



Interreg



UNIONE EUROPEA

MARITTIMO-IT FR-MARITIME

Fondo Europeo di Sviluppo Regionale



Vitamine per l'agricoltura e il turismo.
Vitamines pour l'agriculture et le tourisme.

COMPONENTE T1

ATTIVITA' T.1.2

“Supporto tecnologico alle imprese attraverso lo sviluppo di biotecnologie verdi”

Prodotto T.1.2.6

“Studi/Prototipi di prodotti e aromi derivanti sugli agrumi”

Dipartimento di Farmacia - UNIPI



Progetto mare di agrumi

Relazione finale attività borsa di studio

Roberta Ascrizzi

Periodo: 01/11/2017-31/01/2019

Periodo: 01/11/2017-15/02/2018

Censimento ed analisi degli agrumi della Certosa di Calci

Nel corso dei primi 3 mesi, dopo un'iniziale attività di ricerca bibliografica, è stato effettuato il censimento completo degli esemplari di agrumi presenti nella Certosa di Calci (PI). Tale censimento ha consentito l'identificazione di 57 piante, di cui 43 identificate a livello specifico con certezza:

- 1 x Pompelmo (*Citrus paradisi* Macfad.)
- 7 x Arancio dolce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)
- 20 x Limone (*Citrus limon* (L.) Osbeck)
- 1 x Chinotto (*Citrus* × *myrtifolia* (Ker Gawl.) Raf., syn. *Citrus* × *aurantium* L.)
- 7 x Arancio amaro (*Citrus* × *aurantium* L.)
- 7 x Mandarino (*Citrus reticulata* Blanco)

Gli altri esemplari sono in corso di identificazione, sia di tipo fitochimico che genetico.

La raccolta dei campioni di diversi esemplari è avvenuta in tre occasioni: novembre 2017, dicembre 2017 e febbraio 2018. I campioni raccolti (frutti e foglie) sono:

- In tutte le raccolte: A1 (arancio dolce), L1 (limone), H1 (mandarino), CE1 (arancio amaro);
- Nelle sole raccolte di dicembre 2017 e febbraio 2018: D2 (arancio dolce), D3 (limone), N3 (pompelmo);
- Nella sola raccolta di febbraio 2018: N2 (Chinotto).

Una raccolta straordinaria è stata effettuata in data 21 dicembre 2017 ed ha riguardato unicamente il campione C1 (arancio dolce): l'esemplare è stato spezzato dal forte vento, quindi frutti e foglie sono stati prelevati prima che venisse eliminato.

Per tutti è stato effettuato lo screening fitochimico per i composti volatili presenti nell'olio essenziale ottenuto per spremitura manuale e per idrodistillazione delle bucce, per idrodistillazione delle foglie e del succo.

Tutte le distillazioni sono state effettuate con un apparato Clevenger standard. Ogni campione è stato distillato in triplicato, con tempo di idrodistillazione di 2 ore per ciascuna estrazione. L'olio essenziale prelevato è stato conservato in vials in vetro inerte a 3°C fino all'analisi. L'analisi della composizione è stata effettuata mediante iniezione di diluizioni al 5% in *n*-esano HPLC di ciascun OE in apparato GC-MS. Le attribuzioni dei picchi cromatografici sono state effettuate per comparazione con due librerie commerciali (ADAMS e NIST14) e con una libreria home-made, costruita per iniezione di composti puri.

Analisi fitochimica degli agrumi Massesi e degli oli EVO aromatizzati

Lo stesso tipo di analisi fitochimiche sono state effettuate su esemplari di arance e limoni provenienti dal territorio del Comune di Massa. Essendo specie peculiari di questa zona, ne è stato fatto il confronto a livello di composizione chimica (chemotipizzazione) con i campioni provenienti dalla Certosa di Calci (PI). È stato poi analizzato il loro contributo aromatico ad un olio extra-vergine di oliva prodotto per frangitura delle bucce di questi agrumi in aggiunta alle olive (olio EVOO aromatizzato preparato dal gruppo di ricerca di Tecnologie Alimentari del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali dell'Università di Pisa).

Analisi fitochimica del chinotto del Comune di Savona

È stata inoltre effettuata l'estrazione dell'olio essenziale delle bucce di campioni di chinotto a tre differenti stadi di maturazione (acerbi, a maturazione intermedia, maturi) del territorio del Comune di Savona inviati dal gruppo capofila del progetto.

Altro

Nel periodo in oggetto si è inoltre svolta la Riunione del Comitato di Pilotaggio e del Comitato Tecnico Scientifico presso la Camera di Commercio di Bastia, Corsica, in data 24/01/2018. In tale sede la sottoscritta ha esposto i risultati delle analisi svolte fino ad allora sotto forma di presentazione con slides a tutto il partenariato.

Periodo: 15/02/2018-15/08/2018

Avanzamento del censimento degli agrumi

Nel corso dei sei mesi in oggetto è stato completato il censimento delle specie presenti nella Certosa di Calci (PI), sia nelle celle dei Certosini, interne al Chiostro, che nelle aree immediatamente vicine (entro i confini della Certosa). Tale censimento ha consentito l'identificazione di 59 piante, di cui 49 identificate a livello specifico con certezza, grazie alla collaborazione con i genetisti dell'INRA di Corsica:

- 1 x Pompelmo (*Citrus paradisi* Macfad.)
- 9 x Arancio dolce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)
- 20 x Limone (*Citrus limon* (L.) Osbeck)
- 1 x Chinotto (*Citrus × myrtifolia* (Ker Gawl.) Raf., syn. *Citrus × aurantium* L.)
- 8 x Arancio amaro (*Citrus × aurantium* L.)
- 10 x Mandarino (*Citrus reticulata* Blanco)

Gli altri esemplari sono in corso di identificazione, sia di tipo fitochimico che genetico.

Prosiegua analisi degli agrumi della Certosa di Calci

La raccolta dei campioni di diversi esemplari è avvenuta a marzo 2018. I campioni raccolti (frutti e foglie) sono costituiti da: A1 (arancio dolce), L1 (limone), H1 (mandarino), CE1 (arancio amaro).

Per tutti è stato effettuato lo screening fitochimico volto alla caratterizzazione dei composti volatili presenti nell'olio essenziale ottenuto per spremitura manuale e per idrodistillazione delle bucce, delle foglie e del succo.

Tutte le distillazioni sono state effettuate con un apparato Clevenger standard. Ogni campione è stato distillato in triplicato, con tempo di idrodistillazione di 2 ore per ciascuna estrazione. L'olio essenziale prelevato è stato conservato in vials in vetro inerte a 3°C fino all'analisi. L'analisi della composizione è stata effettuata mediante iniezione di diluizioni al 5% in *n*-esano HPLC di ciascun OE in apparato GC-MS. Le attribuzioni dei picchi cromatografici sono state effettuate per comparazione con due librerie commerciali (ADAMS e NIST14) e con una libreria home-made, costruita per iniezione di composti puri.

Ad aprile 2018 è stata effettuata una raccolta straordinaria ed ha riguardato unicamente i fiori di due esemplari: l'arancio amaro della Cabina Enel ed il Limone L1. Di questi campioni è stato effettuato il campionamento dell'emissione volatile spontanea nello spazio di testa con la tecnica HS-SPME (Headspace Solid Phase Micro-Extraction), seguito dall'analisi in apparato GC-MS.

Altro

Nel periodo in oggetto ho presentato una comunicazione orale alla Scuola “Paolo Ceccherelli” organizzata dalla Società Italiana di Fitochimica (SIF) dedicata alla “Filiera corta in campo erboristico e medicinale: sviluppo tecnologico e programmazione comunitaria” che si è svolta ad Albenga (SV) dal 7 al 9 giugno 2018. La presentazione è riportata negli atti della Scuola in oggetto con il titolo “Limone e arancio massesi: caratterizzazione fitochimica e loro impiego nella produzione di olio extravergine d’oliva aromatizzato ottenuto mediante criomacerazione - Parte 1”.

Ho inoltre partecipato alle visite guidate alla Certosa di Calci dedicate agli studenti dell’ITI “G. Galilei” di Livorno (28.03.2018) e del Liceo Scientifico “U.Dini” di Pisa insieme all’ I.P.S.A.R. Matteotti di Pisa (18.04.2018) presentando una relazione generale sugli agrumi.

Periodo: 15/08/2018-31/01/2019

Prosiegua analisi degli agrumi della Certosa di Calci

A settembre 2018 e novembre 2018 sono state effettuate due nuove raccolte presso la Certosa di Calci. I campioni raccolti (frutti e foglie) sono costituiti da: A1 (arancio dolce), L1 (limone), H1 (mandarino), CE1 (arancio amaro).

Per tutti è stato effettuato lo screening fitochimico volto alla caratterizzazione dei composti volatili presenti nell’olio essenziale ottenuto per spremitura manuale e per idrodistillazione delle bucce, delle foglie e del succo.

Tutte le distillazioni sono state effettuate con un apparato Clevenger standard. Ogni campione è stato distillato in triplicato, con tempo di idrodistillazione di 2 ore per ciascuna estrazione. L’olio essenziale prelevato è stato conservato in vials in vetro inerte a 3°C fino all’analisi. L’analisi della composizione è stata effettuata mediante iniezione di diluizioni al 5% in *n*-esano HPLC di ciascun OE in apparato GC-MS. Le attribuzioni dei picchi cromatografici sono state effettuate per comparazione con due librerie commerciali (ADAMS e NIST14) e con una libreria home-made, costruita per iniezione di composti puri.

Analisi fitochimica della Pompia di Siniscola (NU)

Sono state effettuate le seguenti analisi fitochimiche della Pompia sarda (fornita da Piercarlo Ferraris e Peppino Piquereddu dell’Azienda Scuola Agraria di Siniscola – I.P.S.A.S.R.”, Località San Narciso, Siniscola (NU)):

- Analisi della frazione volatile ottenuta per spremitura manuale a freddo delle bucce di Pompia in *n*-esano HPLC;
- Analisi della composizione dell’olio essenziale estratto per idrodistillazione in apparato Clevenger dalle bucce e dalle foglie di Pompia.

Tutte le distillazioni sono state effettuate con un apparato Clevenger standard. Ogni campione è stato distillato in triplicato, con tempo di idrodistillazione di 2 ore per ciascuna estrazione. L’olio essenziale prelevato è stato conservato in vials in vetro inerte a 3°C fino all’analisi. L’analisi della composizione è stata effettuata mediante iniezione di diluizioni al 5% in *n*-esano HPLC di ciascun OE in apparato GC-MS. Le attribuzioni dei picchi cromatografici sono state effettuate per comparazione con due librerie commerciali (ADAMS e NIST14) e con una libreria home-made, costruita per iniezione di composti puri.

Inoltre, l'olio essenziale puro ottenuto per idrodistillazione dalle bucce di Pompia è stato testato per valutarne diverse attività biologiche:

- Capacità antiossidante, valutata tramite due saggi (DPPH e FRAP);
- Attività antifungina su *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, *F. solani*, *A. flavus* ed *A. Niger*;
- Attività antibatterica su ceppi di *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus pseudointermedius*.

Altro

Nel periodo in oggetto si è inoltre svolta la Riunione del Comitato di Pilotaggio e del Comitato Tecnico Scientifico presso la Certosa di Calci (PI), in data 13/12/2018. In tale sede, i risultati delle analisi svolte fino ad allora sono stati esposti sotto forma di presentazione con slides a tutto il partenariato.

Ho inoltre partecipato al Workshop “Un mare di agrumi: dalla coltivazione al prodotto finito” organizzato dalla Società Italiana di Fitochimica (SIF) svoltosi il 14/12/2018 presso la Biblioteca Ex-Convento dei Cappuccini, Via dei Cappuccini 2b, Pisa.

Dr.ssa Roberta Ascrizzi

Tutor: Prof.ssa Luisa Pistelli



Interreg
MARITTIMO-IT FR-MARITIME
Fondo Europeo di Sviluppo Regionale



**MARE
DI AGRUMI**
Vitamine per l'agricoltura e il turismo.
Vitamines pour l'agriculture et le tourisme.



Rapport finale de l'activité de subvention de recherche

Roberta Ascrizzi

Période: 01/11/2017-31/01/2019



UNIVERSITÀ DI PISA

Période: 01/11/2017-15/02/2018

Recensement et analyse des agrumes de la Chartreuse de Calci

Au cours des trois premiers mois, après une initiale activité de recherche bibliographique, on a réalisé un recensement complet des spécimens d'agrumes présents dans la Chartreuse de Calci (PI). Ce recensement a permis d'identifier 57 plantes, dont 43 sont identifiés au niveau spécifique avec certitude:

- 1 x Pamplemousse (*Citrus paradisi* Macfad.)
- 7 x Orange douce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)
- 20 x Citron (*Citrus limon* (L.) Osbeck)
- 1 x Chinotto (*Citrus × myrtifolia* (Ker Gawl.) Raf., syn. *Citrus × aurantium* L.)
- 7 x Orange amère (*Citrus × aurantium* L.)
- 7 x Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco)

Les autres exemplaires sont en cours d'identification, à la fois du type phyto-chimique et génétique.

La collecte d'échantillons de différents spécimens a eu lieu à trois reprises: novembre 2017, décembre 2017 et février 2018. Les échantillons collectés (fruits et feuilles) sont:

- Dans toutes les collections: A1 (orange douce), L1 (citron), H1 (mandarin), CE1 (orange amère);
- Dans les collections de décembre 2017 et février 2018: D2 (orange douce), D3 (citron), N3 (pamplemousse);
- Dans la collection de février 2018: N2 (Chinotto).

Une collection extraordinaire a été réalisée le 21 Décembre 2017 et a été limité à l'échantillon C1 (orange douce); l'échantillon a été brisé par vent fort, de sorte que les fruits et les feuilles ont été retirées avant qu'il ne soit supprimé.

Pour tous, le criblage phyto-chimique a été effectué pour les composés volatils présents dans l'huile essentielle obtenue par pressage manuel et pour l'hydrodistillation des pelures, pour l'hydrodistillation des feuilles et du jus.

Toutes les distillations ont été faites avec un appareil Clevenger standard. Chaque échantillon a été distillé en triple, avec un temps d'hydrodistillation de 2 heures pour chaque extraction. L'huile essentielle extraite a été stockée dans des flacons de verre inerte à 3° C jusqu'à analyse. L'analyse de la composition a été effectuée par injection de 5% de dilutions dans du HPLC n-hexane de chaque OE dans un appareil GC-MS. Les attributions des pics chromatographiques ont été faites par comparaison avec deux banques commerciales (ADAMS et NIST14) et avec une librairie faite maison, construite par injection de composés purs.

Analyse phyto-chimique d'agrumes de Massa et des huiles EVO aromatisées

Le même type d'analyse phyto-chimique a été effectuée sur des spécimens d'oranges et de citrons provenant du territoire de la municipalité de Massa. Étant espèces particulières de cette région, il a été fait de la comparaison au niveau de la composition chimique avec des échantillons provenant de la chartreuse de Calci (PI). Leur apport aromatique a ensuite été analysé en une huile d'olive extra vierge produite en pressant les peaux de ces agrumes en plus des olives (huile aromatisée EVOO préparée par le groupe de recherche des Technologies Alimentaires du Département des Sciences Agricoles, Alimentaires et Environnementales de l'Université de Pise).

Analyse phyto-chimique du chinotto de la municipalité de Savona

En outre, l'huile essentielle extraite des pelures d'échantillons du quinotto a été extraite à trois différents stades de maturation (non mûrs, matures, mûrs) du territoire de la municipalité de Savona envoyé par le groupe principal du projet.

Autre

Dans la période en question, on a également tenu la réunion du Comité directeur et le Comité technique à la Chambre de Commerce de Bastia, en Corse, le 24.01.2018. Dans ce contexte, la soussignée a présenté les résultats des analyses effectuées jusque-là sous forme de présentation en PowerPoint à tous les partenariats.

Période: 15/02/2018-15/08/2018

Progrès du recensement des agrumes

Au cours des six mois en question, nous avons achevé le recensement des espèces présentes dans la Chartreuse de Calci (PI), tant dans les cellules de Chartreux, à l'intérieur du Cloître, et dans les zones immédiatement adjacentes (dans les limites de la Chartreuse). Ce recensement a permis l'identification de 59 plantes, dont 49 ont été identifiées à un niveau spécifique avec certitude, grâce à la collaboration avec les généticiens de l'INRA en Corsica:

- 1 x Pamplemousse (*Citrus paradisi* Macfad.)
- 9 x Orange douce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)
- 20 x Citron (*Citrus limon* (L.) Osbeck)
- 1 x Quinotto (*Citrus* × *myrtifolia* (Ker Gawl.) Raf., syn. *Citrus* × *aurantium* L.)
- 8 x Orange amère (*Citrus* × *aurantium* L.)
- 10 x Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco)

Les autres spécimens sont identifiés, à la fois phytochimiques et génétiques.

Poursuite de l'analyse des agrumes de la Chartreuse de Calci

La collection de spécimens de différents échantillons a eu lieu en Mars 2018. Les échantillons recueillis (fruits et feuilles) consistent en: A1 (orange douce), L1 (citron), H1 (mandarin), EC1 (orange amère). Pour l'ensemble, nous avons réalisé le criblage phytochimique pour la caractérisation des composés volatils présents dans l'huile essentielle obtenue par pressage manuel et pour l'hydrodistillation des pelures, feuilles et jus.

Toutes les distillations ont été faites avec un appareil Clevenger standard. Chaque échantillon a été distillé en triple, avec un temps d'hydrodistillation de 2 heures pour chaque extraction. L'huile essentielle extraite a été stockée dans des flacons de verre inertes à 3 °C jusqu'à analyse. L'analyse de la composition a été effectuée par injection de 5% de dilutions dans du HPLC *n*-hexane de chaque OE dans un appareil GC-MS. Nous avons fait les attributions des pics chromatographiques par comparaison avec deux banques commerciales (ADAMS et NIST14) et avec une librairie faite maison, construite par injection de composés purs. En avril 2018 a été faite une collection extraordinaire et ne concernait que les fleurs de deux spécimens: l'orange amère de la Cabane Enel et la Citron L1. Ces échantillons ont été échantillonnés en émission spontanée volatile dans l'espace de tête avec la technique HS-SPME (Headspace Solid Phase Micro-Extraction), suivie d'une analyse en appareil GC-MS.

Autre

Dans la période en question, j'ai présenté une communication orale à l'École "Paolo Ceccherelli" organisée par la Société Phytochimique Italienne (SIF) dédiée à la "Chaîne courte en herbes et médicinales: développement technologique et planification communautaire" qui a eu lieu à Albenga (SV) du 7 au 9 juin 2018. La

présentation est rapportée dans les archives de l'Ecole en question sous le titre "Masses de citron et d'orange: caractérisation phytochimique et leur utilisation dans la production d'huile d'olive extra vierge aromatisée obtenue par cryomacralisation - Partie 1". J'ai également participé aux visites guidées de la Certosa di Calci dédiée aux étudiants de l'ITI "G. Galilei" de Livourne (28.03.2018) et du Liceo Scientifico "U.Dini" de Pise en collaboration avec le Matteotti I.P.S.A.R. Matteotti de Pise (18.04.2018) présentant un rapport général sur les agrumes.

Période: 15/08/2018-31/01/2019

Continuation en analyse des agrumes de la Certose de Calci

En Septembre et novembre 2018 deux nouvelles collectes ont été effectuées à la Certose de Calci. Les échantillons recueillis (fruits et feuilles) composés de: A1 (orange douce), L1 (citron), H1 (mandarin), CE1 (orange amère).

Pour l'ensemble, nous avons réalisé le criblage phytochimique pour la caractérisation des composés volatils présents dans l'huile essentielle obtenue par pressage manuel et pour l'hydrodistillation des pelures, feuilles et jus.

Toutes les distillations ont été faites avec un appareil Clevenger standard. Chaque échantillon a été distillé en triple, avec un temps d'hydrodistillation de 2 heures pour chaque extraction. L'huile essentielle extraite a été stockée dans des flacons de verre inertes à 3 °C jusqu'à analyse. L'analyse de la composition a été effectuée par injection de 5% de dilutions dans du HPLC *n*-hexane de chaque OE dans un appareil GC-MS. Nous avons fait les attributions des pics chromatographiques par comparaison avec deux banques commerciales (ADAMS et NIST14) et avec une librairie faite maison, construite par injection de composés purs.

Analyses phytochimique de la Pompia de Siniscola (NU)

Les analyses phytochimiques suivantes de la Pompia sarde ont été effectuées (fournies par Piercarlo Ferraris et Peppino Piquereddu de la ferme Agricole de l'École de Siniscola - I.P.S.A.S.R. ", localité San Narciso, Siniscola (NU)):

- Analyses de la fraction volatile obtenue par pressage manuel à froid de la peau de Pompia en *n*-hexane pour HPLC;
- Analyses de la composition de l'huile essentielle extraite par hydrodistillation dans l'appareil Clevenger à partir des pelures et des feuilles de Pompia.

Toutes les distillations ont été faites avec un appareil Clevenger standard. Chaque échantillon a été distillé en triple, avec un temps d'hydrodistillation de 2 heures pour chaque extraction. L'huile essentielle extraite a été stockée dans des flacons de verre inertes à 3 °C jusqu'à analyse. L'analyse de la composition a été effectuée par injection de 5% de dilutions dans du HPLC *n*-hexane de chaque OE dans un appareil GC-MS. Nous avons fait les attributions des pics chromatographiques par comparaison avec deux banques commerciales (ADAMS et NIST14) et avec une librairie faite maison, construite par injection de composés purs.

De plus, l'huile essentielle pure obtenue par hydrodistillation à partir de la peau de Pompia a été testée pour évaluer différentes activités biologiques:

- Capacité antioxydante, évaluée par deux essais (DPPH et FRAP);
- Activité antifongique sur *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, *F. solani*, *A. flavus* et *A. Niger*;
- Activité antibactérienne sur les souches *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus pseudointermedius*.

Autre

Dans la période en question, on a également tenu la réunion du Comité directeur et du Comité technique à la Certosa di Calci (PI), le 13/12/2018. Dans ce contexte, les résultats des analyses effectuées jusqu'à présent ont été présentés sous forme de diapositives présentées à l'ensemble du partenariat.

J'ai également participé à l'atelier "Une mer d'agrumes: de la culture au produit fini" organisé par la Société Phytochimique Italienne (SIF) le 14/12/2018 à la Bibliothèque des Capucini de l'Ex-Couvent, Via dei Cappuccini 2b, Pise.

Dr. Roberta Ascrizzi

Tutor: Prof. Luisa Pistelli