,3446		0,6639		1,2764	
	VIOLA							
	CONDOVE		SAUZE D'OULX					
	media	dev. std.	media	dev. std.				
acido gallico	< L.O.D.	-	< L.O.D.	-				
acido clorogenico	7,6066	0,0093	9,9637	0,0746				
epicatechina	< L.O.D.	-	< L.O.D.	-				
acido isoferulico	< L.O.D.	-	< L.O.D.	-				
rutina	< L.O.D.	-	< L.O.D.	-				
acido 4-cumarico	< L.O.D.	-	< L.O.D.	-				
TOT	7,6066		9,9637					

E' da evidenziare il minor potere estraente dell'etanolo in confronto con quello dell'acetone. Fra le *cultivar* la varietà Viola ha comunque sempre un contenuto polifenolico nettamente superiore rispetto alle altre varietà prese in esame. I risultati relativi alla *cv* Agria presentano una concentrazione polifenolica relativa al sito di pianura superiore a quello relativo al sito di montagna. Per quanto riguarda la *cv* Piatlina, la differenza tra i due siti è pressoché minima. La *cv* Desirée e la *cv* Ratta presentano invece un contenuto fenolico superiore nei prodotti provenienti dalla montagna. Nel grafico seguente sono riportate le concentrazioni dei singoli polifenoli nelle cinque *cultivar* estratte con etanolo/H₂O per ciascuno dei due siti.



E' interessante rilevare che la componente polifenolica ottenuta con etanolo della *cv* Viola a differenza delle altre *cultivar* è costituita da solo acido Clorogenico.

L'analisi della varianza fattoriale eseguita anche in questo caso per alcuni dei composti fenolici rilevati mediante HPLC/DAD negli estratti con la miscela etanolo/H₂O evidenziano che l'acido Clorogenico, l'acido Isoferulico e la Rutina presentano differenze significative sia fra i siti di produzione sia fra le *cultivar*. Per quanto riguarda l'Epicatechina si ha una differenza significativa solo a livello di *cultivar*, mentre non si hanno differenze significative rispetto al sito di produzione.

Risultati dell'analisi della varianza fattoriale eseguita per alcuni dei composti fenolici rilevati con l'HPLC/DAD nei campioni estratti con la miscela etanolo/H₂O

	ac. Clorogenico	Epicatechina	ac. Isoferulico	Rutina
Sito	***	n.S.	***	*
<i>cv</i>	***	*	***	***
Interazione	***	*	**	**

(* P < 0,05; ** P < 0.01; *** P < 0.001; n. s. = non significativo)

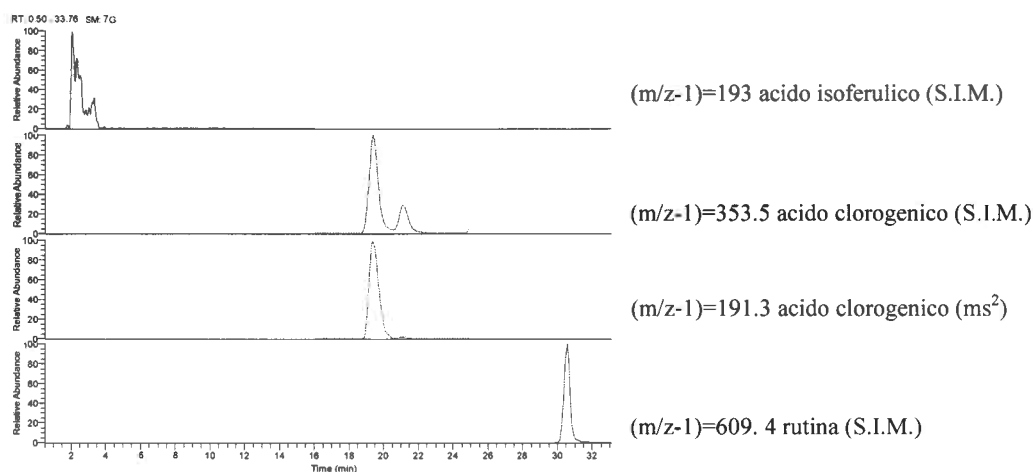
Per confermare l'identità dei composti individuati con l'HPLC/DAD si è proceduto ad analizzare alcuni campioni anche con l'HPLC/MS, sia in modalità S.I.M. che in ms².

Sono stati confrontati gli spettri di massa degli analiti presenti nei campioni analizzati con i dati relativi ai 32 standard puri preventivamente registrati.

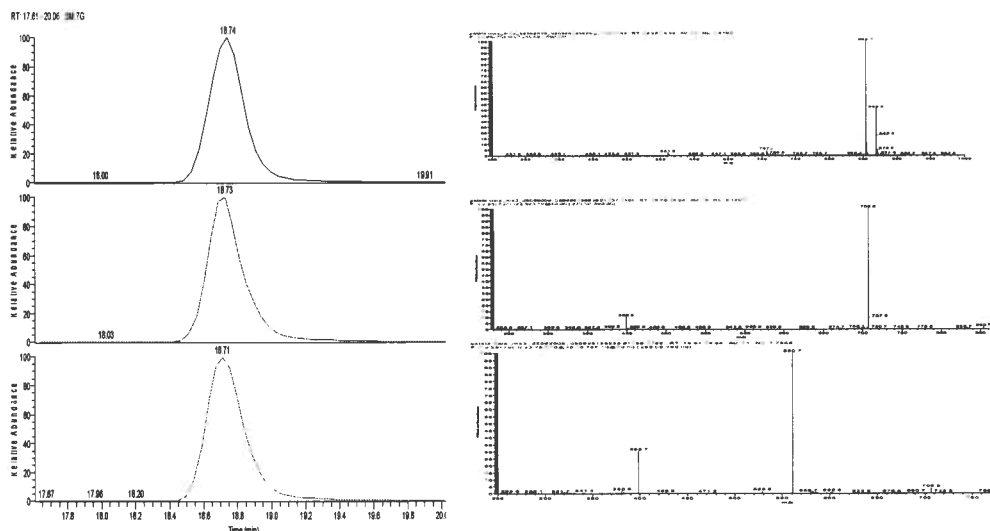
In questo modo si ha avuto una comparazione simultanea di differenti dati: tempo di ritenzione, rilevazione dello ione molecolare (S.I.M.) e degli ioni frammento (ms²).

Per una corretta identificazione degli analiti sia nelle soluzioni standard sia nei campioni reali, il rapporto Area (S.I.M.) / Area (ms²) deve rimanere sempre costante.

La sensibilità dell'HPLC/MS per molti analiti si è rivelata decisamente superiore a quella riscontrata con il DAD. Ciò ha permesso di individuare oltre ai 6 composti identificati in precedenza anche una molecola complessa composta da un'antocianidina glucosilata, responsabile della pigmentazione violacea della *cv* Viola, non rilevabile con l'altra metodica.



Cromatogrammi dei composti fenolici individuati con l'HPLC/MS: si riconosce il picco relativo allo ione molecolare dell'acido Isoferulico (m/z=193), dell'acido Clorogenico e del suo frammento (m/z = 191,3), della Rutina (m/z=609.4)



Picchi cromatografici e di massa relativi alla frammentazione del composto responsabile della pigmentazione della cv Viola.

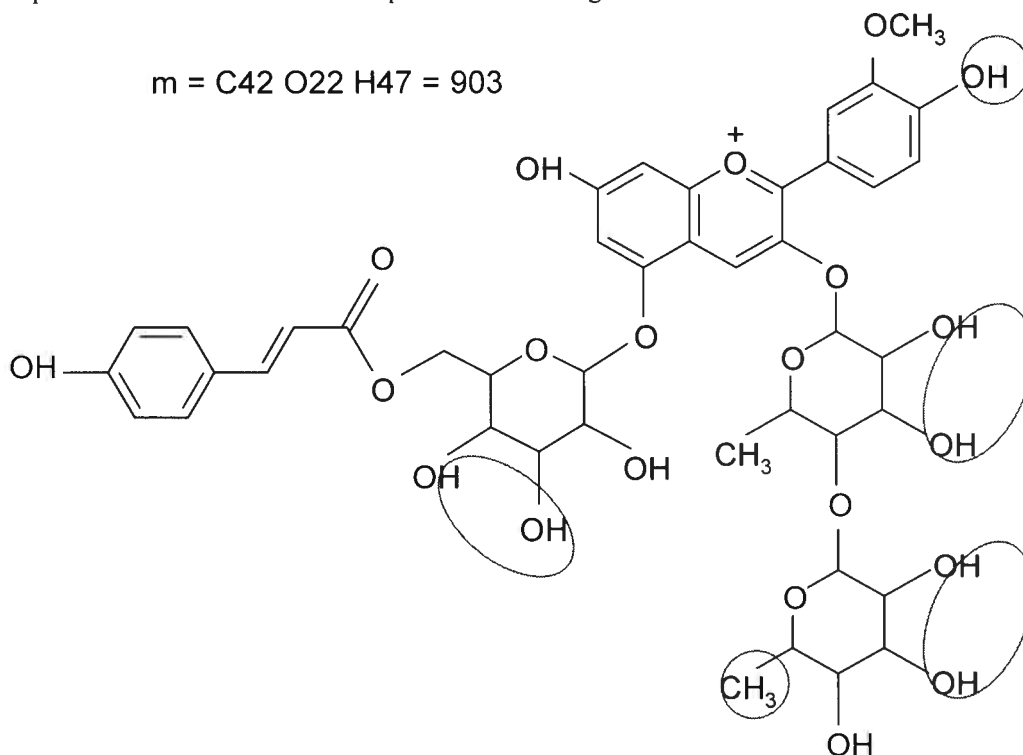
Lo screening dei composti fenolici presenti nelle patate non poteva però essere completo senza l'identificazione della molecola responsabile della netta colorazione viola della cultivar viola.

E' stata quindi condotta una ricerca bibliografica preliminare in cui veniva più volte da vari autori indicata come responsabile della pigmentazione dei tuberi a tonalità viola, una molecola complessa composta da un'antocianidina glucosilata in 2 posizioni, con un residuo di acido fenolico legato ad uno degli zuccheri.

E' stato perciò utilizzato lo spettrometro di massa in modalità fullscan per cercare di ottenere informazioni inerenti la massa molecolare della molecola ed eventualmente quella dei suoi frammenti.

Da questo tipo di analisi si evince una probabile struttura molecolare complessa formata da un'antocianidina, (Peonidina) a cui è legato un residuo complesso formato da monosaccaridi e acido 4-cumarico.

La probabile struttura molecolare è quella indicata in figura.



Valutazione dell'attività antiossidante

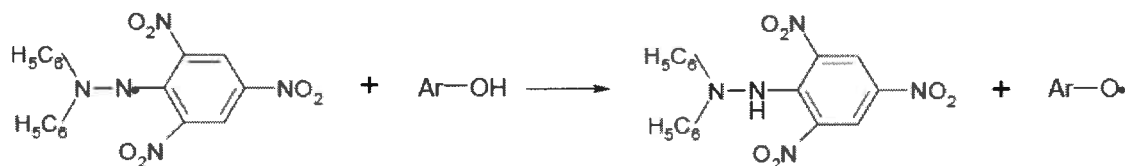
In questo lavoro sono stati utilizzati due test per la valutazione dell'attività antiossidante delle patate.

Test DPPH

Il DPPH' (2,2-difenil-1-picrilidrazile) è uno dei radicali organici azotati più stabili e di facile utilizzo. Disponibile in commercio già nella forma radicalica, è caratterizzato da una tipica colorazione viola porpora e da un massimo di assorbimento alla lunghezza d'onda di 515 nm. Viene solitamente usato per testare la capacità di alcuni composti di agire come *scavengers* di radicali liberi. Infatti, a seguito della reazione di riduzione del radicale DPPH' ad opera di un antiossidante, si osserva una progressiva decolorazione della soluzione radicalica che viene normalmente monitorata spettrofotometricamente.

Il test è stato condotto seguendo il metodo riportato in bibliografia. È stata quindi preparata una soluzione metanolica del radicale DPPH' (6×10^{-5} M) e per minimizzare la perdita di attività del radicale la soluzione è stata mantenuta il più possibile al buio. Successivamente, in una cuvetta monouso in polistirene, a 3 mL della soluzione radicalica sono stati aggiunti 75 μ L del campione da testare. Dopo agitazione la miscela è stata fatta reagire, a temperatura ambiente, per 60 min, tempo al quale si raggiunge una condizione stazionaria. Trascorso il tempo di reazione la cuvetta è stata posta all'interno dello spettrofotometro, ed è stata quindi effettuata la lettura dell'assorbanza a 515 nm, utilizzando quale bianco una miscela costituita da 3 mL di metanolo e 75 μ L di campione, questo al fine di annullare l'effetto assorbanza dello stesso. Per ciascuna delle due repliche estrattive sono state condotte tre misurazioni.

Reazione di decolorazione del radicale DPPH'



Radicale DPPH' (porpora)

Radicale DPPH' stabile (giallo)

È stata quindi determinata la percentuale di inibizione (IP) del radicale DPPH' allo stato stazionario secondo la formula

$$IP = [(ABS_{0min} - ABS_{60min}) / ABS_{0min}] * 100$$

La percentuale di inibizione del radicale si può ritenere proporzionale alla concentrazione dei composti antiossidanti presenti nel campione analizzato.

Nella seguente tabella sono riportati i risultati del test dell'attività antiradicalica. I risultati sono espressi come percentuale di inibizione del radicale, alla concentrazione di 0,1 g/mL di estratto analizzato. Di conseguenza, maggiore è questo valore, maggiore è l'attività antiossidante e viceversa.

Valori medi e relative deviazioni standard della percentuale di inibizione del DPPH' calcolato in funzione del sito e della miscela estraente per le cinque varietà di patate esaminate

	Etanolo/H ₂ O (80/20 v/v)				Acetone/H ₂ O (50/50 v/v)			
	CONDOVE		SAUZE D'OULX		CONDOVE		SAUZE D'OULX	
	MEDIA	DEV. STD.	MEDIA	DEV. STD.	MEDIA	DEV. STD.	MEDIA	DEV. STD.
AGRIA	50,3994	5,1186	37,3075	1,6539	77,5247	4,0777	48,7895	5,6758
DESIR&E	56,9194	2,8186	46,4404	1,2693	48,1976	3,1812	78,9392	1,2694
PIATLINA	17,0212	3,1053	29,3115	1,8381	36,4298	4,2773	29,7821	1,5353
RATTA	46,0355	5,3295	60,8704	1,8822	48,5891	5,8045	45,6438	1,1362
VIOLA	96,3253	1,0572	95,9050	0,0932	98,1619	4,5752	89,6202	1,3747

E' evidente che la cv Viola presenti un'attività antiradicalica nettamente superiore alle altre prese in esame, sia che essa provenga dal sito di pianura che da quello di montagna.

In genere l'attività antiossidante risulta superiore nei campioni provenienti dal sito di pianura, ed è correlato al quantitativo di sostanze polifenoliche in essi esaminati.

Così come per il contenuto in polifenoli, anche in questo caso, la miscela acetone:H₂O evidenzia la maggiore capacità estraente.

L'analisi della varianza fattoriale eseguita sui valori di DPPH' evidenzia che la miscela acetone/H₂O presenta differenze significative sia tra le varietà che tra i siti mentre la miscela etanolo/H₂O presenta invece differenze significativa solo fra le varietà indipendentemente dal sito di produzione.

Risultati dell'analisi della varianza fattoriale eseguita per le due miscele estraenti per i valori di DPPH'

	acetone/H ₂ O	etanolo/H ₂ O
Sito	**	n.s.
cv	***	***
Interazione	***	***

(* P < 0,05; ** P < 0.01; *** P < 0.001; n. s. = non significativo)

Test TEAC (Trolox Equivalence Antioxidant Capacity)

Questo saggio viene utilizzato per la misura dell'attività antiossidante totale di sostanze pure, fluidi biologici e composti vegetali ed è basato sulla reazione degli antiossidanti con il radicale cationico ABTS^{•+} (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato)). Questo radicale, a differenza del DPPH', è metastabile e deve essere generato appena prima dell'esperimento. Per fare ciò l'ABTS viene disciolto in acqua ultrapura alla concentrazione finale di 7 mM. Il catione radicalico ABTS^{•+} viene prodotto facendo reagire la soluzione *stock* con una soluzione di persolfato di potassio (concentrazione finale 2,5 mM). La miscela viene fatta reagire per 12-16 h, al buio e a temperatura ambiente. In questa forma il radicale è stabile per non più di 2 giorni. Quando impiegato nel saggio della capacità antiossidante di estratti ottenuti da matrici alimentari, la soluzione del radicale ABTS^{•+} viene diluita con etanolo sino ad ottenere una assorbanza pari a 0,70 nm (± 0,02), misurata alla lunghezza d'onda di 734 nm e dopo stabilizzazione della soluzione radicalica a 30 °C per almeno 30'.

Appurata l'idoneità del radicale è possibile procedere all'analisi dei campioni. Quindi nello specifico, in una cuvetta monouso in polistirene a 3 mL di ABTS^{•+} diluito sono stati aggiunti 30 µl di campione (o di acqua ultrapura per il bianco) ed è stata effettuata una prima lettura dell'assorbanza (A) a λ 734 nm (t₀). La miscela è stata poi fatta reagire per 6' in cella termostata a 30 °C e al buio. Trascorso tale tempo è stata nuovamente effettuata una lettura dell'assorbanza(A) a λ 734 nm (t₁). La misurazione è stata espressa come rapporto tra la lettura del bianco e la lettura del campione termostato, a definire la percentuale di inibizione del radicale secondo la formula:

$$\% \text{ inibizione} = 1 - (\text{ABS}_{734\text{C}} / \text{ABS}_{734\text{B}}) * 100$$

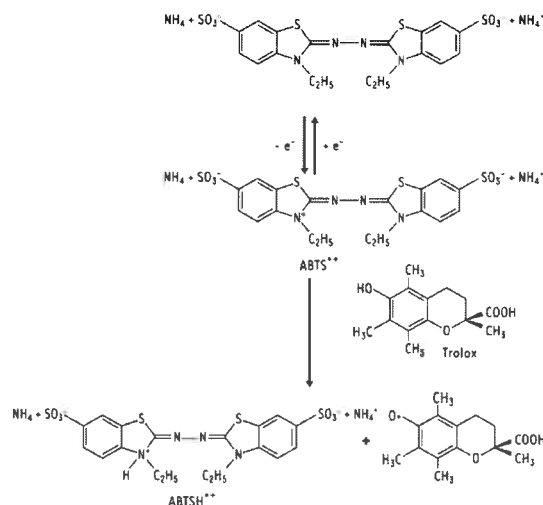
in cui:

C = campione

B = bianco

L'attività antiossidante del campione è stata calcolata rispetto a quella di un antiossidante di riferimento utilizzato nelle stesse condizioni. Come antiossidante standard è stato utilizzato il Trolox[®], un analogo idrosolubile della vitamina E, con il quale è stata ricavata una curva di calibrazione in un *range* di concentrazione di 0 – 350 µM/L. L'attività antiossidante è stata infatti espressa come TEAC (Trolox Equivalence Antioxidant Capacity); i valori sono stati espressi come µM equivalenti di Trolox * g⁻¹ di campione (µM TE/g)

Formazione del radicale cationico ABTS^{•+} e reazione con Trolox



Nella tabella seguente sono riportati i risultati del test TEAC eseguito sui campioni di patate esaminate (Tab.24). I risultati sono espressi come i concentrazioni in μM di una soluzione di Trolox che ha capacità antiossidante equivalente a una soluzione $1\mu\text{M}$ della sostanza sotto esame (TEAC). Questo test fornisce una misura della capacità *scavenger* verso i radicali perossidici generati dalla decomposizione a 37°C del radicale cationico $\text{ABTS}^{\bullet+}$.

Valori medi e relative deviazioni standard di Trolox equivalenti per le cinque cultivar esaminate in funzione del sito di coltura e della soluzione estraente

	Etanolo/H ₂ O (80/20 v/v)				Acetone/H ₂ O (50/50 v/v)			
	CONDOVE		SAUZE D'OULX		CONDOVE		SAUZE D'OULX	
	MEDIA	DEV. STD.	MEDIA	DEV. STD.	MEDIA	DEV. STD.	MEDIA	DEV. STD.
AGRIA	6,4159	0,6776	3,8967	0,1439	11,2325	0,7630	8,0781	0,5003
DESIR&E	5,7469	0,3409	4,8154	0,1749	8,6644	1,1994	9,9238	0,3976
PIATLINA	4,0212	0,5567	3,9596	0,7610	9,7452	0,7027	6,0464	0,3598
RATTA	5,0402	0,2191	6,1375	0,1896	8,4539	1,2495	8,8334	0,2282
VIOLA	11,1388	0,1095	6,5796	0,1735	10,2372	1,8470	10,9158	0,3404

Anche in questo caso la *cv* Viola presenta un'attività antiradicalica nettamente superiore alle altre *cv* prese in esame, sia che essa provenga dal sito di pianura che da quello di montagna. Nei campioni di pianura, l'attività antiossidante risulta inferiore rispetto a quelli provenienti dalla montagna, a parte nel caso anomalo della *cv* Ratta, anomalia già riscontrata nel precedente test. L'analisi della varianza fattoriale eseguita per i valori ottenuti con il test di $\text{ABTS}^{\bullet+}$ evidenzia che entrambe le miscele testate presentano differenze altamente significative sia in base al sito di produzione, che alla varietà e così è anche per la loro interazione.

Risultati dell'analisi della varianza fattoriale eseguita per le due miscele estraenti per i valori di $\text{ABTS}^{\bullet+}$

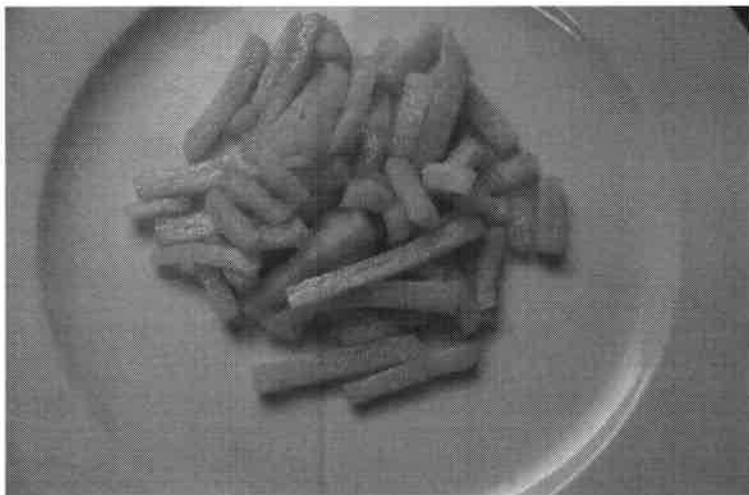
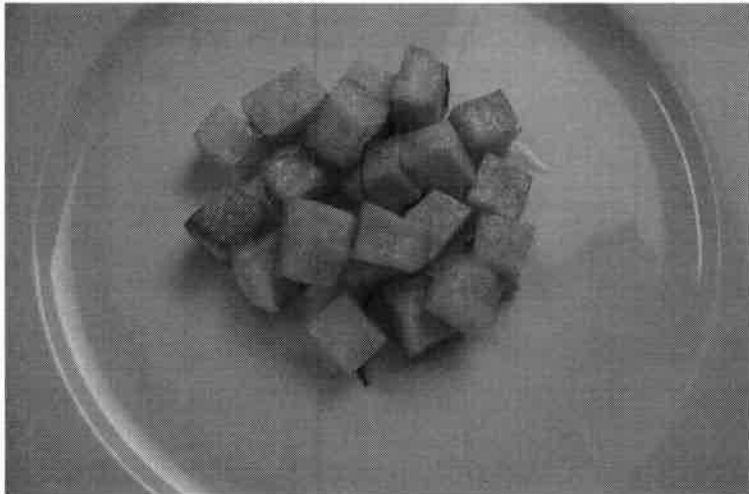
	acetone/H ₂ O	etanolo/H ₂ O
Sito	***	***
cv	***	***
Interazione	***	***

(* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; n. s. = non significativo)

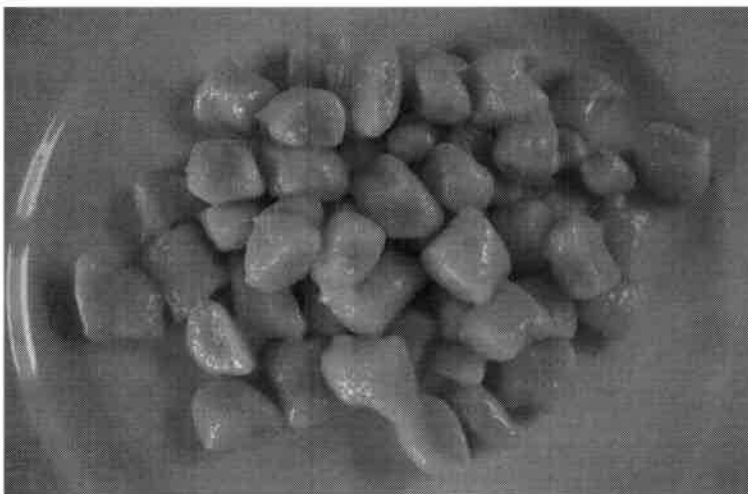
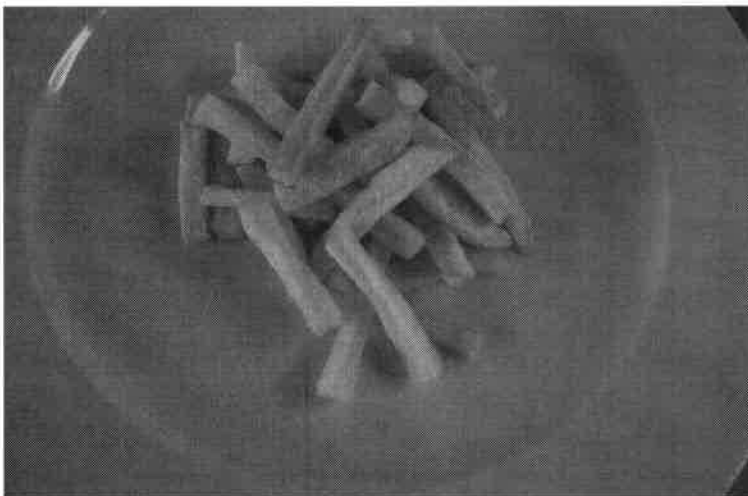
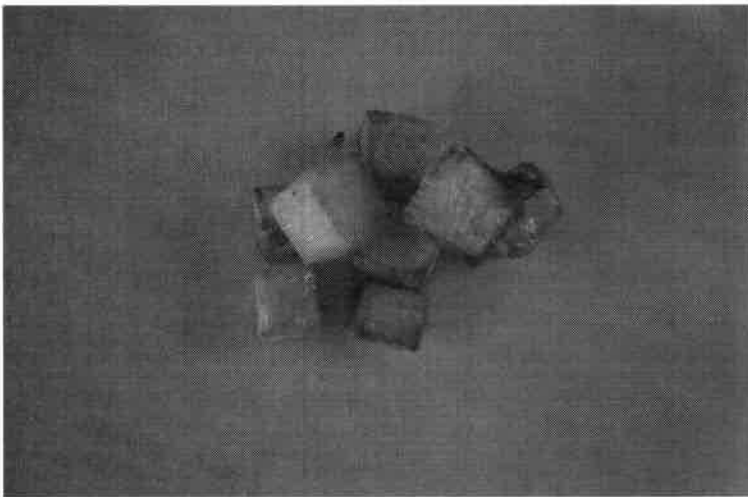
Allegato 1

Sito di Condove

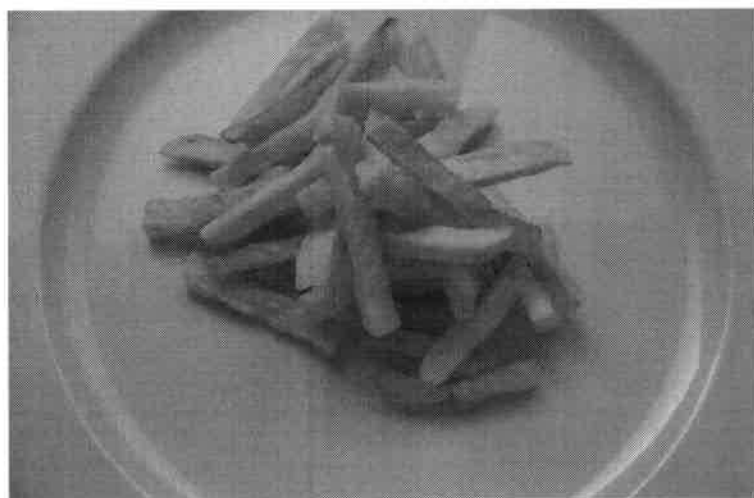
Agria



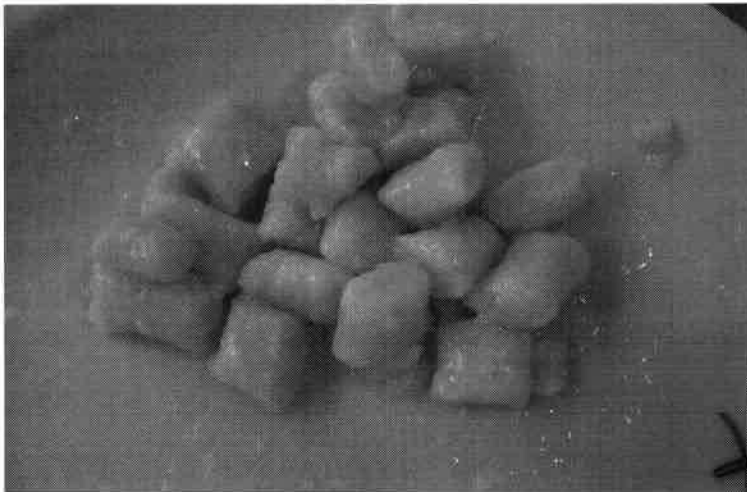
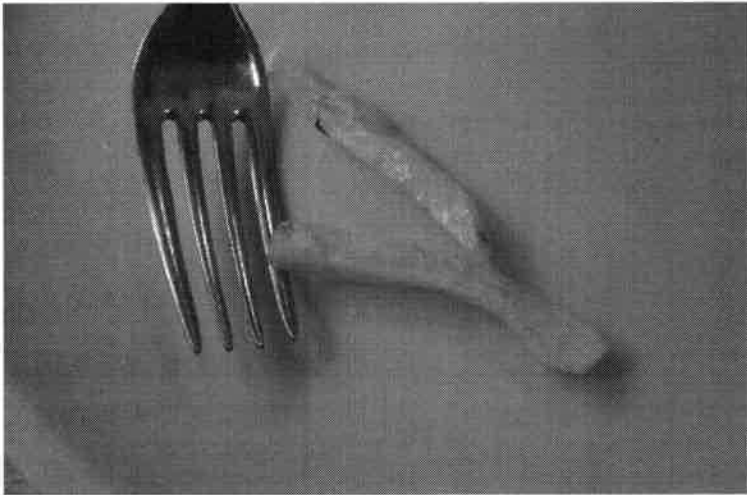
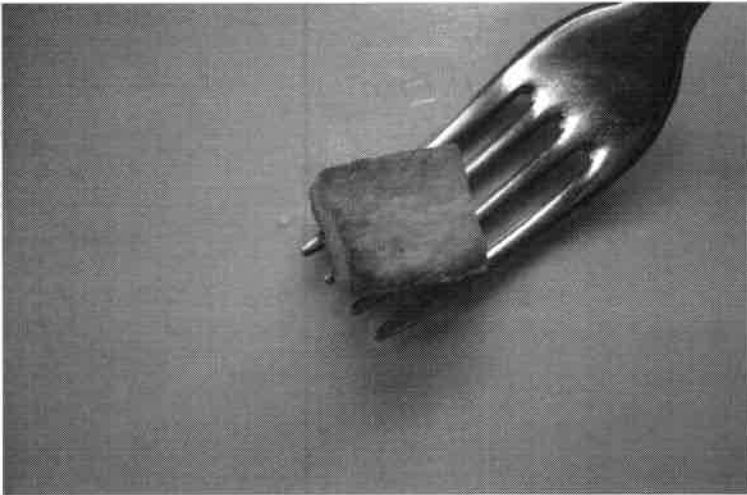
Desirée



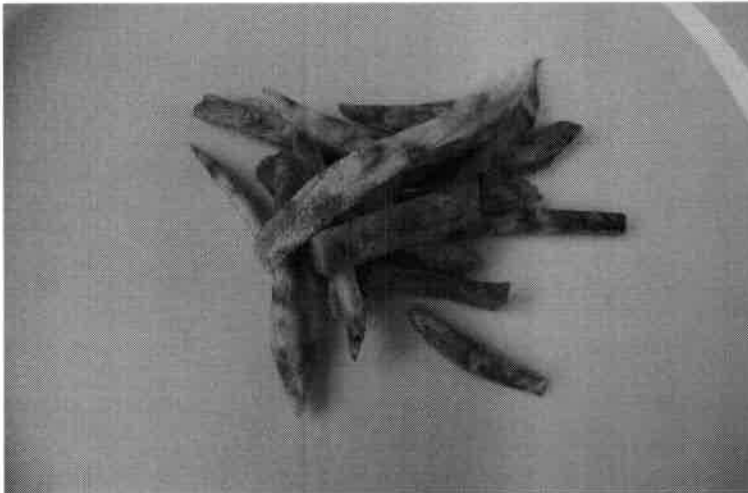
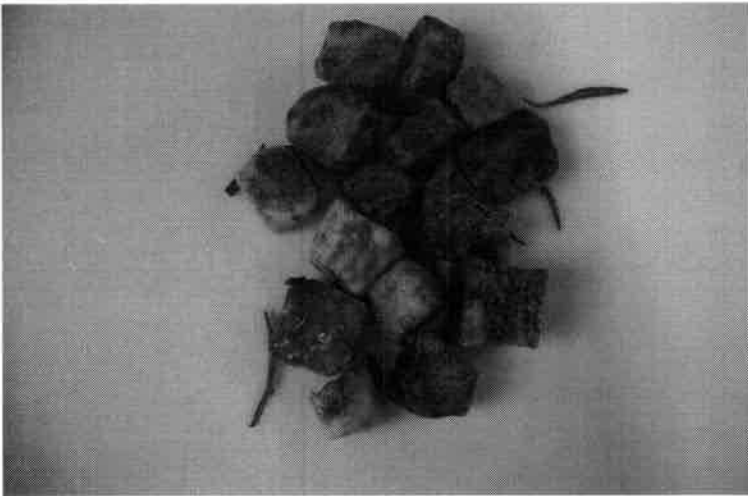
Piatlina



Patata del Bur

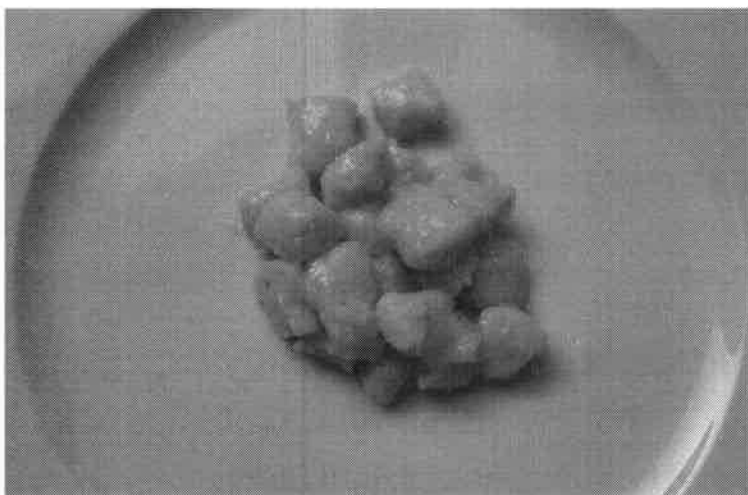
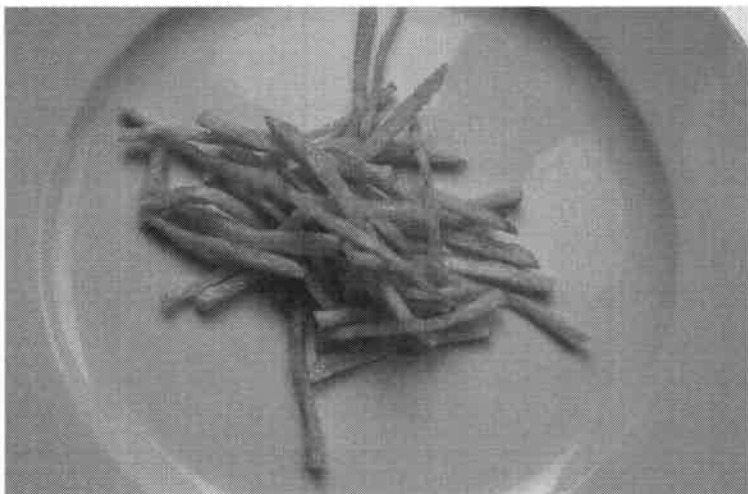
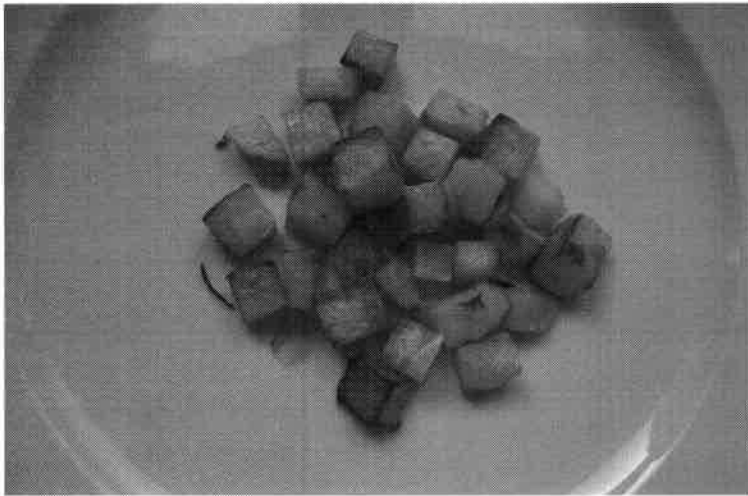


Viola

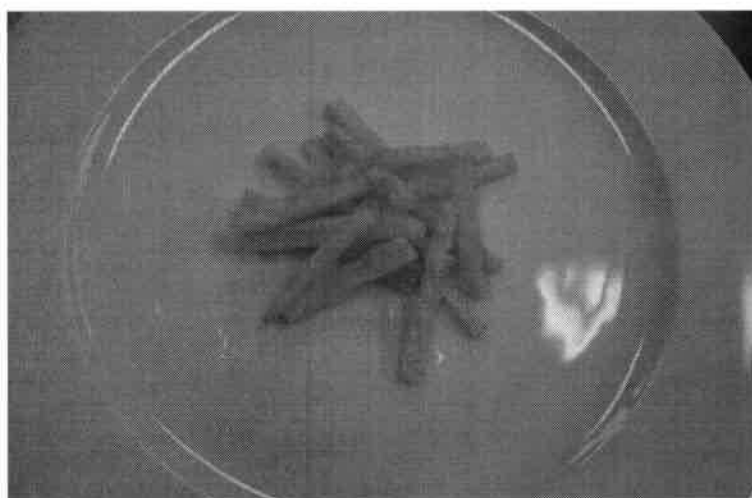
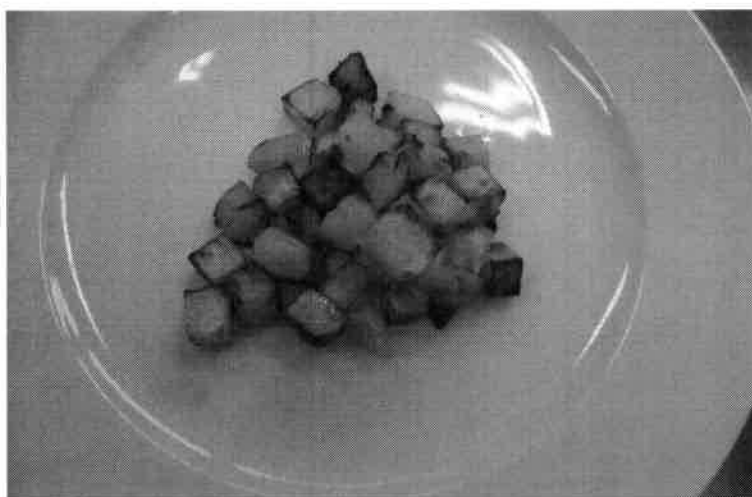


Sito di Sauze d'Oulx

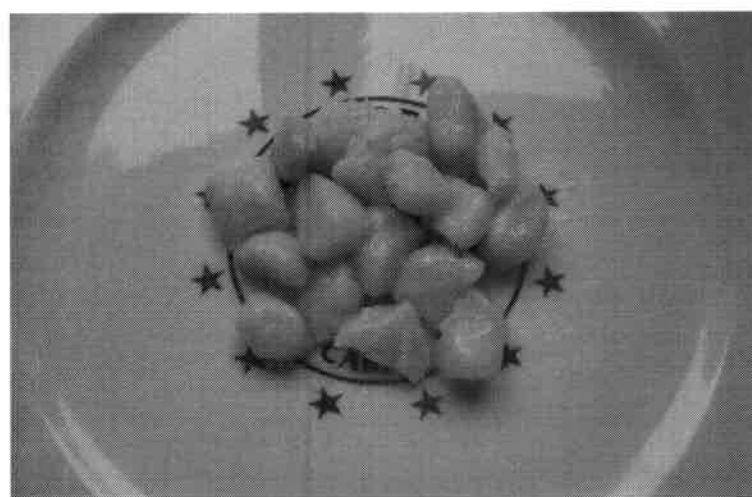
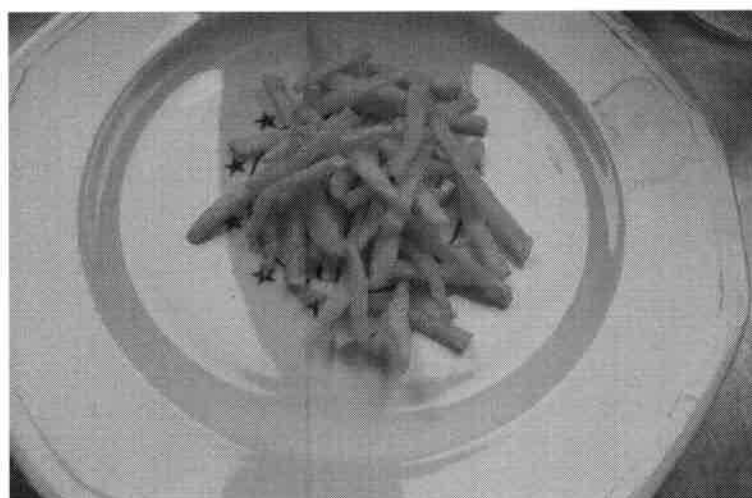
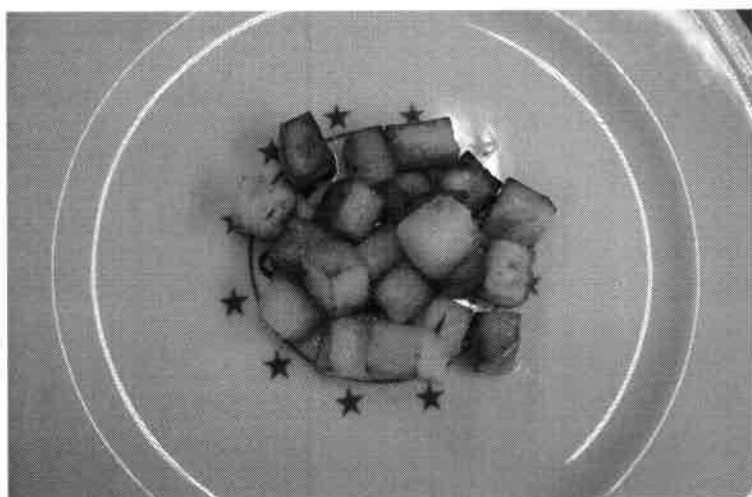
Agria



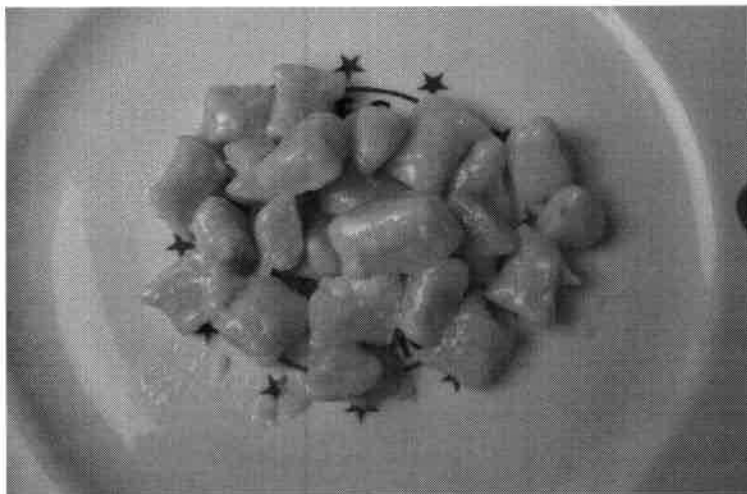
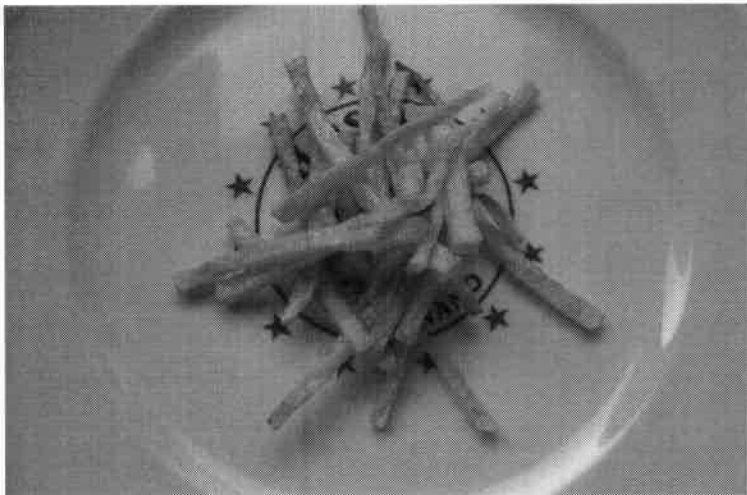
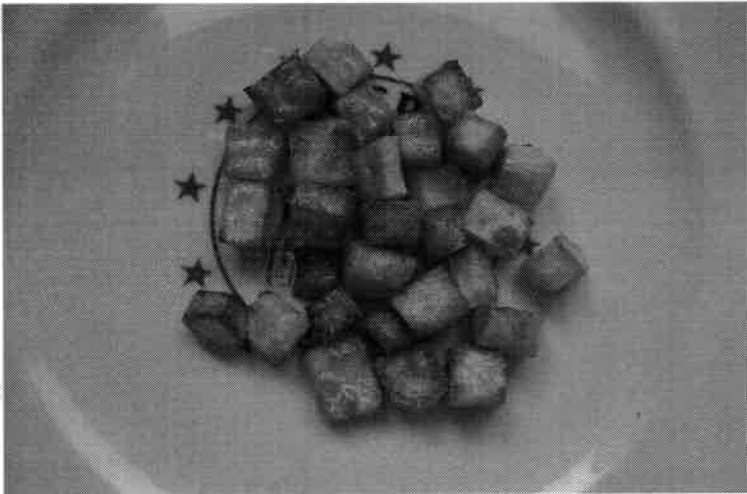
Desirée



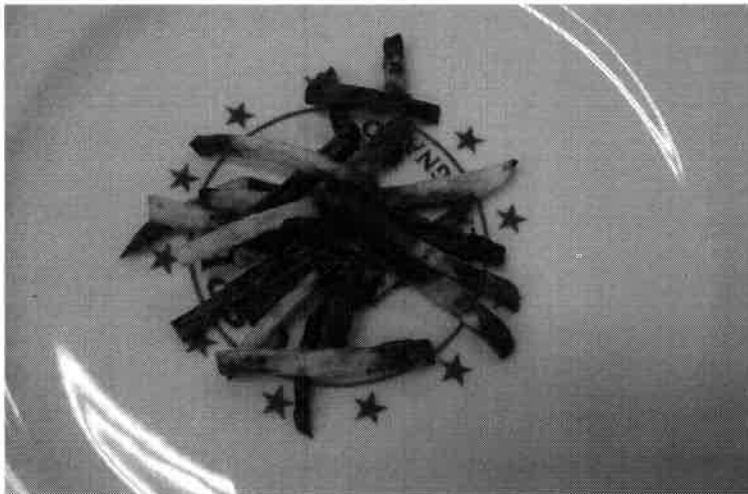
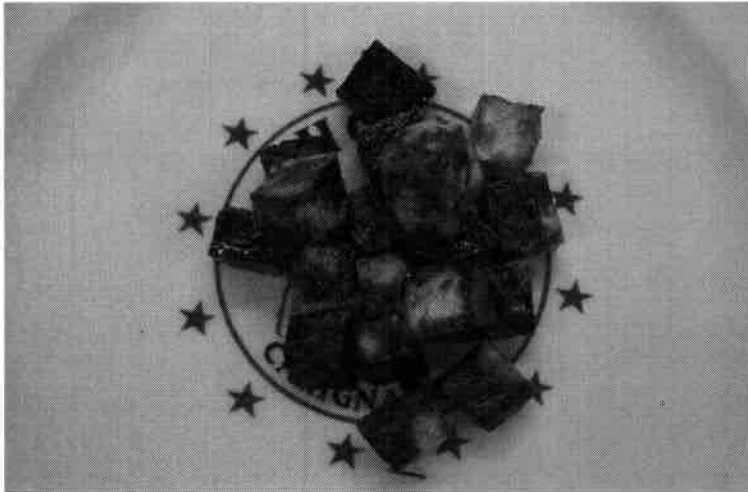
Piatlina



Patata del Bur



Viola



Indice

Le cultivar utilizzate	2
Analisi sensoriali.....	4
Valutazione utilizzo	6
Analisi di struttura.....	10
Analisi nutrizionali.....	14
Determinazione di acidi e zuccheri.....	16
Determinazione delle sostanze fenoliche.....	17
Analisi del contenuto in polifenoli totali	17
Analisi mediante HPLC/DAD e HPLC/MS	19
Valutazione dell'attività antiossidante.....	33
Test DPPH'	33
Test TEAC (Trolox Equivalence Antioxidant Capacity)	34
Allegato 1	36
Sito di Condove.....	36
Sito di Sauze d'Oulx	41