

POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili

Tesi di Laurea Magistrale

*Intensificazione di processo nell'estrazione di
componenti ad alto valore aggiunto da
biomasse di scarto. La vinaccia d'uva*



**POLITECNICO
DI TORINO**

Relatori

Samir Bensaid
Giancarlo Cravotto
Giuliano Cavaglià

Candidato

Gabriele D'Amico

A.A. 2018-2019

Indice

1	Introduzione.	3
1.1	L'uva e i polifenoli.	4
1.1.1	Vinaccia d'uva. Disponibilità e possibili utilizzi.	4
1.1.2	Il mondo dei polifenoli.	5
1.2	La <i>Green Chemistry</i>	10
1.2.1	Un po' di storia.	10
1.2.2	<i>Green Engineering</i> e <i>Green Extraction</i>	11
1.3	L'intensificazione dei processi estrattivi.	13
1.3.1	Generalità e tecniche di intensificazione.	13
1.3.2	L'estrazione assistita da ultrasuoni-UAE.	14
1.4	Scopo della tesi.	17
2	Descrizione attività sperimentale.	18
2.1	Stoccaggio, caratterizzazione e pretrattamento della matrice.	18
2.2	Estrazione dei polifenoli. Apparecchiature e metodi.	20
2.2.1	Estrattore " <i>cup-horn</i> " type.	20
2.2.2	Estrattore " <i>probe-type</i> ".	20
2.2.3	Estrattore a riflusso.	21
2.2.4	Estrazione in sistema ad agitazione meccanica.	21
2.2.5	Metodologia di estrazione.	21
2.2.6	Operazioni post-estrazione.	22
2.3	Analisi dei dati.	23
2.3.1	Quantificazione dei polifenoli totali.	23
2.3.2	Cinetica di estrazione.	25
2.3.3	Bilanci di energia.	28
2.4	Analisi qualitative e quantitative.	29
2.4.1	Analisi HPLC-DAD.	29
3	Risultati.	33
3.1	Determinazione del rapporto solido-liquido ottimo.	33
3.2	Bilanci di energia.	34
3.3	Degrassaggio della matrice.	34
3.4	Estrazione convenzionale a ricadere.	35
3.5	Estrazione assistita da ultrasuoni.	36
3.5.1	Cinetica di estrazione sistema <i>cup-horn</i> in acqua.	37
3.5.2	Cinetica di degradazione in US in acqua.	38
3.5.3	Cinetica estrazione sistema <i>cup-horn</i> in acqua+HCl (pH=2.5).	39
3.6	Estrazione in sistema agitato meccanicamente.	40
3.7	Cinetica di Peleg.	41

3.7.1	Estrazione in acqua assistita da US.	42
3.7.2	Estrazione in acqua+acido (pH=2,5) assistita da US	43
3.7.3	Estrazione in acqua in sistema agitato meccanicamente.	44
3.8	Influenza della temperatura.	45
3.9	Influenza del contenuto di zuccheri.	47
3.10	Confronto tra diverse metodologie estrattive.	48
3.11	Stadi di estrazione multipli.	49
3.12	Risultati analisi HPLC-DAD.	52
3.12.1	Metodo: Catechine - 280nm	52
3.12.2	Metodo: Catechine - 515nm	55
3.12.3	Rapporto catechine/proantocianidine.	56
4	Progettazione e scale-up.	58
4.1	Descrizione del processo.	58
4.2	Generalità impianto.	59
4.3	Sezione di estrazione.	59
4.4	Desing basis.	60
4.4.1	Caratteristiche prodotto.	60
4.4.2	Caratteristiche <i>utilities</i>	61
4.5	Dimensionamento apparecchiature.	61
4.5.1	Pompe centrifughe.	61
4.5.2	Pompe a girante flessibile.	62
4.5.3	Estrattori ad US (UR-101, UR-102).	63
4.5.4	Filtri a tamburo rotante (RF-101, RF-102, RF-103,).	64
4.5.5	Decanter (CS-101, CS-102, CS-103).	65
4.5.6	Miscelatori (ST-101, ST-102, ST-103, ST-104).	66
4.5.7	Serbatoi.	67
4.5.8	Scambiatori di calore (HE-101).	68
4.5.9	Separatori a membrana polimerica (MS-101, MS-102).	69
4.5.10	Omogeneizzatore KONMIX e pressa a vite (KM-101, SP-101).	70
4.6	Sistema di controllo automatico.	71
5	Conclusioni.	73
	Bibliografia	77
	A Process Flow Diagram	79
	B Assorbanze HPLC	82
B.1	EXT-01	82
B.2	EXT-02	83
B.3	EXT-03	84
B.4	EXT-04	85

Capitolo 1

Introduzione.

Il vino è la bevanda ottenuta dalla fermentazione alcolica dell'uva, frutto della vite (*Vitis vinifera*). Un uso moderato, grazie all'elevato contenuto in polifenoli (che giocano il ruolo di antiossidanti), viene associato ad una diminuzione del rischio di malattie cardiovascolari quali infarti e ictus, diabete mellito e sindromi metaboliche[5]. Le origini di questa bevanda sono così antiche da confondersi con la nascita della civiltà umana stessa. Le prime prove archeologiche di presenza della *Vitis vinifera*, risalenti al 7000 a.C. circa, sono state rinvenute in alcune zone dei territori attuali di Cina, Georgia, Iran e Grecia, oltre che in Sicilia (4000 a.C. circa)[1]. La prova più antica della produzione di vino, processo detto vinificazione, proviene invece dall' Armenia (risalente al 4100 a.C. circa) in seguito alla scoperta della grotta Areni-1, nei pressi della città di Areni, identificata come la più antica cantina esistente al mondo[1]. Il vigneto e il vino sono stati una parte fondamentale delle società, dall'antichità ad oggi, legati all'economia, ai costumi e alle credenze delle società stesse. Il vino è da sempre associato alla festività ed alla convivialità grazie al senso di ebbrezza che induce nei consumatori. Questo stato di alterazione della coscienza portò a considerare la bevanda nell'ambito di alcuni riti religiosi fin dai suoi primi utilizzi e questo potere simbolico arriva fino ai giorni nostri tramite i riti legati al Cristianesimo.

Il vigneto domestico e tutte le varietà di vitigno tradizionale provengono dalla vite selvatica, *Vitis vinifera* sottospecie *sylvestris*, un tipo di *Vitis vinifera* rampicante che cresceva ai bordi delle foreste e sui lati delle vallate fluviali, arrivando a parecchie decine di metri d'altezza [2]. Il frutto che ne deriva, l'uva, è una infruttescenza cioè un raggruppamento di frutti che viene detto grappolo. Il grappolo è costituito da un graso o "raspo" (che costituisce l'asse centrale del grappolo), e da numerosi acini (chicchi, o più propriamente bacche), di piccola taglia e di colore variabile in base alle diverse tipologie considerate (uva bianca o rossa).

Oggi, vi sono al mondo oltre 67 nazioni che producono, importano ed esportano uva e vino, compresi alcuni paesi di Oceania, America Latina e Africa, concorrenti su un mercato annuo mondiale di circa 25 miliardi di litri di vino[4]. L'Italia è il primo produttore mondiale di vino con 49,5 milioni di ettolitri (17,5% sulla produzione mondiale totale) seguita da Francia, 47,5 milioni di ettolitri (16,7%), e Spagna con 37,2 milioni di ettolitri (13,1%) [3]. Tuttavia, il maggior produttore mondiale di uva risulta essere la Cina che contribuisce alla produzione globale del frutto (circa 50 milioni di tonnellate) per il 13%, di cui però ne viene esportata la maggior parte [4]. La vinificazione è un processo multistadio e stagionale, condotto prevalentemente in autunno, in cui viene prodotta un'elevata quantità di scarti sia inorganici che organici nel quale, dopo la fermentazione, è contenuta ancora una parte significativa di composti bioattivi. Questo

problema sta diventando sempre più importante per i produttori vinicoli, soprattutto a causa delle imposte pagate nello smaltimento degli scarti, ai guadagni generati da un eventuale recupero delle sostanze ad elevato valore aggiunto oltre che per gli aspetti legati all'inquinamento provocato dalla filiera produttiva stessa. Considerando che circa il 75% della produzione globale di uva viene utilizzata nella vinificazione e che circa il 25% di questa costituisce scarti [4][7], ci si rende immediatamente conto dell'enorme importanza che potrebbe assumere nel prossimo futuro una politica di valorizzazione degli scarti della vinificazione.

1.1 L'uva e i polifenoli.

1.1.1 Vinaccia d'uva. Disponibilità e possibili utilizzi.

La vinaccia è il residuo solido ottenuto dopo la fase di fermentazione. Da alcune stime proposte in letteratura, si può generalmente considerare di ottenere 1 Kg di vinaccia ogni 6 litri di vino (circa il 20-30% del peso iniziale dell'uva)[7]. Durante le fasi di produzione del vino, l'uva viene macinata e pressata prima della fermentazione che è quindi l'unica fase del processo che può alterare il contenuto chimico del frutto. Tuttavia, circa il 70% della quantità iniziale di composti bioattivi rimane legata al residuo solido[7], costituito mediamente come segue (da notare che la composizione dipende da fattori legati a coltivazione, condizioni di raccolta e tipologia di uva).

- **Vinaccioli:** Sono i semi del frutto. Contribuiscono dal 38% al 56% in massa della vinaccia e contengono elevati valori di fibre (40%), acidi grassi insaturi (dal 10 al 20%), proteine (10%) e quantità minori di polifenoli complessi, zuccheri e sali.
- **Polpa e bucce:** Costituenti principali della vinaccia (dal 48 al 62% in massa). Elevato contenuto in fibre e polifenoli sia semplici che complessi.



Figura 1.1: Vinaccia (a) e sezione acino d'uva (b).

Considerando la quantità di uva che a livello mondiale viene impiegata annualmente nella vinificazione, ci si rende immediatamente conto della facilità con cui si potrebbe reperire la vinaccia. Solo in Piemonte, la produzione di vino nel 2017 è stata di oltre 2 milioni di ettolitri (con un decremento del 20% circa rispetto all'anno precedente). Tuttavia quando si considera la disponibilità rispetto ad un impianto industriale, bisogna considerare problemi legati al trasporto e allo stoccaggio. La matrice, essendo organica,

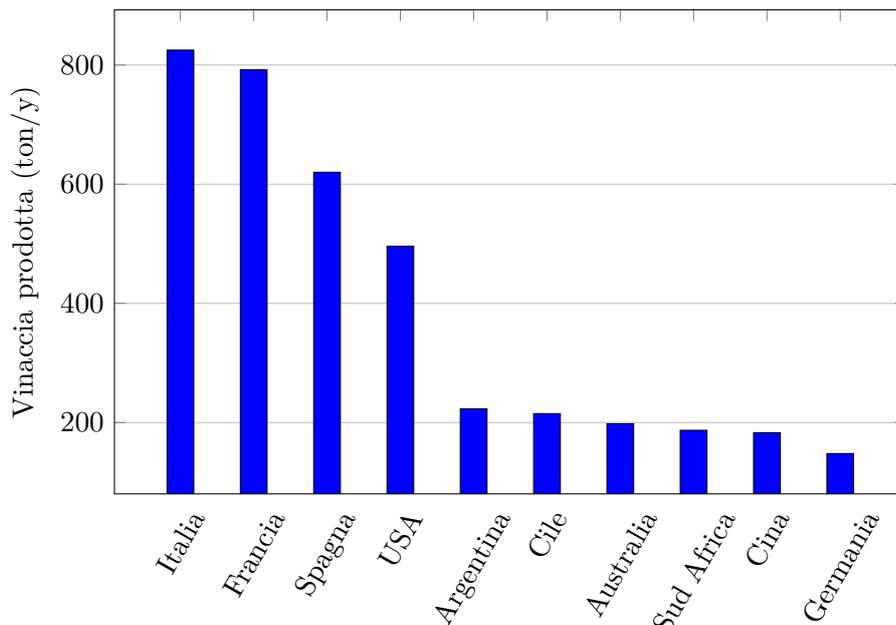


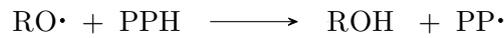
Figura 1.2: Produzione mondiale di vinaccia nel 2015 (primi 10 produttori mondiali). Adattata da [11]

va naturalmente incontro a fenomeni di degradazione, che potrebbero essere ulteriormente accelerati da enzimi residui dalla fermentazione. Si presenta quindi la necessità di conservare la matrice a basse temperature ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) o di essicarla preventivamente al trasporto (operazione che comunque non permette di esporre il solido a temperature elevate per molto tempo[13]). Ad oggi, una parte della vinaccia prodotta viene reimpiegata per scopi agricoli (alimentazione bestiame o compostaggio), come combustibile, materia prima per la produzione di biogas o materiale per l'edilizia (isolamento termico)[9]. Ciò che rende però questo scarto interessante nell'ambito dell'industria di processo, è la possibilità di farne una fonte innovativa per l'estrazione di polifenoli e altri composti bioattivi.

1.1.2 Il mondo dei polifenoli.

I polifenoli, derivanti dal metabolismo secondario delle piante, costituiscono una famiglia di circa 8000 molecole organiche naturali (note ad oggi) presenti in grande quantità nel regno vegetale[5]. Essi giocano un ruolo fondamentale nelle fasi di crescita e riproduzione delle piante, proteggendole da agenti patogeni e predatori, in quanto l'astringenza data dai polifenoli può rendere il frutto non appetibile. La tipologia di polifenoli dipende strettamente dal tipo di pianta oltre che dalle condizioni ambientali in cui questa vive. Inoltre, essendo necessaria la luce per la formazione di alcuni di tali composti (ad esempio per i flavonoidi che rappresentano la classe più ampia) se ne riscontra una differenza di concentrazione nelle varie parti della pianta che è massima in foglie, semi e frutti, scendendo quasi a zero nelle radici[5]. Il crescente interesse verso questa categoria di composti è dovuto alle proprietà antiossidanti che essi vantano, implicando possibili benefici per l'uomo derivanti dalla loro assunzione. La proprietà di essere dei potenti *scavengers* di radicali liberi, responsabili della gran parte dei fenomeni ossidativi, potrebbe aiutare nella prevenzione di patologie quali malattie cardiache, cancro,

colesterolo ed arterosclerosi[5]. Il modo in cui i polifenoli “neutralizzano” i radicali liberi può essere schematizzato nelle seguenti reazioni chimiche(da [5]):



Come si vede nelle ultime due reazioni, il radicale fenolico, abbastanza stabile da impedire l'innesco di una nuova reazione a catena, gioca un ruolo fondamentale nella terminazione delle reazioni radicaliche già attive [5]. Tuttavia, in casi particolari come pH elevato ed elevata presenza di ferro, questa tendenza può essere inibita [5]. Il potere antiossidante dei polifenoli dipende fortemente dalla struttura della molecola considerata, aumentando con il crescere del grado di sostituzione dell'idrogeno con gruppi etilici o butilici. Le applicazioni industriali ricadono invece nei processi di produzione di carta, vernici, cosmetici e nell'industria alimentare come additivi. Troviamo in questa classe sia molecole semplici che polimeri naturali ad alto peso molecolare (fino a 30000 Da). Il numero e la tipologia di tali strutture fenoliche, come già accennato, determinano le caratteristiche chimico-fisiche del composto. Una classificazione di questa classe di composti può essere fatta come segue[5][6]:

1. **Flavonoidi:** Sono la classe più comune e largamente distribuita di polifenoli nelle piante. La struttura consiste in due anelli aromatici (anelli A e B) legati ad un anello eterociclico (indicato con C) solitamente contenente ossigeno. Le caratteristiche dell'anello eterociclico definiscono le differenti classi di flavonoidi.

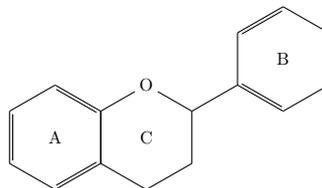


Figura 1.3: Struttura generale Flavonoidi.

- Flavani

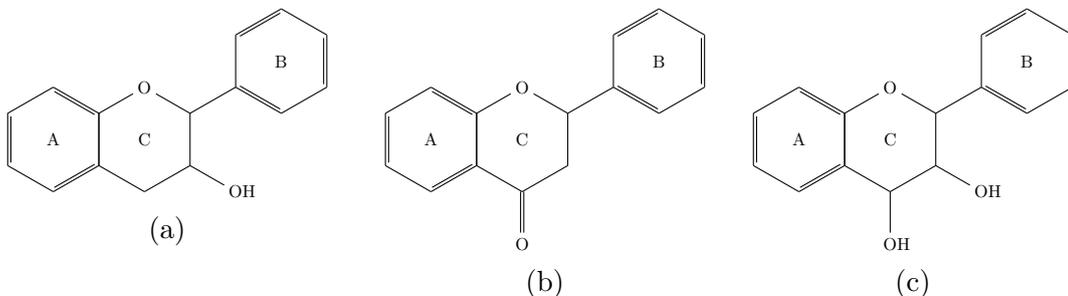


Figura 1.4: Struttura di flavan-3-oli (a), flavan-4-oni (b), flavan-3,4-dioli (c).

- Antocianine

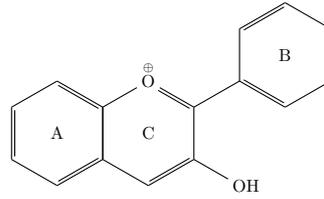


Figura 1.5: Struttura Antocianine.

- Flavonoli

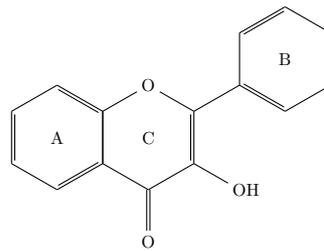


Figura 1.6: Struttura Flavonoli.

- Flavoni

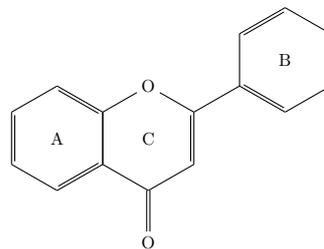


Figura 1.7: Struttura Flavoni.

2. Isoflavonoidi

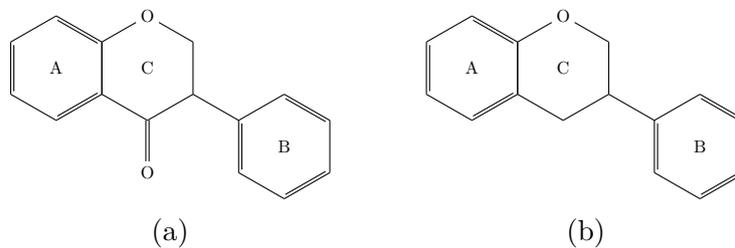


Figura 1.8: Struttura Isoflavoni (a) e Isoflavani (b).

3. Neoflavonoidi

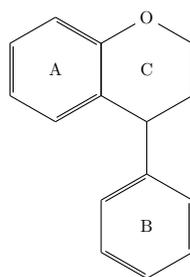


Figura 1.9: Struttura Neoflavonoidi.

4. Auroni

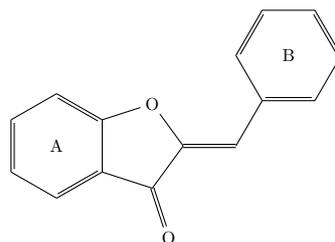


Figura 1.10: Struttura Auroni.

5. Calconi e Di-idrocalconi

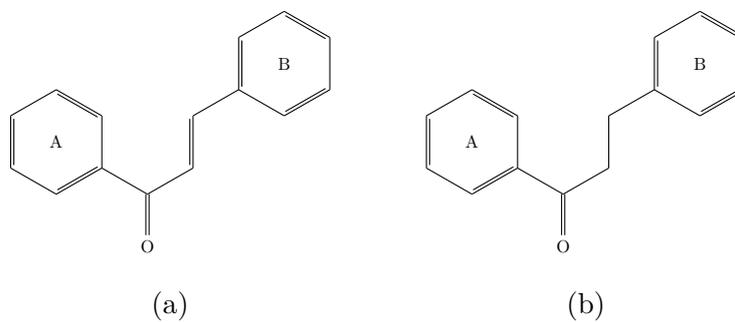


Figura 1.11: Struttura Calconi (a) e Di-idrocalconi (B).

6. Proantocianidine

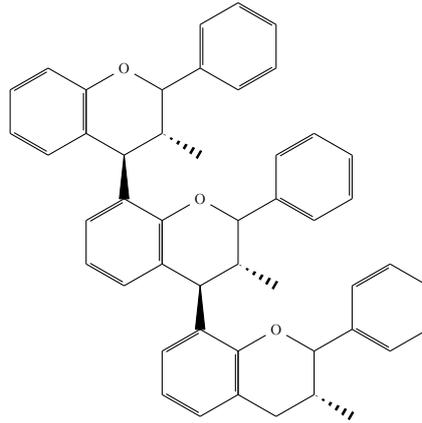


Figura 1.12: Struttura Proantocianidine.

7. Acidi fenolici

- Acidi idrossibenzoici

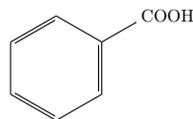


Figura 1.13: Struttura Acidi idrossibenzoici.

- Acidi fenilacetici.

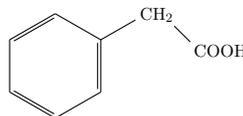


Figura 1.14: Struttura acidi fenilacetici.

- Acidi idrossicinnamici.

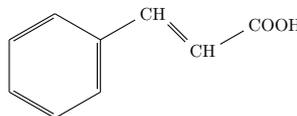


Figura 1.15: Struttura acidi idrossicinnamici.

8. Stilbeni

9. Altri polifenoli

Il mix di polifenoli estratto dalla vinaccia è molto vario e complesso, ricco in sostanze dall'elevato potere antiossidante[6]. La tipologia di molecole presenti può dipendere

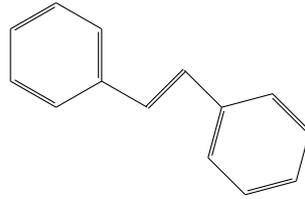


Figura 1.16: Struttura Stilbeni.

da vari fattori quali principalmente la tipologia di uva e le condizioni di coltivazione, raccolta e fermentazione. Di seguito, le classi di polifenoli generalmente rilevati in uve rosse (da [7]):

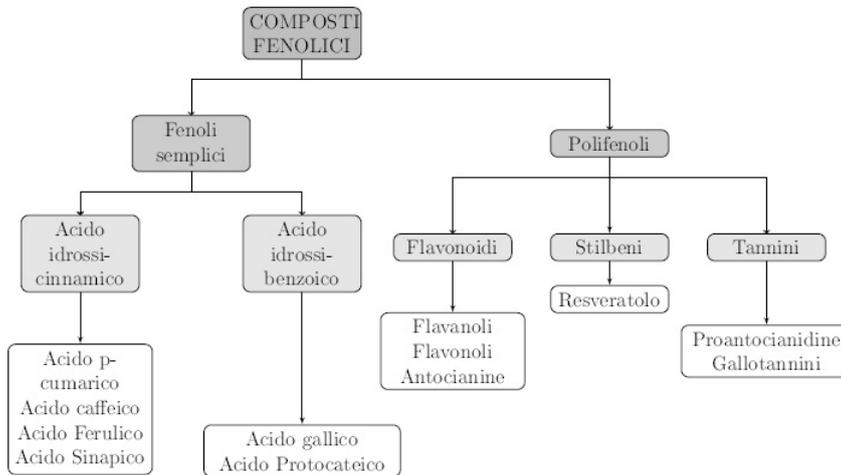


Figura 1.17: Polifenoli presenti in uve rosse.

1.2 La Green Chemistry.

1.2.1 Un po' di storia.

Era il 1962, quando Rachel Carson, con il suo libro intitolato *'Silent Spring'*, iniziò a sottolineare l'impatto ambientale dovuto ad alcuni processi dell'industria chimica e di processo statunitense. Nel 1970, il problema inizia a ricevere l'attenzione dalla politica e dell'opinione pubblica. Sotto la presidenza di Richard Nixon, viene fondata l' US Environmental Protection Agency (EPA), un organo di supervisione federale che aveva lo scopo di salvaguardare suolo e falde acquifere dall'inquinamento causato da DDT e altri tipi di pesticidi [16]. Nel 1980, l' Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), un'associazione di oltre trenta paesi industrializzati, tenne un incontro per trattare il tema delle problematiche ambientali, avviando un periodo di collaborazione tra vari paesi per il miglioramento dei processi industriali. Il termine Green chemistry venne poi coniato negli USA nel 1990 dall'EPA che ne diede la seguente definizione[16]:

"The design of new chemical products and processes, (or making improvements in already existing compounds and processes), so as to reduce or eliminate the use and generation of hazardous substances, making them less harmful to human health and

environment." Sempre in questo decennio, grazie a vari atti legislativi emanati sotto la presidenza Clinton, inizia la cooperazione tra industria, mondo accademico ed enti ambientali. Nel 1998, Paul Anastas e John C. Warner pubblicarono il libro '*Green Chemistry: Theory and practice*', dove per la prima volta vennero enunciati i 12 principi della Green chemistry[16][15], di cui si parlerà in maniera più approfondita in seguito. Infine, è nel 2000 che l'argomento assume rilevanza internazionale. In tutto il mondo vennero fondate riviste e associazioni di scienziati e il conferimento del premio Nobel per la chimica per studi nel campo della chimica verde, nel 2001 (Knowles, Noyori, Sharpless) e nel 2005 (Chauvin, Grubbs, Schrock), incentivarono il mondo accademico a intensificare gli sforzi in questo settore. Oggi, le problematiche ambientali legate all'industria sono in primo piano in quasi tutti i paesi industrializzati del mondo. Nonostante però la collaborazione tra chimica ed ingegneria stia consentendo dei grossi avanzamenti, oltre il 98 % dei composti organici deriva da fonti fossili[16], segno che ancora molto deve essere fatto al fine di consentire una coesistenza sostenibile tra progresso tecnologico e salvaguardia dell'ambiente.

1.2.2 *Green Engineering e Green Extraction*

Nel 1998, Anastas e Warner, enunciarono i 12 principi della *Green Chemistry*, una prima guida su come rendere 'verde' un processo di sintesi o un prodotto[15]. Ad oggi, questi vengono ancora adoperati nella comparazione sulla sostenibilità ambientale di due processi concorrenti. Tuttavia, essi non considerano alcuni aspetti fondamentali riguardanti un processo industriale, come ad esempio una valutazione del ciclo di vita dell'impianto, la possibilità di effettuare integrazioni energetiche o recuperare il calore di reazioni esotermiche. Nasce a tal proposito la *Green Engineering* i cui 12 principi fondamentali furono stilati da Anastas e Zimmerman. Tali principi sono elencati e brevemente spiegati di seguito[15][16]:

1. ***Inherent Rather Than Circumstantial:*** Scelte progettuali riguardanti prodotti, *utilities*, solventi e in generale su ogni aspetto del processo in esame, effettuate secondo criteri ecosostenibili.
2. ***Prevention Instead of Treatment:*** Prevedere in fase progettuale i possibili rischi legati al processo piuttosto che agire successivamente per risolvere il problema creato. Si evitino ad esempio scelte che portano ad avere quantità elevati di sottoprodotti o di effluenti inquinanti.
3. ***Design for Separation:*** Minimizzazione delle spese impiegate nella fase di separazione, che spesso in un impianto industriale è quella più costosa in termini energetici. Utilizzare tecniche di separazione efficienti e a basso impatto ambientale.
4. ***Maximize Efficiency:*** Rendere il processo il più efficiente possibile sia in termini economici che energetici. Evitare correnti dalle portate elevate, costose da movimentare/comprimere, orientandosi quindi alla costruzione di impianti più compatti.
5. ***Output-Pulled Versus Input-Pushed:*** Rendere minimo il costo unitario di produzione (anche in termini di solventi, energia impiegata, costo per la purificazione) così da massimizzare l'efficienza di impiego degli input.

6. **Conserve Complexity:** Progettare impianti modulari che possano essere facilmente riparati, migliorati o reimpiegati. Si evita così la necessità di riciclare i materiali, conservando la complessità ovvero il valore aggiunto del prodotto oltre a quello del materiale in se (*know how*, energia, forza lavoro).
7. **Durability Rather Than Immortality:** Preferire la durabilità del prodotto, programmata in fase progettuale, ad una durata "eterna" costosa in termini produttivi e di smaltimento alla fine del ciclo di vita.
8. **Meet Need, Minimize Excess:** Evitare sprechi e sovrapproduzione. Progettare processi flessibili, così che si possa adeguare la potenzialità di ogni sezione dell'impianto alla domanda del prodotto sul mercato o alla disponibilità di materia prima.
9. **Minimize Material Diversity:** Evitare configurazioni che prevedano un moltitudine di materiali, semplificando le fasi di disassemblaggio riciclo.
10. **Integrate Material and Energy Flows:** Prevedere il più possibile integrazioni energetiche e materiali (recupero del calore, recupero solventi o eventuali sottoprodotti valorizzabili).
11. **Design for Commercial "Afterlife":** Considerare in fase progettuale l'importanza del valore dell'impianto alla fine del ciclo di vita in modo da poter in parte coprire i costi di smantellamento dell'impianto.
12. **Renewable Rather than Depleting:** Preferire fonti energetiche rinnovabili a quelle fossili mirando al raggiungimento di una perfetta "economia circolare"

I 24 principi di *Green Chemistry* e *Green Engineering* sono comunque piuttosto lunghi e ciò potrebbe indurre il lettore a perdere l'attenzione. Si è perciò cercato di "condensare" questi 24 punti in due acronimi (vedi 1.1, adattata da [15]), *PRODUCTIVELY* per i principi della *Green Chemistry* e *IMPROVEMENTS* per quelli della *Green Engineering*. Il recupero di composti bioattivi da matrici vegetali viene effettuato mediante

12 Principi della <i>Green Chemistry</i>	12 Principi della <i>Green Engineering</i>
P -Prevent waste	I -Inherently non-hazardous and safe
R -Renewable materials	M -Minimize material diversity
O -Omit derivatization step	P -Prevention instead treatment
D -Degradable chemical products	R -Renewable material and energy input
U -Use safe synthetic methods	O -Output led desing
C -Catalytic reagents	V -Very simple
T -Temperature, Pressure ambient	E -Efficient use of mass, energy, space and time
I -In-process monitoring	M -Meet the need
V -Very few auxiliary substances	E -Easy to separate by desing
E -E-factor, maximize feed in product	N -Networks for mass and energy exchange
L -Low toxicity of chemical product	T -Test life cicle of the desing
Y -Yes, it's safe	S -Sustainability throughout product life cycle

Tabella 1.1: 24 Principi di *Green Chemistry* e *Green Engineering*.

estrazione solido-liquido, ciò comporta l'utilizzo di solventi ed impiego di energia nella movimentazione della sospensione risultante e per eventuale riscaldamento. Una *Green*

Extracion si ottiene applicando ad un tale sistema i principi sopracitati. Secondo una definizione in letteratura[14]:

"Green Extraction is based on the discovery and design of extraction processes which will reduce energy consumption, allows use of alternative solvents and renewable natural products, and ensure a safe and high quality extract/product."

Lo scopo è perciò minimizzare l'impatto ambientale ed economico della sezione di estrazione di un impianto scegliendo solventi non dannosi e facilmente smaltibili ed evitando lo spreco di sostanze a elevato valore aggiunto (incrementando il grado di esaurimento della matrice). Di fondamentale importanza è anche evitare processi che richiedano alte pressioni o temperature migliorando così l'efficienza energetica. Anche per la *Green Extraction* sono stati enunciati 6 principi, spiegati come segue (da [14]):

1. Innovazione delle fonti di materia prima tramite la selezione di una grande varietà di materiale di scarto di origine vegetale.
2. Utilizzo di solventi alternativi. Preferire acqua o bio-solventi.
3. Ridurre i consumi energetici incrementando i recuperi di calore ed energia.
4. Produzione di co-prodotti anzichè scarti. Lavoro sinergico con l'industria della bio-raffinazione per valorizzare la matrice vegetale esausta.
5. Ridurre al massimo le operazioni del processo oltre a renderle sicure ed eco-sostenibili.
6. Optare per estratti biodegradabili e prive sostanze contaminanti.

1.3 L'intensificazione dei processi estrattivi.

1.3.1 Generalità e tecniche di intensificazione.

Intensificazione di processo è un termine utilizzato per descrivere quelle tecniche che hanno lo scopo di ridurre le dimensioni dell'impianto industriale e i consumi energetici per una data quantità di prodotto ottenuto [17]. Secondo la definizione riportata da Stankiewicz and Moulijn [18]:

"Any chemical engineering development that leads to a substantially smaller, cleaner, and more energy efficient technology is process intensification"

L'intensificazione di processo si pone perciò lo scopo di andare ad analizzare le singole fasi del processo in esame, migliorando la *performance* dell'intero impianto industriale[17] [18]. Alcuni esempi di processi intensificati sono(adattato da [17]):

- Apparecchiature multifunzionali
- Microreattori
- Microfluidica
- Separazione a membrana assistita da ultrasuoni
- Estrazione intensificata da cavitazione

- Estrazione assistita da microonde
- Micro-miscelazione mediante flussi supersonici

Di nostro interesse è l'intensificazione dell'estrazione tramite cavitazione, il fenomeno di formazione, crescita e infine collasso di cavità di vapore molto piccole nel *bulk* del liquido. L'implosione della cavità genera dei micro-getti di liquido che raggiungono localmente pressioni e temperature elevatissime (centinaia di atm e migliaia di K), pur essendo il sistema macroscopicamente in condizioni molto meno estreme [22][23]. Ciò consente di intaccare intensamente le pareti cellulari della matrice vegetale [20][21], in modo da permettere il rilascio delle sostanze contenute al suo interno. Si guarderà in particolare all'*Ultrasound Assisted Extraction* (UAE), in cui le cavità di vapore vengono create con l'ausilio di onde acustiche ad alta frequenza. I metodi per indurre cavitazione in un liquido possono infatti essere diversi, distinguiamo ad esempio[22]:

- **Cavitazione idrodinamica:** Il fenomeno della cavitazione può essere indotto facilmente facendo passare un flusso liquido ad alta velocità attraverso degli orifici a sezione decrescente. L'incremento di energia cinetica avviene a spese della diminuzione di pressione e, raggiunta la tensione di vapore a quella temperatura, si ottengono le cavità.
- **Cavitazione acustica:** In questo caso la variazione del campo di pressione è causata da onde sonore ad alta frequenza, da 20 kHz a 100 MHz, che ricadono quindi nel campo degli ultrasuoni[22][24]. In base all'intensità delle onde sonore si possono raggiungere pressioni tali da consentire la cavitazione.

Essendo la cavitazione generata da ultrasuoni, in sistemi eterogenei solido-liquido, di particolare interesse allo scopo di questa tesi, se ne darà una spiegazione più approfondita.

1.3.2 L'estrazione assistita da ultrasuoni-UAE.

Gli ultrasuoni, in quanto onde sonore, consistono in cicli di rarefazione/compressione del mezzo in cui si propagano [23]. Un'onda di elevata frequenza e intensità, che si propaga in un mezzo liquido, potrebbe consentire di raggiungere la tensione di vapore del fluido a quella temperatura e quindi generare cavitazione. Alcune delle cavità formatesi sono stabili e possono esistere per diversi cicli di variazione del campo di pressione, altre (dette cavità transitorie) implodono in periodi molto brevi, generando condizioni termodinamiche estreme a livello microscopico. L'implosione di una cavità infatti provoca un aumento della pressione fino a 50 MPa e, conseguentemente, temperature fino a 5000 K (si consideri, come termine di paragone che è pari circa alla temperatura della fotosfera solare)[23], pur restando il mezzo fluido macroscopicamente a temperatura e pressione ambiente. Ciò genera l'espulsione di un getto di liquido (detto micro-getto) che raggiunge velocità di centinaia di chilometri orari[23]. Le onde sonore ad alta intensità consentono inoltre di generare un flusso stazionario di fluido detto *acoustic streaming* o flusso acustico.

L'intensificazione del processo di estrazione di sostanze vegetali mediante cavitazione generata da ultrasuoni può essere spiegata considerando i seguenti fenomeni (da [24]):

- Incremento del *mass transfer* grazie al flusso turbolento microscopico generato dall'implosione delle bolle di cavitazione e all'*acoustic streaming*.

- Danneggiamento delle pareti cellulari vegetali grazie alle onde d’urto e all’azione dei micro-getti che consente il rilascio delle sostanze di interesse nel mezzo. Tale fenomeno è particolarmente visibile ad una scansione SEM (*Scanning Electron Microscopy*, 1.18)
- Incremento della superficie di scambio utile dovuta alla disintegrazione della matrice.
- Velocità di collisione inter-particellare elevata.
- Aumento della penetrazione del solvente nelle porosità intra-particellari.

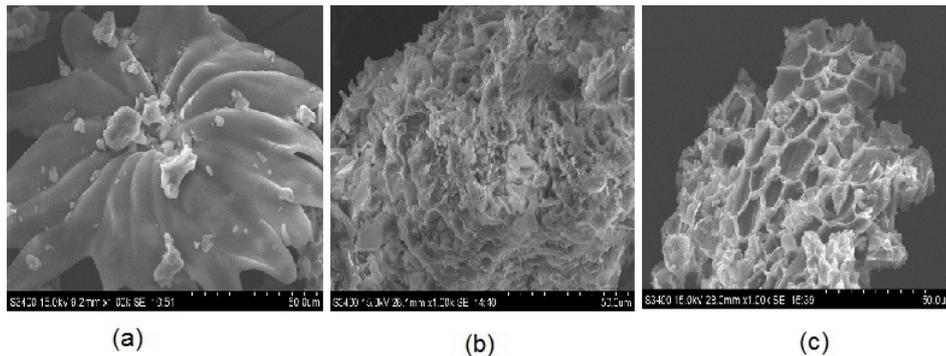


Figura 1.18: Effetto di diversi trattamenti su matrice vegetale di foglie di ulivo, (a) non trattato, (b) estrazione convenzionale, (c) UAE. Adattata da [21]

Se il mezzo utilizzato è l’acqua, si ha in concomitanza la formazione di sostanze radicaliche altamente reattive che contribuiscono alla degradazione della matrice vegetale ed in generale delle sostanze disciolte nel mezzo.

L’efficienza del sistema di estrazione ad ultrasuoni dipende da vari fattori tra cui la configurazione reattoristica, le proprietà del solvente oltre che dalle classiche variabili termodinamiche. Di seguito una spiegazione più dettagliata dell’influenza delle diverse variabili (adattato da [24]):

- **Intensità e frequenza ultrasuoni:** Le frequenze tipiche applicate nel campo delle estrazioni solido-liquido variano da 20 a diverse centinaia di kHz. Generalmente si nota un incremento della resa di estrazione con l’incremento dell’intensità degli ultrasuoni (definita come la quantità di energia acustica emessa per unità di superficie del trasmettitore di onde acustiche). Inoltre è richiesta un’intensità minima, che dipende dalle caratteristiche del sistema, affinché si verifichi la cavitazione. Tuttavia, intensità elevate potrebbero portare a un rapido deterioramento delle parti meccaniche (ampiezza delle vibrazioni più elevata, forze maggiori) oltre che portare a spendere energia non necessaria, che non andrebbe ad incrementare ulteriormente la cavitazione ma solo a movimentare ulteriormente il fluido.
- **Forma e dimensioni reattore:** La progettazione della forma e dimensione del reattore ad ultrasuoni deve essere fatta in modo da minimizzare l’attenuazione delle onde sonore. Inoltre bisogna fare in modo che tutto il fluido sia sottoposto al campo acustico, che penetra solamente per pochi centimetri lontano dalla superficie emittente. Risulta perciò importante prevedere adeguati tempi di permanenza e un’efficiente disposizione dei trasduttori ad ultrasuoni tale da garantire un campo di pressione il più omogeneo possibile.

- **Proprietà del solvente:**La formazione delle cavità dipende dalle forze di coesione molecolare del mezzo fluido ed è ovviamente favorita nel caso di deboli interazioni. Sono quindi da preferire solventi a bassa viscosità e tensione superficiale. Nel caso in cui questo non sia possibile bisogna incrementare l'intensità degli ultrasuoni.
- **Temperatura:**Nonostante un aumento di temperatura consenta di diminuire tensione superficiale e viscosità, ne è associato un incremento della tensione di vapore che è fondamentale affinché ci sia cavitazione. Avvicinandosi alla temperatura di ebollizione del liquido sono meno vigorosi anche gli effetti delle implosioni delle cavità. Per estrazioni in soluzioni acquose si lavora solitamente a T comprese tra 20 °C e 70 °C [24].
- **Matrice solida:**Al fine di garantire un'efficiente cavitazione bisogna scegliere un adeguato rapporto solido-liquido. Nel caso di solidi con porosità interne è fondamentale anche impostare le condizioni del sistema in modo da controllare la dimensione delle bolle di cavitazione.

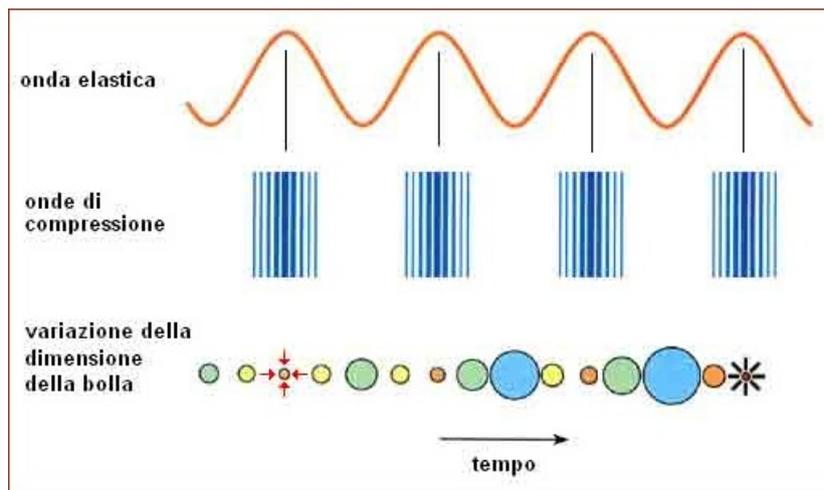


Figura 1.19: Dimensione delle bolle di cavitazione in funzione dei cicli di pressione.

Le configurazioni classiche per la generazione e propagazione di ultrasuoni in un mezzo fluido sono i bagni ad ultrasuoni, costituiti da un recipiente in metallo alla base del quale sono posti i trasduttori, e i *probe-type system* in cui le onde sonore sono trasmesse direttamente al solvente da un *horn* solitamente costituito da leghe di titanio [24]. Entrambi i sistemi hanno un trasduttore piezoelettrico come fonte di energia acustica. I bagni ad ultrasuoni sono più facilmente applicabili su grande scala mentre sistemi *probe-type* consentono una migliore trasmissione dell'energia al solvente. Recentemente ne è stata sviluppata una nuova configurazione, la *cup-horn type*, sviluppata da REUS (Contes, Francia), che consiste in un reattore di acciaio munito di mantello di raffreddamento. Il trasduttore è posto alla base del reattore e questa configurazione è quella più frequente nell'estrazione solido-liquido [24]. Una spiegazione più dettagliata del funzionamento delle apparecchiature citate sarà data nel capitolo successivo.

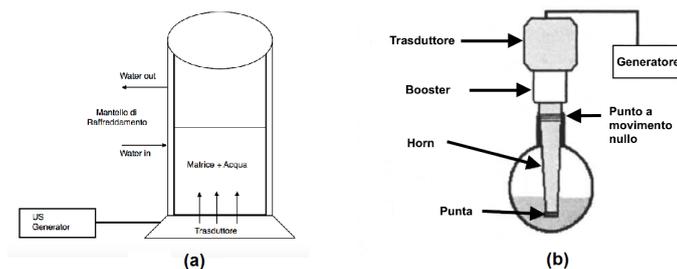


Figura 1.20: Schema delle apparecchiature ad ultrasuoni *cup-horn* (a) e *probe-type* (b).

1.4 Scopo della tesi.

Lo scopo di questo elaborato e dell'attività sperimentale associata è di sviluppare un processo di estrazione assistito da ultrasuoni (US) di sostanze polifenoliche da vinaccia d'uva, utilizzando acqua come unico solvente. Ciò che si vuole realizzare è la sezione di estrazione di un impianto industriale efficiente, che possa coadiuvare il ritorno economico con la tutela dell'ambiente. L'abbandono dell'utilizzo dei solventi classicamente usati nell'estrazione di sostanze da matrici vegetali, principalmente metanolo ed etanolo, consente di eliminare dal processo la fase di recupero del solvente, molto dispendiosa dal punto di vista energetico. Utilizzando solo acqua inoltre, vengono anche meno le tasse da pagare nello smaltimento dell'etanolo (che rimane inevitabilmente imbibito sulla matrice esausta). L'attività sperimentale e la successiva fase di progettazione dovranno quindi chiarire la fattibilità di un tale tipo di processo.

Durante l'attività sperimentale si è cercato di definire su piccola scala tutti i parametri che avrebbero potuto influenzare l'efficienza del processo di estrazione come il rapporto solido-liquido, la temperatura, il numero di stadi estrattivi, la presenza di sostanze che incrementassero o diminuissero la resa in prodotto. L'efficienza dei processi effettuati è stata valutata con la quantificazione dei polifenoli totali estratti, tramite test di Folin-Ciocalteu. Da questo valore sono state costruite le curve cinetiche sperimentali, nelle stesse condizioni, sia per l'UAE che per l'estrazione convenzionale in sistema agitato, in modo da poterne fare un confronto. I dati ottenuti sono poi stati elaborati mediante il modello di Peleg, in modo da ottenere le costanti caratteristiche del modello matematico che descrive la cinetica estrattiva.

La stessa procedura è stata poi seguita per la caratterizzazione di un piccolo impianto pilota costituito da un *high shear homogenizer* nella sezione estrattiva e da un sistema a membrane nella sezione di concentrazione del prodotto. I dati raccolti in questa fase sono stati utilizzati come punto di partenza nella progettazione finale dell'impianto industriale sopra citato.

Nella fase progettuale sono stati definiti tutti i parametri di processo e i criteri di dimensionamento delle apparecchiature della sezione di estrazione, cercando di riprodurre le condizioni delle prove sperimentali. L'impianto considerato è idealmente situato in Piemonte e tratta una quantità di vinaccia di 2000 tonnellate all'anno, conferite durante il periodo classico della vendemmia (10 settembre - 20 ottobre) e processate in un arco temporale di 84 giorni (metà settembre - metà dicembre) per 24 ore al giorno. Nel restante periodo dell'anno l'impianto produttivo potrà essere utilizzato per altri processi estrattivi simili a quello progettato (oleuropeina da foglie di ulivo, licopene da bucce e semi di pomodoro).

Capitolo 2

Descrizione attività sperimentale.

L'attività sperimentale, svolta nel laboratorio di Chimica Organica del Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco (DSTF) presso l'Università di Torino, comprende diverse prove volte alla determinazione delle variabili necessarie alla progettazione dell'impianto di estrazione industriale. In particolare sono state effettuate diverse prove estrattive, convenzionali e non, per la determinazione del contenuto di polifenoli, oltre ad altri esperimenti necessari a definire le condizioni ottimali (rapporto S/L, contenuto di umidità, granulometria, contenuto organici e ceneri). Le operazioni eseguite durante la conduzione degli esperimenti derivano da ricerche in letteratura o da procedure comunemente seguite nel laboratorio di DSTF. Sono state condotte alcune prove anche su di un impianto "pilota", allestito al piano inferiore del laboratorio, costituito da una sezione di estrazione in "*high shear homogenizer*" (KONMIX, Cina) e da una di concentrazione, un sistema di separazione a membrana polimerica (fornito da Hydro Air Research). L'impianto pilota e quindi le considerazioni associate allo scale-up industriale del sistema, saranno tuttavia considerate in seguito, mentre in questo capitolo ci si limiterà a descrivere la sola attività da banco svolta in laboratorio.

2.1 Stoccaggio, caratterizzazione e pretrattamento della matrice.

La vinaccia d'uva rossa (*grape pomace*) è fornita da Cantine Ascheri di Bra (CN), proveniente da coltivazioni biologiche piemontesi, raccolta durante la vendemmia dell'anno 2018 e derivante dal processo di vinificazione della stessa annata. La matrice solida viene conservata in contenitori di plastica a -18°C , fino al momento dell'utilizzo. Ponendo una quantità nota di solido in una muffola (Gelman Instrument) e misurandone la variazione di peso, sono stati determinati il contenuto di acqua (12 ore a 100°C) e ceneri inorganiche (4 ore a 650°C) (vedi tab. 2.1). L'altra operazione di caratterizzazione ha riguardato la determinazione della curva granulometrica successiva alla fase di pre-trattamento. Le procedure di pre-trattamento del solido, che portano ad ottenere dalla vinaccia integra il solido che da ora in avanti sarà denominato "TIPO 1", sono descritte di seguito:

- **Crio-macinazione in *blender* da laboratorio:** Matrice congelata in azoto liquido e sminuzzata in un blender Waring Blender modello HGBTWTS360, alla massima velocità per 20 secondi.
- **Crio-macinazione in ball-mill:** Matrice congelata in azoto liquido e sminuzzata ulteriormente in ball-mill (RETSCH modello PM100) a 550 RPM (giri al

minuto), per la durata di 15 minuti. Il senso di rotazione viene invertito ogni 5 minuti, dopo un arresto momentaneo di un minuto al fine di evitare l'eccessivo surriscaldamento del solido.

Prova	min(g)	mfin(g)	%w/w
UMIDITA'	0.2370	0.1440	40
CENERI	0.1440	0.0119	5

Tabella 2.1: Contenuto di acqua e ceneri inorganiche.

Dopo la macinazione, mediante setacci a maglie decrescenti (Setacci Giuliani serie ASTM), è stata ottenuta la curva granulometrica riportata in tab.2.2 e nel grafico di fig.2.1.

Dimensione (μm)	Massa ritenuta (g)	% massa
1000	1.9827	22
500	2.262	25
212	3.5569	40
38	1.1351	13

Tabella 2.2: Curva granulometrica della matrice "TIPO 1"

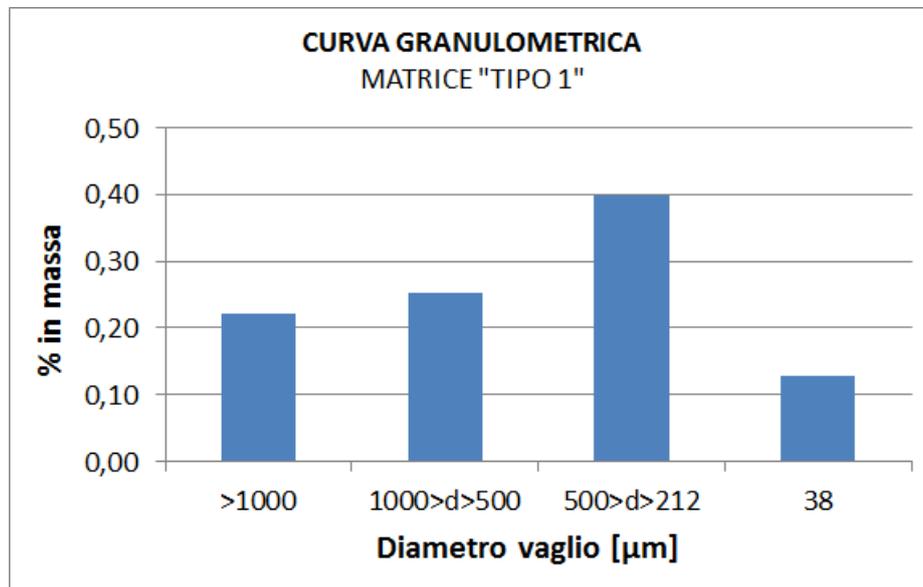


Figura 2.1: Curva granulometrica della matrice "TIPO 1".

2.2 Estrazione dei polifenoli. Apparecchiature e metodi.

L'estrazione di polifenoli dalla vinaccia è stata eseguita utilizzando differenti tecniche. In particolare sono state usate due tipologie di apparecchiature ad ultrasuoni, '*cup-horn*' e '*probe-type*', oltre ad un sistema per l'estrazione a ricadere a riflusso e un sistema ad agitazione meccanica.

2.2.1 Estrattore "*cup-horn*" type.

Il sistema '*cup-horn*' utilizzato, simile ad un bagno ad ultrasuoni, è prodotto da REUS (Contes, Francia). L'estrattore è costituito da un contenitore cilindrico di acciaio inox (diam.:10 cm, altezza:14 cm) della capacità di 1 L [25]. Il trasduttore piezoelettrico è posto alla base della camera di estrazione (per maggiori dettagli si veda figura 2.2) ed è collegato ad un generatore di ultrasuoni a 24 kHz della potenza nominale fissa di 200 W. Il generatore è inoltre provvisto di timer (da 0 a 60 minuti). Una camicia di raffreddamento esterna alla camera di estrazione, consente di contenere l'aumento di temperatura dato dalla dissipazione dell'energia acustica. La quantità di energia ceduta effettivamente al sistema solvente-solido è stata calcolata con l'ausilio di prove calorimetriche (vedi 3.2).



Figura 2.2: Sistema '*cup-horn*' (REUSS) utilizzato nelle prove sperimentali.

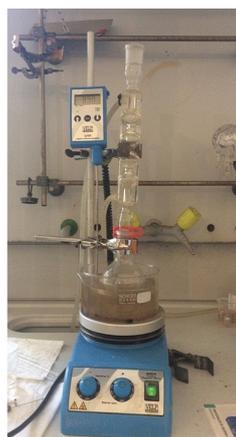
2.2.2 Estrattore "*probe-type*".

Le onde acustiche vengono generate sempre mediante un trasduttore piezoelettrico, stavolta posto alla sommità del sistema (vedi figura 2.3). Segue un *booster*, intermedio tra il trasduttore e l'*horn* vero e proprio, il quale ha la funzione di aumentare l'ampiezza dell'onda prodotta dal generatore. Infine l'*horn*, collegato al *booster* nel punto di minima sollecitazione, detto punto a movimento nullo (o *null point*). Nel sistema utilizzato, l'*horn* è di forma cilindrica (diam. sommità:1,3 cm) ed è costituito da una lega di

titanio. Il generatore di ultrasuoni (*Hainertec type HNG-20500-SP*) emette onde alla frequenza di 21,2 kHz con una potenza modulabile tra 350 W e 500 W. Come nel caso precedente, la potenza effettiva è stata calcolata con prove calorimetriche. In tal caso, come camera di estrazione si utilizza un beaker in vetro pyrex da 250 mL mantenuto in posizione mediante pinza e ritto (figura 2.3). Il raffreddamento deve essere eseguito necessariamente utilizzando un bagno di acqua e ghiaccio, non essendoci la predisposizione per un raffreddamento in continuo (si rivela quindi complicato mantenere un valore stazionario di temperatura).



(a)



(b)

Figura 2.3: Sistema 'probe-type' (a) e a riflusso (b) utilizzati nell'attività sperimentale.

2.2.3 Estrattore a riflusso.

Al fine di determinare il contenuto di polifenoli presenti complessivamente nella matrice è stato utilizzato un sistema di estrazione a riflusso. Il campione da trattare è posto insieme al solvente in un pallone di vetro pyrex da 250 mL. Il contenuto del pallone, mantenuto alla temperatura desiderata grazie ad un bagno termostatico (olio silconico) controllato con termocoppia, è messo in agitazione grazie a un'ancoretta magnetica. La camera di estrazione è collegata, alla sua sommità, ad un condensatore a bolle raffreddato con acqua di rete che consente il riflusso del solvente evaporato (per maggiori dettagli si veda figura 2.3). Questa apparecchiatura, con identico set-up, è stata usata anche per l'operazione di degrassaggio della matrice, sostituendo l'esano al solvente acquoso.

2.2.4 Estrazione in sistema ad agitazione meccanica.

L'estrazione convenzionale in sistema agitato è stata condotta utilizzando come camera di estrazione un beaker da 250 mL in vetro pyrex, immerso in un bagno termostatico di olio silconico al fine di mantenere la temperatura del solvente costante e sul valore desiderato. Per l'agitazione è stato utilizzato un agitatore meccanico (VELP Scientifica, modello *Stirrer LS*). La configurazione tipica è mostrata in figura 2.4.

2.2.5 Metodologia di estrazione.

In ogni operazione di estrazione sia in US che in sistema agitato, sono stati utilizzati 10 g di matrice "TIPO 1" e la temperatura è stata mantenuta a 35 °C. Si è scelto un



Figura 2.4: Sistema con agitatore utilizzato nell'attività sperimentale.

valore di temperatura basso così da evitare inutili sprechi di energia per il riscaldamento, degradazione termica dei polifenoli e inefficienza degli ultrasuoni. Il solvente, secondo un rapporto solido-liquido di 1 g/30 mL ottimizzato in fase preliminare (vedere sezione 3.1), è stato preriscaldato fino alla temperatura operativa e poi posto nella camera di estrazione insieme al solido. Negli esperimenti eseguiti con il sistema "cup-horn", il raffreddamento è stato eseguito utilizzando acqua di rete mentre, per il sistema "probe-type", ponendo il beaker di vetro (camera di estrazione) in un bagno di ghiaccio fondente.

Nelle estrazioni a riflusso, è stato utilizzato lo stesso rapporto solido-liquido, processando però solamente 2 g di solido (sempre del "TIPO 1"). In tal caso la temperatura è stata mantenuta pari a quella di ebollizione del solvente. In ogni esperimento si è cercato di limitare il più possibile lo scostamento della temperatura da quella di set-point e l'irraggiamento luminoso (i polifenoli risultano essere anche foto-sensibili).

2.2.6 Operazioni post-estrazione.

Successivamente ad ogni estrazione, la sospensione solido-liquido ottenuta è stata filtrata con un filtro di vetro sinterizzato (dimensione dei pori da 40 a 100 μm) utilizzando un sistema sottovuoto (beuta codata, su cui viene posto il filtro, collegata ad una pompa da vuoto). Il solido, durante la filtrazione, è stato lavato con ulteriore solvente, così da recuperare tutti i soluti in esso contenuti. Una seconda operazione di filtrazione viene poi eseguita nello stesso filtro con l'aggiunta di carta filtrante, in modo da ritenere ogni residuo di solido. Il liquido estratto è stato misurato in un cilindro graduato e ne è stata

prelevata una quantità pari a 100 mL, poi centrifugata (4000 RPM, 30 minuti). Una quantità pari a 50 mL del surnatante in uscita dalla centrifuga viene infine congelato con azoto liquido in un pallone di vetro pyrex da 100 mL e posto a liofilizzare a -70°C e 0,2 mbar (liofilizzatore Telstar LyoQuest). Viene infine recuperato e pesato l'estratto secco. L'ultima fase di evaporazione del solvente, la liofilizzazione, può essere sostituita da un'evaporazione in rotavapor (LabTech, EV311H) senza che vi siano significative differenze nel contenuto di polifenoli dell'estratto secco finale. Questo passaggio in rotavapor, non può essere evitato quando si utilizzano solventi diversi da acqua. Questo perché il principio della liofilizzazione sfrutta il suo punto critico, e perché solventi più volatili potrebbero danneggiare la pompa del sistema.

2.3 Analisi dei dati.

2.3.1 Quantificazione dei polifenoli totali.

Il contenuto di polifenoli totali (*Total Polyphenols Content-TPC*) nell'estratto secco è stato determinato con il metodo di Folin-Ciocalteu. Utilizzando l'acido gallico come standard è stata ottenuta una retta di taratura che permette di correlare l'assorbanza di raggi UV (letta mediante spettrometro Cary 60 UV-VIS, della Agilent Technologies) al TPC (di cui si ottiene la misura in equivalenti di acido gallico o *Gallic Acid Equivalent-GAE*). La retta è stata costruita misurando l'assorbanza a 725 nm di campioni a concentrazione nota di acido gallico, per diversi volumi di soluzione dello standard (vedi grafico in fig. 2.5). Nel caso della determinazione di TPC per l'estratto di vinaccia, la soluzione dello standard viene sostituita con una soluzione a concentrazione nota dell'estratto in acqua deionizzata, detta soluzione madre. La procedura di preparazione dei campioni è descritta di seguito:

- **Preparazione soluzione madre:** Si pesa una quantità di estratto, ottenuto dalla precedente liofilizzazione, e la si solubilizza in un volume noto di acqua in modo che non vi siano particelle in sospensione (la solubilizzazione può essere incentivata sonicando il campione per pochi secondi). La concentrazione della soluzione madre deve essere tale che l'assorbanza UV del campione più concentrato, non vada oltre i limiti della retta di taratura precedentemente descritta (sono accettabili valori di assorbanza compresi tra 0,07 e 0,55).
- **Preparazione campioni:** Si preparano i campioni da analizzare aggiungendo alla soluzione madre i seguenti reagenti:
 1. Acqua deionizzata
 2. Na_2CO_3 in soluzione acquosa al 10% w/w
 3. Dimetilsolfossido (DMSO) in soluzione acquosa al 50% v/v
 4. Reattivo di Folin-Ciocalteu (soluzione di fosfomolibdato e fosfotungstato) in soluzione acquosa al 50% v/v

Dopo l'aggiunta di questi reagenti si agita energicamente e si attende il procedere della reazione per 25 minuti. La reazione tra i fenoli presenti nell'estratto e i reagenti provoca un cambiamento del colore della soluzione. Il viraggio è tanto più pronunciato quanto maggiore è la presenza di polifenoli nel campione (vedere figura 2.6) e sarà quindi più alta anche l'assorbanza agli UV. Le quantità dei vari componenti in ogni campione sono riassunte in tabella 2.3.

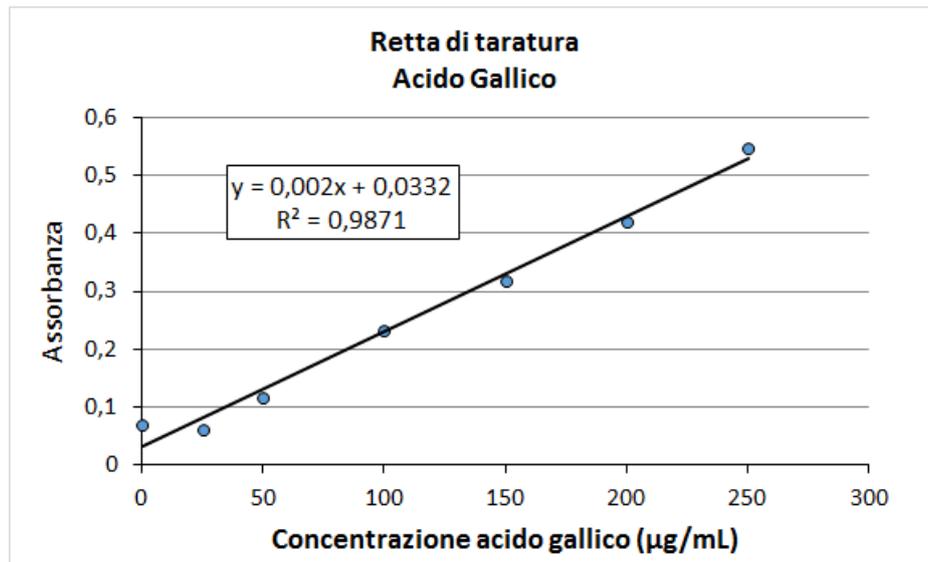


Figura 2.5: Retta di taratura dell'acido gallico.

	CAMPIONI						
	0	1	2	3	4	5	6
<i>Sol.madre</i> [μL]	0	25	50	100	150	200	250
<i>DMSO</i> [μL]	250	225	200	150	100	50	0
<i>H₂O</i> [mL]	4						
<i>Na₂CO₃</i> [μL]	500						
<i>Folin</i> [μL]	250						

Tabella 2.3: Campioni analisi Folin-Ciocalteu.

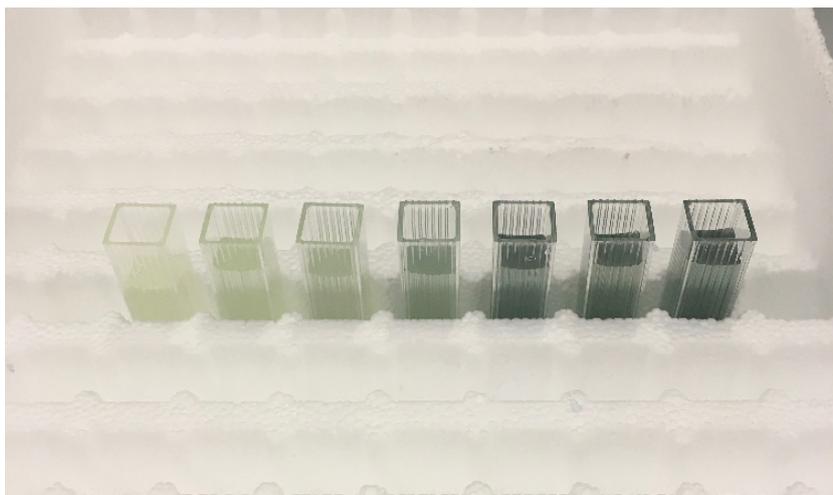


Figura 2.6: Viraggio progressivo campioni a volume di soluzione madre crescente.

La procedura per la determinazione del TPC a partire dal valore di assorbanza a 725 nm è la seguente:

- Al valore di assorbanza ottenuto dallo spettrometro, si sottrae il valore dell'intercetta con l'asse delle ordinate della retta di taratura detto q , si divide poi per il coefficiente angolare della stessa retta detto m . Si ottengono così i $\frac{\mu g}{mL}$ di acido gallico equivalenti presenti nella soluzione.

$$GAE = \frac{ABS - q}{m}; \quad (2.1)$$

- Si calcola il fattore di conversione vol. estratto tot./vol. liofilizzato.
- Si calcola il fattore di conversione Estratto/PF tot., dividendo la concentrazione della soluzione madre del campione per il valore di GAE ottenuto al punto precedente.
- Si può ora calcolare l'estratto secco totale partendo dal valore dell'estratto secco ottenuto dalla liofilizzazione del campione:

$$Estrattosecco_{Tot} = Massa_{Liof.} \frac{mL_{Estratto}}{mL_{liof.}} \quad (2.2)$$

- Si calcola infine la massa totale di polifenoli nell'estratto mediante la (2.3)

$$Polifenoli_{Tot} = Estrattosecco_{Tot} \frac{GAE_{sol.madre}}{Concentrazione_{sol.madre}} \quad (2.3)$$

Se si necessita della quantità specifica, ovvero il TPC a unità di massa di solido in $\frac{mg_{GAE}}{mg_{solido}}$, si divide la (2.3) per la massa di matrice utilizzata nell'estrazione.

2.3.2 Cinetica di estrazione.

Per definire la cinetica di estrazione dei polifenoli è stato utilizzato il modello di Peleg. Tale modello, nato inizialmente per descrivere l'assorbimento di umidità da cibi secchi, è descritto da una curva iperbolica definita dalla seguente equazione e rappresentato dal grafico in figura 2.7 [26]:

$$M(t) = M_0 + \frac{t}{k_1 + k_2 t} \quad (2.4)$$

Dove:

- $M(t)$ Quantità di umidità al tempo t
- M_E Quantità di umidità all'equilibrio
- M_0) Quantità di umidità iniziale
- k_1 e k_2 Costanti caratteristiche del sistema in esame
- t Tempo.

Questo modello, con le opportune modifiche, può essere utilizzato anche allo scopo di descrivere la cinetica di un'estrazione solido-liquido. In particolare bisogna riscrivere la (2.4) come segue:

$$y(t) = y_0 + \frac{t}{k_1 + k_2 t} \quad (2.5)$$

Dove:

- $y(t)$ TPC nel solvente al tempo t , espressa in $\frac{mg_{GAE}}{mg_{DM}}$. Per DM si intende "Dry matter".
- y_0 TPC nel solvente al tempo iniziale, espressa in $\frac{mg_{GAE}}{mg_{DM}}$. Nel nostro caso y_0 è pari a zero.
- k_1 Definita come *initial extraction rate constant* le cui unità di misura sono $\frac{min * mg_{GAE}}{mg_{SDB}}$.
- k_2 Definita come *capacity constant* le cui unità di misura sono $\frac{mg_{DM}}{mg_{GAE}}$.
- t_E è il tempo di estrazione.

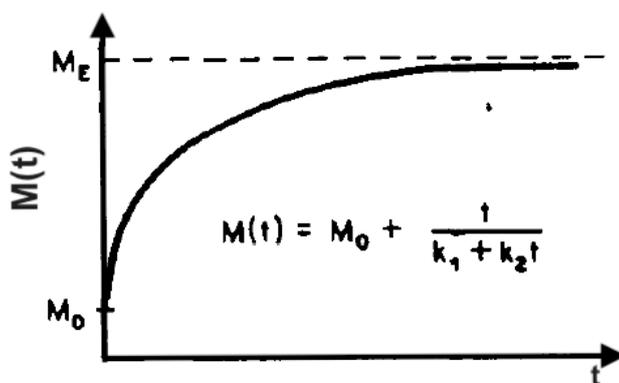


Figura 2.7: Modello di Peleg. Rappresentazione.

Da k_1 è possibile calcolare la *Extraction Rate constant*, indicata con B_0 , secondo la(2.6). Questa costante può essere calcolata a diversi tempi di estrazione ($B_0(t)$), definita da (2.7) in modo da poter valutare la velocità di scambio tra le due fasi lungo tutta la durata del processo estrattivo. Si sceglierà il punto in cui B_0 è massimo in quanto corrisponderà anche il massimo coefficiente di scambio di materia ($k_L a$, di cui si discuterà a breve), condizione operativa che consente di minimizzare la dimensione dell'impianto. La k_2 è invece correlata alla concentrazione massima di equilibrio (c_{eq} , indicata con Y_S) tramite la (2.8):

$$B_0 = \frac{1}{k_1}; \quad (2.6)$$

$$B_0(t) = \frac{1}{k_1(t)}; \quad (2.7)$$

$$Y_S = \frac{1}{k_2}; \quad (2.8)$$

Per calcolare le costanti caratteristiche del processo partendo dai dati sperimentali, è necessario eseguire una linearizzazione della (2.5) [26], ottenendola nella forma (2.9)

$$\frac{t}{y(t)} = k_1 + k_2 t \quad (2.9)$$

Se quindi si diagramma in un piano cartesiano $\frac{t}{y(t)}$ in funzione di t , si ottengono i parametri desiderati come coefficiente angolare (k_2) e intercetta con l'asse delle ordinate (k_1) della retta ottenuta dalla linearizzazione in (2.9).

Per ricavare invece $k_L a$ (coefficiente di scambio volumetrico) si parte dalla legge della diffusione di Fick come indicato dalle relazioni . Si adottano le seguenti ipotesi semplificative :

- Temperatura, pressione e volume costanti, quindi di conseguenza, costante anche la diffusività D ;
- Il "film" di diffusione in cui vi è il gradiente di concentrazione, di spessore δ è stagnante;
- La concentrazione nel *bulk* del liquido, considerato come perfettamente miscelato, è costante;
- Si considera per semplicità, il fenomeno di diffusione in geometria piana. La distanza dalla superficie del solido è indicata con z ;
- Problema mono-dimensionale. Trasporto di materia considerato solo lungo z e pari a zero per ipotesi lungo le altre direzioni.

Si definisce il flusso di materia del generico componente A mediante la legge di Fick:

$$J_{A_z} = -D_A \frac{dC_{A_z}}{dz} \quad (2.10)$$

Dal bilancio di materia, secondo le ipotesi fatte prima, si ha che il flusso del componente è costante lungo la direzione z . Si ottengono quindi le seguenti relazioni:

$$\frac{J_{A_z}}{dz} = 0 \quad (2.11)$$

$$J_{A_z} = J_A \quad (2.12)$$

Sostituendo la definizione di flusso nella (2.11):

$$-D_A \frac{d^2 C_{A_z}}{dz^2} \quad (2.13)$$

Da una prima integrazione si ottiene poi la (2.14)

$$-D_A \frac{dC_{A_z}}{dz} = C_1 \quad (2.14)$$

Integrando ulteriormente secondo la (2.15) si ottiene infine il profilo della concentrazione a meno delle costanti

$$\int dC_{A_z} = - \int \frac{C_1}{D_A} dz \quad (2.15)$$

$$C_{A_z} = - \frac{C_1}{D_A} z + C_2 \quad (2.16)$$

Per il calcolo delle costanti si ricorre alle seguenti condizioni (2.17) e (2.18)

$$z = \delta \longrightarrow C_A = C_{A_\delta} \quad (2.17)$$

$$z = 0 \longrightarrow C_A = C_{AS} \quad (2.18)$$

Il valore delle costanti è dato dalla (2.19) e (2.21)

$$C_2 = C_{AS} \quad (2.19)$$

$$-\frac{C_1}{D_A}\delta + C_{AS} = C_{A\delta} \quad (2.20)$$

$$-\frac{C_1}{D_A}\delta + C_{AS} = C_{A\delta} \longrightarrow C_1 = \frac{D_A}{\delta}(C_{AS} - C_{A\delta}) \quad (2.21)$$

Il flusso può essere definito anche mediante un coefficiente di scambio di materia superficiale, introdotto mediante la seguente equazione:

$$J_A = k_L(C_{AS} - C_{A\delta}) \quad (2.22)$$

Manipolando i termini e integrando si ottiene

$$k_L a(C_{AS} - C_A(t)) = \frac{dC_A(t)}{dt} \quad (2.23)$$

$$\int k_L a dt = \int \frac{dC_A(t)}{(C_{AS} - C_A(t))} \quad (2.24)$$

Per il calcolo della costante nella (2.25) si utilizza la condizione iniziale data dalla (2.26)

$$k_L a t = \ln(C_{AS} - C_A(t)) + C_3 \quad (2.25)$$

$$t = 0 \longrightarrow C_A(t) = 0 \quad (2.26)$$

$$C_3 = -\ln(C_{AS}) \quad (2.27)$$

Infine si ottiene la relazione per $k_L a$

$$k_L a = \frac{\ln\left(\frac{C_{AS} - C_A(t)}{C_{AS}}\right)}{t} \quad (2.28)$$

La (2.28) consente di calcolare $k_L a$ partendo dalla conoscenza dei valori sperimentali di C_{AS} e di $C_A(t)$ ai diversi tempi di estrazione.

2.3.3 Bilanci di energia.

Al fine di determinare la potenza effettiva ceduta dal sistema ad ultrasuoni al mezzo fluido, sono stati eseguiti dei bilanci di energia sia sul sistema 'cup-horn' che sul 'probe-type'. In entrambi i casi è stata utilizzata solo acqua e la zona contenente il solvente è stata coibentata con del materiale isolante al fine di evitare ogni dispersione di calore verso l'ambiente esterno. Per ogni prova sono stati utilizzati 300 g di acqua deionizzata. La misurazione della temperatura è stata eseguita con una termocoppia e il calcolo della potenza effettivamente ceduta al solvente è stato infine eseguito utilizzando la (2.29).

$$P = mc_P \frac{dT}{dt} \quad (2.29)$$

I risultati ottenuti possono essere consultati nel capitolo successivo alla sezione 3.2

2.4 Analisi qualitative e quantitative.

2.4.1 Analisi HPLC-DAD.

Le analisi HPLC-DAD sono state eseguite utilizzando una 'Waters binary pump 1525' abbinata ad un detector ('2998 photodiode array (PDA) detector'). Gli eluenti impiegati nella colonna cromatografica (tipo *Sinergy 4 μ m Hydro-RP 80 Å*, 250 x 4,6 mm) sono soluzioni acquose allo 0,1 % di acido formico (A) e acetonitrile (B). Sono stati utilizzati due metodi a gradiente, quello degli acidi fenolici (assorbanza massima a 340 nm) e quello delle catechine (assorbanza massima a 280 nm). L'andamento del gradiente utilizzato nella separazione nella colonna cromatografica è riportato nelle tabelle 2.4 e 2.5. Il volume di iniezione è pari a 20 μ L con flusso di 1 mL/min. Prima dell'analisi, lo strumento è stato tarato utilizzando i diversi composti standard. I risultati della taratura sono consultabili nelle immagini a conclusione di questa sezione (figure 2.8-2.10). Come si può notare, nelle immagini sono raccolti anche i valori della retta di taratura che sarà utilizzata successivamente nella quantificazione dei composti.

Tempo (min)	%A	%B
0	100	0
6,50	100	0
30	50	50
36	0	100
42	0	100

Tabella 2.4: Metodo degli acidi fenolici.

Tempo (min)	%A	%B
0	92	8
3	92	8
21	50	50
33	0	100
45	0	100

Tabella 2.5: Metodo delle catechine.

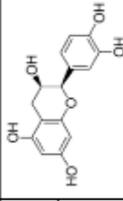
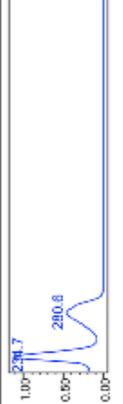
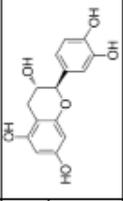
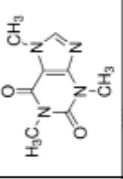
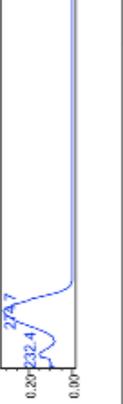
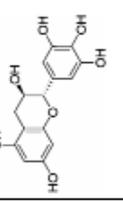
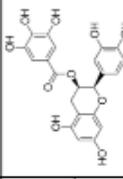
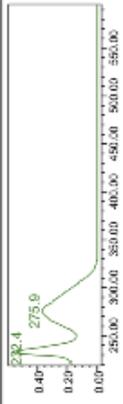
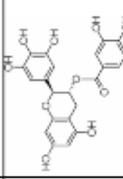
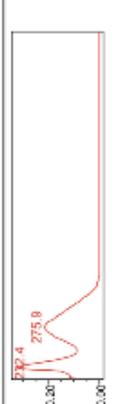
Composto	Formula	MW	UV spectrum	Metodo HPLC	λ (nm) area HPLC	R_s [min]	Regressione lineare		
							a	b	R2
(-)-Epicatechin >=90%		290.27		Acidi Fenolici Catechine	280	26,28 20,99	19.246.401,9 -18.168.994,3*	197.966,6 -18.248,6*	0,996 1,000
(-)-Epicatechin (from Green Tea Cat mix Cerilliant 0.1001 mg/ml)				Catechine		21,10	15.822.086,1*	3.730,1*	1,000
(+)-Catechin >=99%		290.27		Catechine	280	16,4			
(+)-Catechin (from Green Tea Cat mix Cerilliant 0.1000 mg/ml)				Catechine		16,56	16.097.740,8	566,7	0,999
Caffeine (from Green Tea Cat mix Cerilliant 0.1000 mg/ml)		194.19		Catechine	280	20,4	57.002.093,9	55.390,3	0,999
(-)-Gallicocatechin (from Green Tea Cat mix Cerilliant 0.1000 mg/ml)		306.27		Catechine	280	7,65	4.693.475,5	- 3.263,9	0,999
(-)-Epigallocatechin 3- gallate >=80%		458.37		Catechine	280	21,6	33.967.761,0	-78.132,4	0,998
(-)-Epigallocatechin 3- gallate (from Green Tea Cat mix Cerilliant 0.1000 mg/ml)				Catechine	280		27.969.516,3	- 81.311,7	1,000
(-)-Gallicocatechin 3-gallate (from Green Tea Cat mix Cerilliant 0.1001 mg/ml)		458.37		Catechine	280	23,4	30.435.268,8	- 92.381,2	1,000

Figura 2.8: Taratura HPLC-DAD.

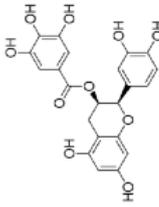
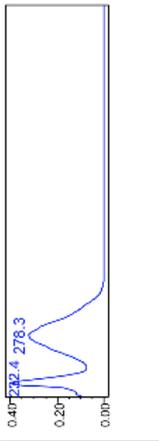
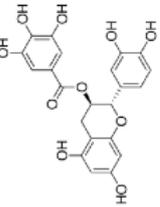
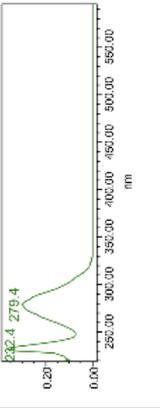
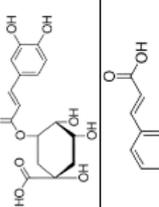
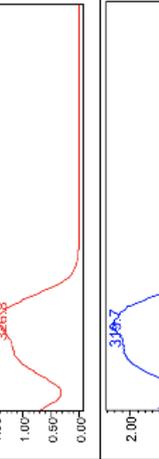
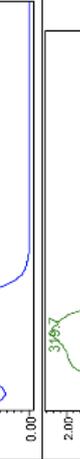
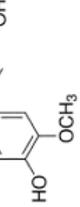
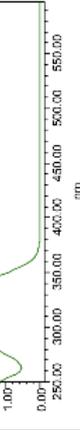
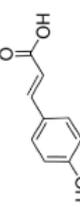
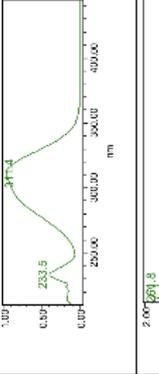
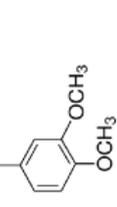
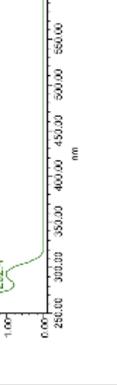
(-)-Epicatechin 3-gallate (from Green Tea Cat mix Cerilliant 0.1000 mg/ml)			Catechine	280	27.4	37.738.725,5	1.550,1	1.000
(-)-Catechin 3-gallate (from Green Tea Cat mix Cerilliant 0.09998 mg/ml)			Catechine	280	28.16	38.103.747,3	- 103.741,7	1.000
Chlorogenic acid			Acidi Fenolici	340	24.8	54.804.533,4	- 2.738,6	0,999
Caffeic acid			Acidi Fenolici	340	26.5	90.220.998,2	114.048,4	0,999
Ferulic acid			Acidi Fenolici	340	30.02	91.718.218,1	61.329,6	1.000
<i>p</i> -Cumaric acid			Acidi Fenolici	340	29.5	36.055.298,9	159.980,5	0,998
Veratric acid			Acidi Fenolici	280	30.7	35.018.911,0	42.935,9	1.000

Figura 2.9: Taratura HPLC-DAD.

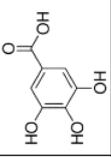
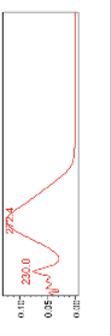
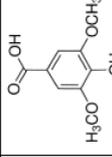
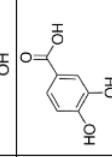
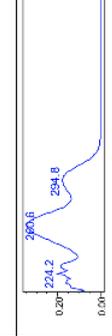
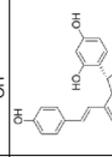
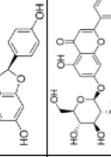
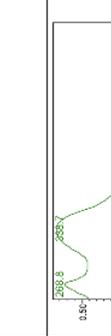
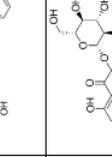
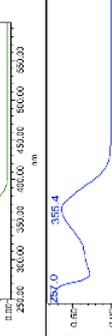
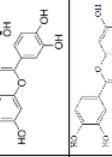
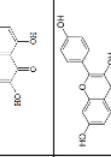
Galic acid		170.12		Acidi Fenolici	280	10.7	57.392.414,2	80.505,2	1,000
Siringic acid		198.17		Acidi Fenolici	280	27.1	70.765.832,6	116.551,4	1,000
Protocatechuic acid		154.12		Acidi Fenolici	280	21.4	30.605.510,8	94.935,4	0,999
Epsilon-viniferin >=95%		454.47		Acidi Fenolici	340	35.54	78.147.121,4	- 31.237,5	1,000
Apigenin-7-glucoside >=97%		432.38		Acidi Fenolici	340	30.01	62.637.283,9	235.107,5	0,993
Quercetin-3-glucoside >=98%		464.38		Acidi Fenolici	340	28.7	40.890.369,5	- 14.146,1	1,000
Quercetin (to be repeated)		302.23		Acidi Fenolici	340	??	??	??	??
Kaempferol (to be repeated)		286.23		Acidi Fenolici	340	??	??	??	??

Figura 2.10: Taratura HPLC-DAD.

Capitolo 3

Risultati.

3.1 Determinazione del rapporto solido-liquido ottimo.

Per determinare il rapporto solido-liquido (S/L) ottimizzato, sono state eseguite delle estrazioni nel sistema US di tipo 'cup-horn' della durata di 15 minuti ed è stato calcolato poi il valore di TPC, secondo le metodologie precedentemente indicate. Sono stati considerati quattro valori partendo da dati raccolti in letteratura. I risultati sono riassunti nella tabella 3.1. Come è possibile notare dal grafico in figura 3.1, il valore del rapporto S/L migliore tra quelli analizzati risulta essere pari a 1 g/30 mL. Andare oltre il rapporto di 1 g/30 mL non è stato considerato conveniente in vista dello scale-up finale (elevate portate in gioco, contro i canoni dell'intensificazione di processo).

$S/L(g/mL)$	$TPC(\frac{mg_{GAE}}{mg_{DM}})$
1/30	4,48
1/25	3,18
1/20	2,64
1/15	2,36

Tabella 3.1: Influenza del rapporto solido-liquido sul TPC.

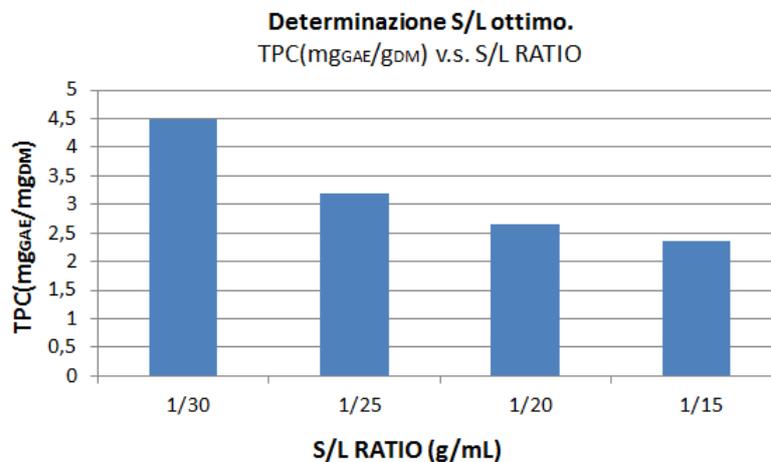


Figura 3.1: Andamento del TPC in funzione del rapporto solido-liquido.

3.2 Bilanci di energia.

Per determinare la potenza effettiva ceduta dagli ultrasuoni al sistema, sono stati eseguiti dei bilanci di energia secondo la metodologia riportata in sezione 2.3.3. Le costanti termodinamiche necessarie sono tabulate in letteratura scientifica [27]. Per il calcolo dell'efficienza, indicata con η , si è supposto che gli strumenti assorbissero dalla rete elettrica tutta la potenza nominale di targa. Misurazioni più precise, che non rientrano nei nostri scopi, possono essere condotte con l'ausilio di una pinza amperometrica. Di seguito sono riassunti i risultati ottenuti sia per il sistema 'cup-horn' (tabella 3.2) sia per il sistema 'probe-type' (tabella 3.3).

$t(sec)$	$\Delta T(T_0 = 34,1^\circ C)$	$\Delta T(T_0 = 50,8^\circ C)$	$\Delta T(T_0 = 53,4^\circ C)$
0	34,1	50,8	53,4
15	35,3	51,4	54,1
20	35,4	51,6	54,2
30	35,9	52	54,5
40	36,4	52,4	54,9
50	36,9	52,8	55,3
60	37,4	53,2	55,7
$\eta(\%)$	34	25	24

Tabella 3.2: Prove calorimetriche *cup-horn*, REUS.

$t(sec)$	$T(^\circ C)$
0	22,8
30	24,3
60	26
90	27,5
120	29,1
150	30,7
$\eta(\%)$	13

Tabella 3.3: Prove calorimetriche sistema *probe-type*.

Si può notare come l'efficienza di trasmissione di energia del sistema *probe-type*, pari al 13 %, sia nettamente inferiore a quella del *cup-horn* (che varia dal 34 % al 24 %) , anche se misurata ad una temperatura media minore. La potenza trasmessa infatti risulta dipendere fortemente dalla temperatura del mezzo fluido, che influenza la cavitazione come spiegato in sezione 1.3.2.

3.3 Degrassaggio della matrice.

Per determinare l'influenza del contenuto lipidico della matrice sulla cinetica di estrazione, sono state eseguite delle operazioni di degrassaggio in esano come indicato alla sezione 2.2.3. In particolare l'operazione è stata condotta sia a caldo (3 ore a T_{EB} esano) e a freddo (24 ore a T_{AMB}), senza riscontrare nessuna differenza significativa tra le due metodologie. Il ridotto contenuto di grassi rilevato, nell'ordine di $80 \frac{mg}{g_{DM}}$,

ha portato a dedurre che non fosse necessario eseguire ulteriori prove a riguardo. La frazione lipidica risulta così bassa probabilmente perché i vinaccioli, la parte ricca di lipidi, vengono poco intaccati dal pre-trattamento, perciò lo scambio tra questa frazione della matrice solida ed il solvente organico risulta sfavorita. Nella tabella 3.4 sono riassunti le condizioni sperimentali ed i risultati di queste prove.

	Estrazione a caldo	Estrazione a freddo
$m_S(g)$	5	5
$V_{Esano}(mL)$	75	75
$V_{Reatt.}(mL)$	250	250
$v_{Stirrer}(RPM)$	350	350
$V_{Soluz.}(mL)$	82,6	83,3
$t(h)$	3	24
$T(^{\circ}C)$	68	25
$m_{extr.secco}(mg/g_{DM})$	87	95,5

Tabella 3.4: Prove di degrassaggio in esano.

3.4 Estrazione convenzionale a ricadere.

Le prove di estrazione convenzionale sono state eseguite con solvente a ricadere secondo le metodologie e con le apparecchiature descritte nella sezione 2.2, al fine di determinare il contenuto totale di polifenoli estraibili dalla matrice. I valori ottenuti sono stati utilizzati come *target* per le successive estrazioni in ultrasuoni. Le prove sono state eseguite utilizzando i seguenti solventi:

- H_2O
- $H_2O + HCl$ al 36 % (pH=2,5)
- $H_2O + EtOH$ al 50 % v/v

Secondo i risultati, raccolti in tabella 3.5, si nota che il solvente di elezione per l'estrazione del prodotto desiderato è la soluzione $H_2O + EtOH$ al 50 % v/v con un valore di TPC che arriva fino a $87 \frac{mg_{GAE}}{mg_{DM}}$, pari al 26 % in massa dell'estratto secco totale ottenuto nell'estrazione. Nonostante in acqua il valore assoluto di TPC sia inferiore ($58 \frac{mg_{GAE}}{mg_{DM}}$), si ha una maggiore selettività di estrazione, con una percentuale di polifenoli nell'estratto secco pari al 30 % in massa. Il peggiore solvente si rivela essere la soluzione acida di H_2O , anche se questa, come si vedrà in seguito, consente una maggiore stabilità per i composti degradabili in ambienti in cui vi è presenza di radicali (come i sistemi ad ultrasuoni). Di seguito i risultati ottenuti nelle estrazioni quantitative a ricadere.

Bisogna considerare che nel tipo di pre-trattamento utilizzato, descritto nella sezione 2.1, i vinaccioli vengo intaccati in maniera non significativa, contribuendo quindi solo in minima parte al TPC. A tal proposito sono state eseguite le prove di estrazione su vinaccioli GPSE-01 (in soluzione idroalcolica) e GPSE-02 (in acqua), con lo scopo di riuscire a scorporre il contributo che le singole componenti della matrice danno al TPC. I vinaccioli hanno subito lo stesso trattamento che viene seguito nella preparazione della matrice di "TIPO 1", descritta nella sezione 2.1. I risultati ottenuti, raccolti in 3.6, mostrano che la frazione di matrice costituita da vinaccioli (circa il 45 % del

	H_2O	$H_2O + EtOH(50\%v/v)$	$H_2O + HCl(pH = 2,5)$
$m_{Solido}(g)$	2	2	2
$V_{Solvente}(mL)$	60	60	60
$V_{Reatt.}(mL)$	250	250	250
$v_{Stirrer}(RPM)$	350	350	350
$t(ore)$	3	3	3
$T(^{\circ}C)$	100	90	100
$TPC(\frac{mg_{GAE}}{g_{DM}})$	58	87	32
$\%PF(ore)$	30%	26%	11%
$m_{extr.secco}(mg/g_{DM})$	193	334	287

Tabella 3.5: Prove estrazione quantitativa in diversi solventi.

totale) contribuisce a circa il 20% del TPC totale. Ciò suggerisce di prevedere dei pre-trattamenti più drastici per i vinaccioli o alternativamente di destinarli ad altri scopi nella linea di processo, previa separazione da polpe e bucce, come ad esempio l'estrazione della parte lipidica, molto pregiata.

	H_2O	$H_2O + EtOH(50\%v/v)$
$m_{Solido}(g)$	2	2
$V_{Solvente}(mL)$	60	60
$V_{Reatt.}(mL)$	250	250
$v_{Stirrer}(RPM)$	350	350
$t(ore)$	3	3
$T(^{\circ}C)$	100	90
$TPC(\frac{mg_{GAE}}{g_{DM}})$	20,6	37,6
$\%PF(w/w)$	30%	27%

Tabella 3.6: Prove estrazione quantitativa vinaccioli in diversi solventi.

3.5 Estrazione assistita da ultrasuoni.

Per quanto riguarda le estrazioni assistite da ultrasuoni, l'attenzione è stata focalizzata sul sistema di tipo 'cup-horn' in quanto risultato il più performante. Il valore di TPC ottenuto in entrambe le configurazioni US è molto simile in valore assoluto e in %PF nell'estratto secco. Tuttavia, la potenza nominale assorbita dallo strumento 'probe-type', risulta essere circa il 67 % superiore rispetto al sistema 'cup-horn' (500W contro 200W).

Altri aspetti negativi del sistema 'probe-type' sono la più complicata ottimizzazione in fase di scale-up (è complicato mantenere una frequenza fissa, quindi anche la potenza erogata) e, nel caso dell'attrezzatura da laboratorio, la difficoltà di mantenere un valore fisso di temperatura durante tutta la durata dell'estrazione. Come si può infine vedere dai bilanci di energia in (sezione 3.2), il sistema 'cup-horn' garantisce un trasmissione di energia acustica più efficiente rispetto all'altra configurazione. Alla luce di questi dati, si è deciso di non proseguire la sperimentazione con l'utilizzo di questo tipo di sistema. I risultati riportati in seguito, sono riferiti alla quota di matrice secca costituita

	$TPC(\frac{mg_{GAE}}{g_{DM}})$	$\%PF(w/w)$
<i>cup-horn</i>	11,86	5,1
<i>probe-type</i>	10,32	4,8

Tabella 3.7: Confronto estratti a 8 minuti nei diversi sistemi a US (T=35°C).

da polpa e bucce (il 55% della massa totale). Si considera, come ottenuto dalle prove in US, che il contributo di TPC dei vinaccioli sia trascurabile.

3.5.1 Cinetica di estrazione sistema *cup-horn* in acqua.

L'andamento della cinetica di estrazione in acqua pura a 35 °C è mostrato in figura 3.2. Da quanto osservato è chiaro che vi siano dei forti fenomeni di degradazione dovuti all'effetto dei radicali sviluppatisi nel mezzo fluido a causa della sonicazione. Nella prima fase di estrazione, per tempi da 0 a circa 10 minuti, i punti sperimentali sembrano seguire l'andamento di una normale cinetica di estrazione, con il TPC che raggiunge il suo massimo a 8 minuti di trattamento. Dopo i dieci minuti il decremento di TPC diventa significativo.

Prova n	t (min)	TPC (mg_{GAE}/g_{DM})	$\%PF(w/w)$
UAE-01	2	9,73	4,5
UAE-02	5	11,36	4,9
UAE-03	8	11,86	5,1
UAE-04	10	9,32	4,3
UAE-05	15	8,73	4,1
UAE-06	30	7,45	3,6
UAE-07	45	7,14	3,6
UAE-08	60	3,05	3

Tabella 3.8: Punti sperimentali estrazione in acqua in sistema *cup-horn*.

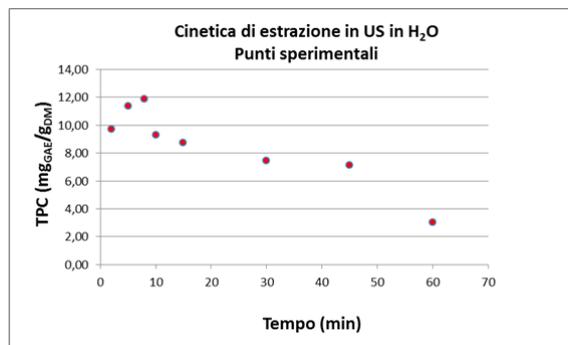


Figura 3.2: Punti sperimentali cinetica estrazione in acqua in sistema *cup-horn*.

3.5.2 Cinetica di degradazione in US in acqua.

Per determinare l'entità della degradazione dei composti fenolici a causa di reazioni con radicali, sono state eseguite delle prove di sonicazione per tempi di trattamento crescenti a 35 °C, per una soluzione acquosa a contenuto iniziale di TPC noto. Dall'andamento dei punti in figura 3.3, si nota come l'intensità della degradazione cresca al crescere del tempo di trattamento. La variazione percentuale nel tempo viene poi utilizzata per ottenere un aggiustamento dei valori in tabella 3.8, così da avere dati utilizzabili nel ricavare il modello cinetico di Peleg.

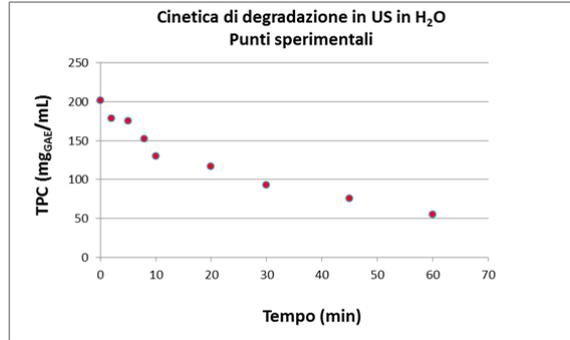


Figura 3.3: Cinetica di degradazione in US in acqua.

t (min)	TPC (mg_{GAE}/L)	$\Delta\%TPC$
0	201,4	/
2	178,2	89
5	174,9	87
8	152,2	76
10	129,8	64
15	116,6	58
30	92,9	46
45	75,1	37
60	54,6	27

Tabella 3.9: Punti sperimentali cinetica di degradazione.

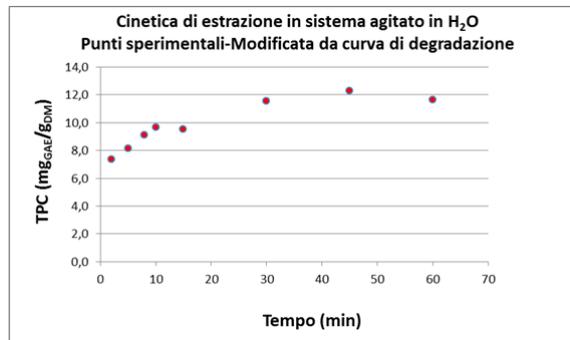


Figura 3.4: Cinetica di degradazione in US in acqua modificata mediante dati su degradazione.

3.5.3 Cinetica estrazione sistema *cup-horn* in acqua+HCl (pH=2.5).

Al fine di ridurre l'entità della degradazione dei composti estratti in soluzione, si è deciso di svolgere delle prove in soluzione acquosa acida, ambiente che consente una maggiore stabilizzazione dei composti fenolici. Da dati di letteratura infatti si riscontra che un valore di pH inferiore a 3 conferisce una maggiore stabilità alla frazione di antocianine contenuta nel mix di polifenoli. Nel caso considerato è stato usato dell'acido cloridrico in soluzione acquosa al 36 % ma, in fase di produzione industriale, si potrebbero usare degli acidi più "verdi" come ad esempio l'acido citrico. I punti sperimentali della cinetica di estrazione ottenuta in ambiente acido sono mostrati in figura 3.5. Come si può notare, il valore di TPC diminuisce inizialmente di circa il 30 % rispetto a quello in acqua pura, nonostante come ci si aspettasse sia garantita una maggiore stabilità di una parte dei composti polifenolici. Appare verosimile ipotizzare che la composizione dell'estratto non sia sufficientemente ricca in antocianine per richiedere un ambiente estrattivo dedicato alla stabilizzazione di questa classe di polifenoli. Si può inoltre ipotizzare che gli altri metaboliti vengano degradati in condizioni di pH così basso, portando ad una complessiva diminuzione della resa in TPC. La scelta della soluzione acida non risulta perciò conveniente poiché oltre all'abbassamento delle rese, si dovrebbero utilizzare apparecchiature resistenti alla corrosione nella fase di progettazione dell'impianto.

Prova n	t (min)	TPC (mg_{GAE}/g_{DM})	%PF(w/w)
UAE-01B	2	6	1,8
UAE-02B	5	7,7	2,1
UAE-03B	8	8,6	2,6
UAE-04B	10	9,7	2,8
UAE-05B	15	9,53	2,6
UAE-06B	30	11,5	2,5
UAE-07B	45	10,5	2,6
UAE-08B	60	8,7	2,4

Tabella 3.10: Punti sperimentali estrazione in acqua+acido in sistema *cup-horn*.

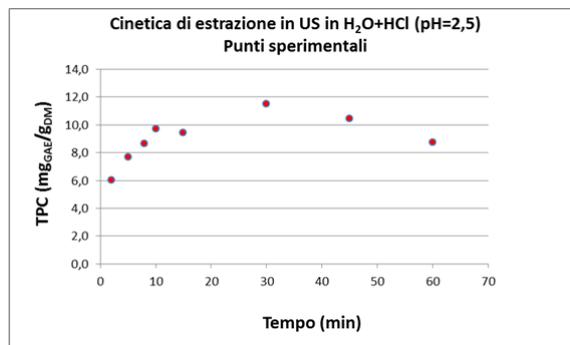


Figura 3.5: Punti sperimentali in acqua+acido in sistema *cup-horn*.

3.6 Estrazione in sistema agitato meccanicamente.

Delle prove estrattive, con relativa costruzione della curva cinetica, sono state eseguite anche in un sistema agitato meccanicamente, alle stesse condizioni mantenute durante l'estrazione in US (stesso tempo di trattamento, stessa temperatura e stesso rapporto solido-liquido). La velocità dell'agitatore è stata fissata arbitrariamente a 400 RPM, non avendo a disposizione modelli fluidodinamici utilizzabili per il sistema 'cup-horn' e non potendo perciò essere certi di porsi in condizioni di numero di Reynolds equivalente. In tal caso la temperatura è stata mantenuta costante immergendo la camera di estrazione (beaker da 250 mL in pyrex) in un bagno termostatico di olio siliconico. I risultati ottenuti sono riassunti in tabella 3.11 mentre l'andamento dei punti sperimentali in figura 3.6. Si può notare come durante i primi minuti di estrazione (fino a circa 10 minuti, le rese siano inferiori a quelle ottenute nel sistema a US per valori che vanno dal 25 % al 30 %, vedi 3.2). Successivamente, nel sistema a US, i fenomeni di degradazione dei polifenoli prendono il sopravvento causando un decremento del valore di TPC (che comunque si mantiene molto simile a quello ottenuto nel sistema agitato meccanicamente). Di seguito vengono riportati i valori utilizzati nella determinazione della cinetica di estrazione sistema il sistema ad agitazione meccanica.

Prova n	t (min)	TPC (mg_{GAE}/g_{DM})	%PF(w/w)
STE-01	2	7,4	4
STE-02	5	8,2	3,6
STE-03	8	9,1	3,6
STE-04	10	9,7	3,9
STE-05	15	9,5	3,9
STE-06	30	11,6	4,3
STE-07	45	12,3	4,9
STE-08	60	11,7	5,2

Tabella 3.11: Punti sperimentali estrazione in acqua in sistema agitato meccanicamente.

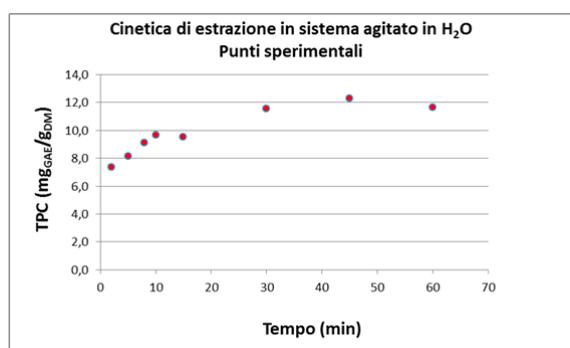


Figura 3.6: Punti sperimentali in acqua in sistema agitato meccanicamente.

3.7 Cinetica di Peleg.

Allo scopo di ottenere un modello matematico che rappresenti i dati sperimentali, si è utilizzato il modello cinetico di Peleg, come descritto in sezione 2.3.2. Nella fase di linearizzazione, per i sistemi US, sono stati esclusi i valori per tempi di trattamento pari a 60 minuti. Ciò è stato necessario poiché il valore di TPC diminuisce in maniera significativa dopo i 45 minuti e nel modello di Peleg non sono previste considerazioni riguardo la degradazione dei composti già estratti nel solvente. Dalle suddette linearizzazioni sono state poi ricavate le costanti da inserire nel modello per la descrizione della cinetica estrattiva (tabella 3.12).

	H_2O	H_2O Sistema agitato	$H_2O + HCl(pH = 2,5)$
k_1	1,57	10,42	8,51
k_2	4,44	4,03	4,45

Tabella 3.12: Costanti del modello di Peleg.

Ottenute le curve, nel punto di "ginocchio" (dove la forza spingente per il trasporto di materia è massima) è stato calcolato B_0 (vedi sezione 2.3.2), definito come l'inverso della costante k_1 . La concentrazione massima di equilibrio in singolo stadio (corrispondente al *plateau* della curva cinetica), y_S è stata invece calcolata come l'inverso della costante k_2 . Sono stati inoltre calcolati i $k_L a$ per i vari sistemi analizzati nei vari punti sperimentali.

3.7.1 Estrazione in acqua assistita da US.

Per poter ottenere una curva cinetica in questo tipo di sistema è stato necessario aggiustare i dati sperimentali dei valori di TPC con i risultati ottenuti riguardo la degradazione (sezione 3.5.2). Il modello cinetico di Peleg infatti non può essere applicato a sistemi in cui i composti estratti in soluzione vadano incontro ad una degradazione. Come spiegato in precedenza, i valori sperimentali di TPC a 60 minuti, sono mostrati sui grafici ma non sono stati utilizzati ai fini della determinazione delle costanti cinetiche di Peleg.

Prova n	t (min)	t/y(t) ($\frac{\text{min} * \text{mL}}{\text{mg}_{GAE}}$)
UAE-01	2	10,3
UAE-02	5	22
UAE-03	8	33,7
UAE-04	10	48,8
UAE-05	15	69,8
UAE-06	30	138,1
UAE-07	45	198,5
UAE-08	60	-

Tabella 3.13: Cinetica di Peleg estrazione in acqua assistita da US. Linearizzazione.

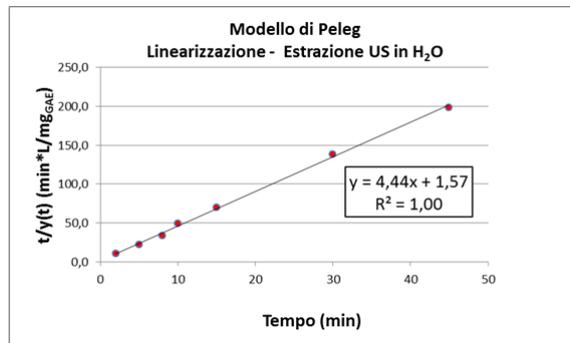


Figura 3.7: Cinetica di Peleg. Linearizzazione.

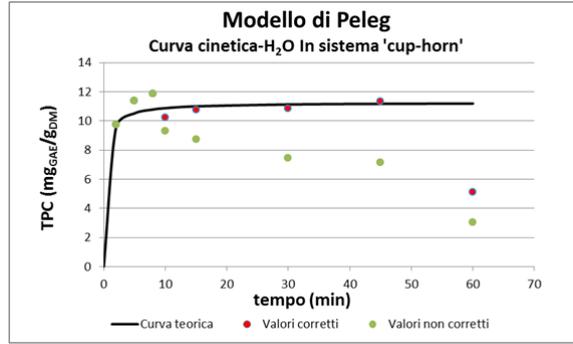


Figura 3.8: Curva teorica v.s. punti sperimentali. Estrazione assistita da US in acqua.

3.7.2 Estrazione in acqua+acido (pH=2,5) assistita da US

Prova n	t (min)	t/y(t) ($\frac{\text{min} * \text{mL}}{\text{mg}_{GAE}}$)
UAE-01B	2	16,6
UAE-02B	5	32,5
UAE-03B	8	46,3
UAE-04B	10	51,4
UAE-05B	15	79,3
UAE-06B	30	130,4
UAE-07B	45	215,2
UAE-08B	60	-

Tabella 3.14: Cinetica di Peleg estrazione in acqua (pH=2,5) assistita da US. Linearizzazione.

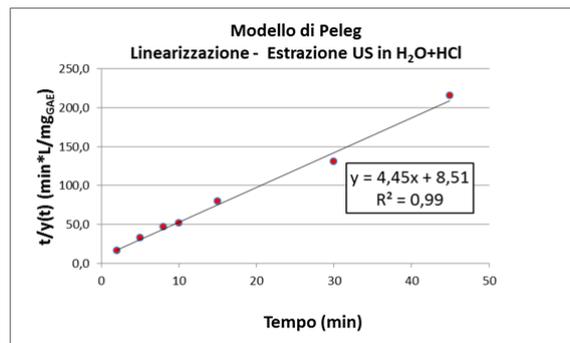


Figura 3.9: Cinetica di Peleg. Linearizzazione.

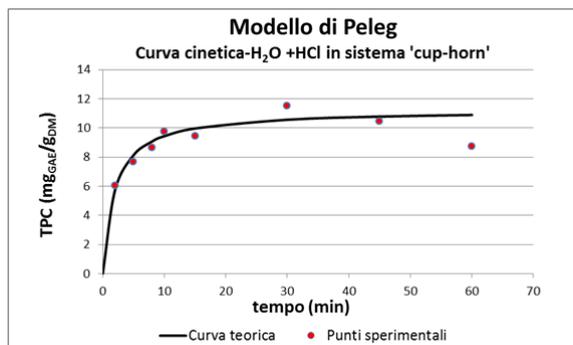


Figura 3.10: Curva teorica v.s. punti sperimentali. Estrazione assistita da US in acqua (pH=2,5).

3.7.3 Estrazione in acqua in sistema agitato meccanicamente.

Prova n	t (min)	$t/y(t) \left(\frac{\text{min} * \text{mL}}{\text{mg}_{GAE}} \right)$
STE-01	2	13,5
STE-02	5	30,6
STE-03	8	44,9
STE-04	10	51,7
STE-05	15	78,6
STE-06	30	129,7
STE-07	45	183,1
STE-08	60	257,4

Tabella 3.15: Cinetica di Peleg estrazione in acqua in sistema agitato meccanicamente. Linearizzazione.

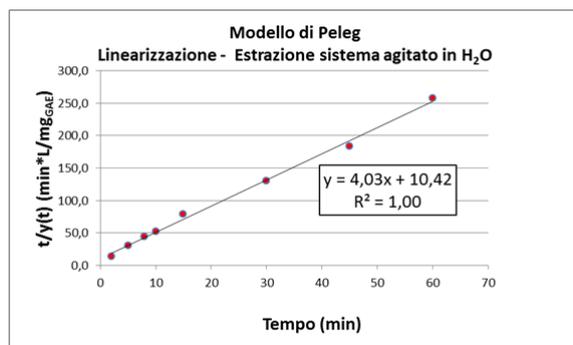


Figura 3.11: Cinetica di Peleg. Linearizzazione.

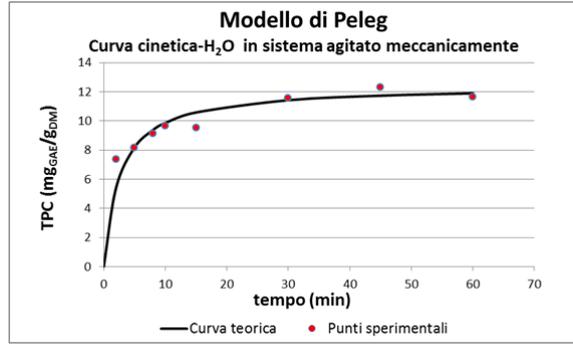


Figura 3.12: Curva teorica v.s. punti sperimentali. Estrazione in sistema agitato meccanicamente in acqua.

Di seguito sono invece riportati i valori per il coefficiente di scambio di materia k_{La} , calcolati secondo la metodologia riportata in sezione 2.3.2, considerando la concentrazione di equilibrio ricavata dal modello di Peleg.

$$k_{La} \left(\frac{1}{\text{min}} \right)$$

t (min)	H_2O Sistema US	$H_2O(pH = 2,5)$ Sistema US	H_2O Sistema agitato
2	0,984	0,358	0,286
5	0,543	0,257	0,215
8	0,395	0,206	0,176
10	0,338	0,183	0,158
15	0,251	0,145	0,128
30	0,148	0,094	0,084
45	0,108	0,071	0,065

Tabella 3.16: Costanti di scambio di materia k_{La} per diversi sistemi.

3.8 Influenza della temperatura.

L'influenza della temperatura sulla resa di estrazione e sulla selettività è stata testata sia per il sistema US che per il sistema agitato meccanicamente. Le prove sono condotte in acqua a diverse temperature. Risulta che l'incremento di temperatura consente di innalzare le rese di estrazione e la selettività nei confronti dei polifenoli. Nel sistema a US tuttavia, tali incrementi risultano significativi entro i 50 °C, a prova che oltre questa temperatura l'efficienza del sistema nella trasmissione dell'energia acustica diminuisce. Per l'estrazione assistita da US il TPC aumenta del 48% da 35 a 50 °C mentre portando la T a 60 °C si ha solamente un ulteriore incremento di resa del 4,5%. Anche la selettività aumenta del 43% (da 35°C a 50°C) e del 6% (da 50°C a 60°C) rispettivamente. Risultati analoghi sono stati ottenuti per il sistema con agitazione meccanica, con la differenza che in tal caso, oltre i 50 °C si hanno ancora incrementi di TPC significativi. Questo tipo di sistema presenta infatti un fluidodinamica più favorevole allo scambio di materia essendovi un'agitazione più intensa. Quando nel sistema a US, a causa dell'alta temperatura, viene a mancare l'intensificazione data dalla cavitazione, un aumento della temperatura non riesce a compensare il cattivo mescolamento con conseguenti incrementi di resa scarsi. Nel sistema agitato invece non vi sono problemi di buon mescolamento e un incremento della temperatura aumenta significativamente la velocità

di scambio. Nei grafici seguenti è possibile visualizzare l'effetto della temperatura su TPC e selettività per i due diversi sistemi(3.13,3.14).

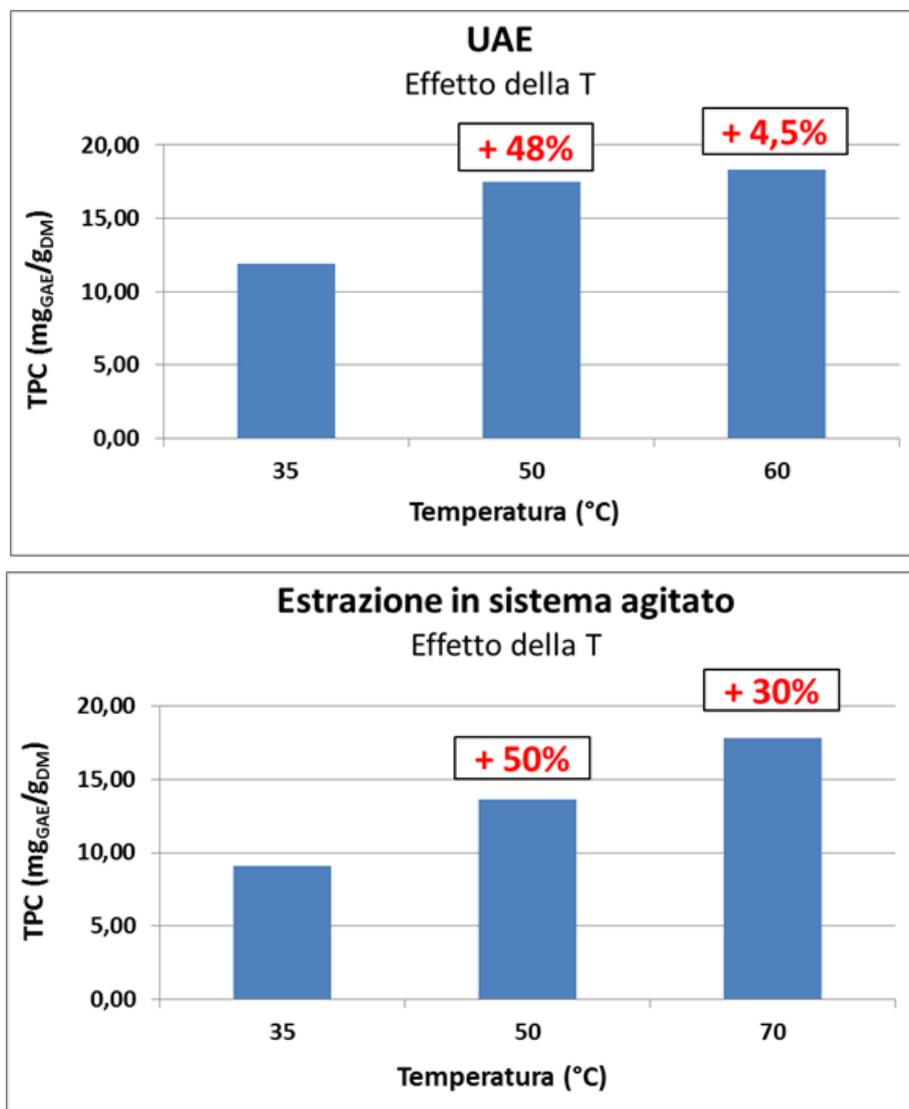


Figura 3.13: Influenza della temperatura sul TPC per i diversi sistemi.

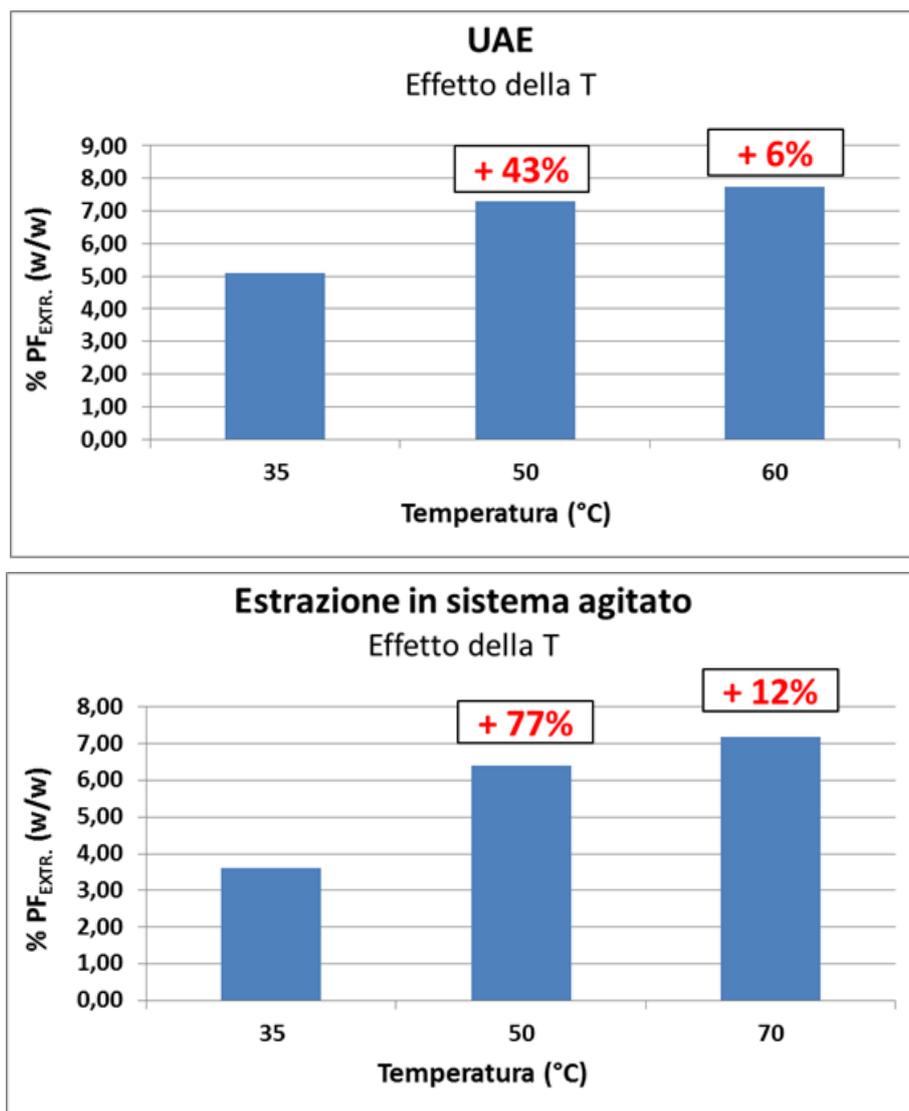


Figura 3.14: Influenza della temperatura sulla %PF nell'estratto per i diversi sistemi.

3.9 Influenza del contenuto di zuccheri.

L'elevato contenuto di zuccheri e sali nella matrice, molto solubili in acqua, porta ad avere degli estratti con una bassa frazione in massa di polifenoli. Per risolvere questo problema si è pensato di sottoporre la matrice ad uno stadio di estrazione, precedente all'estrazione dei polifenoli, in cui dovrebbe essere allontanata buona parte dei coestratti che riducono la selettività in TPC del prodotto finale. Questo stadio di "desaccarificazione" viene eseguito a bassa temperatura e con un rapporto S/L di 1g / 10 mL, in modo da estrarre meno polifenoli possibile essendo le altre sostanze solubili anche a temperature più basse e rapporti S/L più sfavorevoli (si veda figura 3.1). Questo trattamento consente di aumentare la selettività verso l'estrazione dei polifenoli negli stadi successivi, registrando incrementi del 37% nel sistema US e del 44% nel sistema agitato meccanicamente.

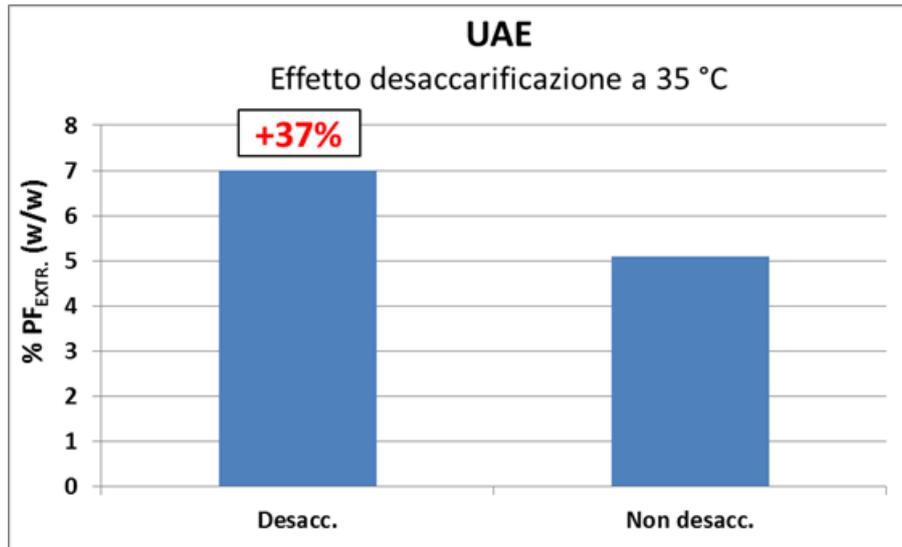


Figura 3.15: Influenza della desaccarificazione sulla %PF nell'estratto per sistema US.

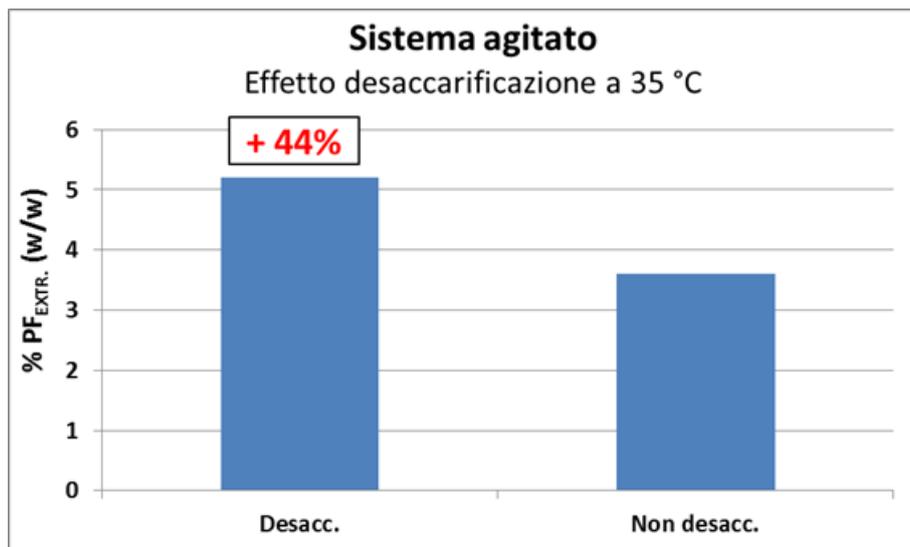


Figura 3.16: Influenza della desaccarificazione sulla %PF nell'estratto per sistema agitato.

3.10 Confronto tra diverse metodologie estrattive.

Allo scopo di definire le migliori condizioni da riprodurre nella progettazione dell'impianto industriale di estrazione, è stato fatto un confronto tra i valori di resa e selettività delle estrazioni nei due diversi sistemi, US e convenzionale. Il sistema US è risultato migliore per bassi tempi di estrazione, con rese superiori del 30% a quelle ottenute nell'altro tipo di sistema. Anche la selettività verso i polifenoli è maggiore (5,1% contro 3,6% su base massica, a 35°C). Il miglioramento portato dagli US rispetto al sistema convenzionale dipende ovviamente dalla temperatura a causa della dipendenza dell'intensità della cavitazione da questa variabile. L'efficienza dell'intensificazione di processo a basse temperature è di grande importanza anche se si considera l'energia

che verrebbe richiesta per riscaldare gli ingenti volumi di acqua richiesti.

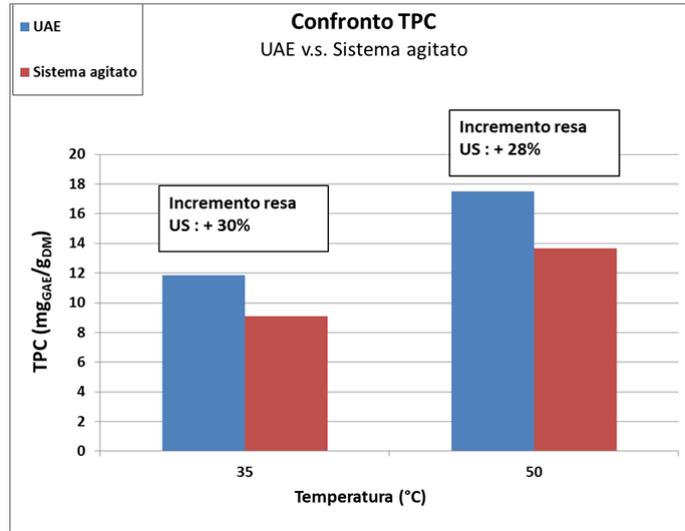


Figura 3.17: Confronto del TPC nei diversi sistemi a 35°C e 50 °C.

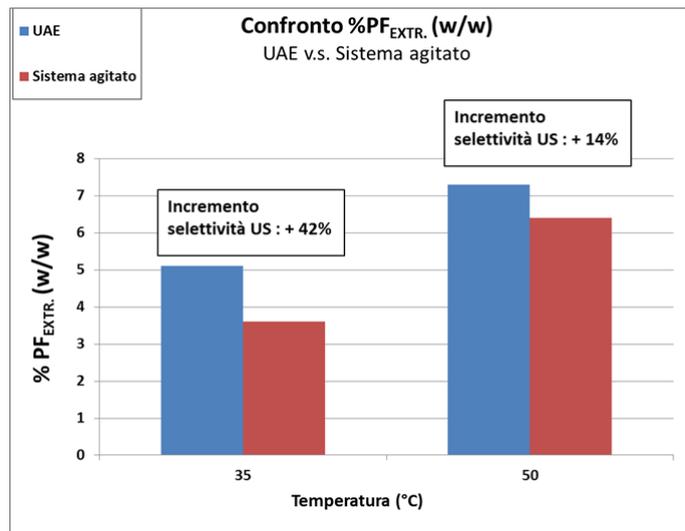


Figura 3.18: Confronto della %PF massica nell'estratto nei diversi sistemi a 35°C e 50 °C.

3.11 Stadi di estrazione multipli.

Estrazioni in multipli stadi si sono rese necessarie per esaurire il contenuto di soluti complessivamente presente nella matrice e calcolare la costante di ripartizione k (per lo stato di pseudo-equilibrio che si verifica tra la corrente di matrice solida e il solvente). Nel calcolo di k è stato considerato un rapporto di imbibizione pari a 1 ($massa_{SOL.}/massa_{LIQ.}$) per la corrente di raffinato e si è inoltre ipotizzato che la corrente di estratto non contenesse solidi sospesi. La matrice utilizzata ha subito il trattamento di desaccarificazione a bassa temperatura (SE-0) e i risultati sono riferiti all'unità di massa di matrice secca, al netto del contenuto di vinaccioli (45% della massa totale). il tempo di estrazione selezionato è quello coincidente con il punto di ginocchio

della curva cinetica, cioè 6 minuti. A questo tempo, si ha un ottimo compromesso tra resa in TPC ed *extraction rate*. Per l'equilibrio si considera la seguente equazione:

$$y = kx; \quad (3.1)$$

Dove:

- y è la concentrazione massica nel liquido all'equilibrio (corrente estratto);
- x è la concentrazione massica nel solido all'equilibrio (corrente raffinato), calcolata non considerando gli inerti;
- k è la costante di equilibrio, riferita all'estratto secco totale;

Sono state eseguite due estrazioni in stadi consecutivi in configurazione *cross-flow*. Ulteriori stadi non sono considerati a causa della difficoltà riscontrata nel recupero del solido dopo il trattamento a US, dovuta alle dimensioni delle particelle sempre minori (e quindi di difficile recupero dalla fase liquida). La costante di equilibrio è risultata molto simile tra i vari stadi estrattivi. A scopo di confronto, per verificare quanto riscontrato nella sezione 3.5.3, si è condotto anche un test di estrazione in due stadi *cross-flow* in ambiente acido (pH=2,5). Le prove CF-01B e CF-02B confermano la riduzione in resa e selettività come atteso. Sono state eseguite anche delle prove cercando di simulare un'estrazione in doppio stadio in controcorrente (CC-01, CC-02 e CC-03), per calcolare l'arricchimento della corrente degli estratti di stadio in stadio. Le costanti di ripartizione calcolate in questa sezione saranno utilizzate nella determinazione del numero di stadi di equilibrio in contro-corrente necessari ad ottenere un dato arricchimento della corrente degli estratti. Di seguito sono riportati i risultati ottenuti dagli esperimenti e nell'elaborazione dei dati.

	SE-0	CC-01	CC-02	CC-03	CF-01	CF-02	CF-01B	CF-02B
<i>TPC</i>	1,63	6,1	5,54	6,57	6,14	5,04	6,05	3,42
$\%PF(\frac{w}{w})$	2	6,9	11,8	5,7	7	10,7	4,5	9,9
$T(^{\circ}C)$	2	35	35	35	35	35	35	35
$t(min)$	4	6	6	6	6	6	6	6
k	0,019	0,036	0,044	0,035	0,035	0,042	0,028	0,023

Tabella 3.17: Costanti di ripartizione k nelle varie prove. TPC in $\frac{mg_{GAE}}{g_{DM}}$

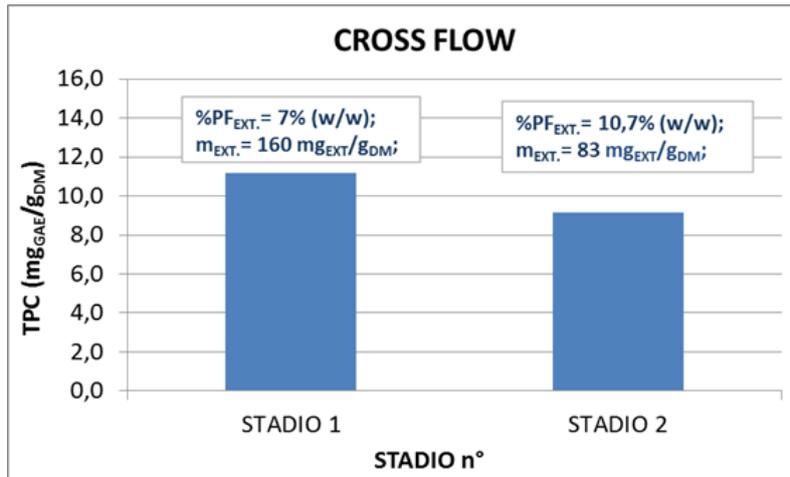


Figura 3.19: Stadi in *cross-flow* a 35 °C in US.

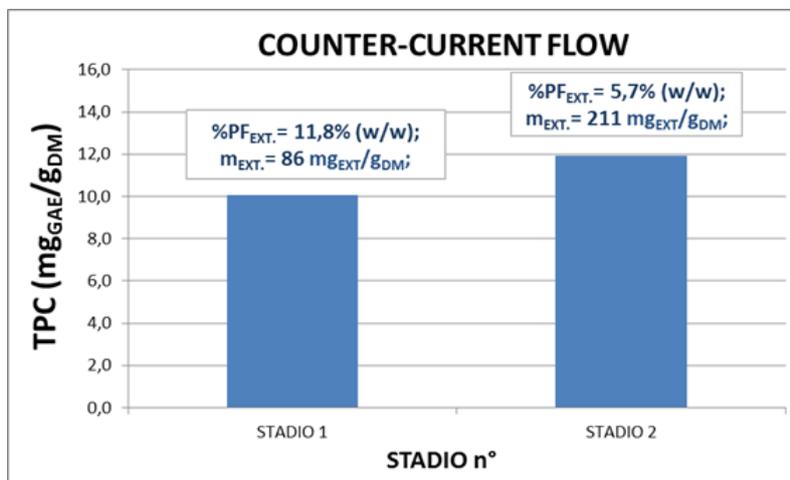


Figura 3.20: Stadi in *counter-current flow* a 35 °C in US.

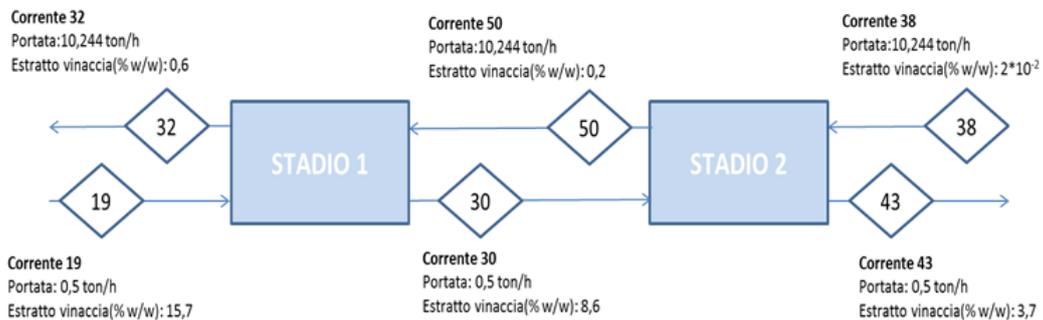


Figura 3.21: Schema per la configurazione in controcorrente.

3.12 Risultati analisi HPLC-DAD.

L'analisi qualitativa dei composti mediante tecnica HPLC-DAD è stata condotta secondo due differenti metodi (si veda sezione 2.4.1) così da poter discriminare le diverse classi di polifenoli ottenuti dai diversi protocolli estrattivi. Il metodo delle catechine prevede la registrazione del cromatogramma alla lunghezza d'onda di 280 nm, mentre, per il metodo degli acidi fenolici si sale a 340 nm. L'analisi qualitativa viene effettuata anche alla lunghezza d'onda tipiche delle antocianine, nello specifico 515 nm. La classificazione è stata condotta in base agli spettri di assorbimento. Per ogni picco individuato sul cromatogramma, sono stati estrapolati il profilo e gli assorbimenti tipici, dai quali è possibile risalire alla classe di composto (Appendice B). Data la quantità trascurabile di acidi fenolici è stato considerato solo il metodo delle catechine.

3.12.1 Metodo: Catechine - 280nm

Sono stati analizzati diversi campioni. Quelli per cui è stata eseguita l'identificazione sono descritti in seguito:

- **EXT-01:** Estratto ottenuto da estrazione quantitativa a ricadere in solvente idroalcolico ;
- **EXT-02:** Estratto ottenuto da estrazione quantitativa a ricadere in acqua ;
- **EXT-03:** Estratto ottenuto da corrente di concentrato nel test sull'impianto a membrana ottenuto in omogeneizzatore (si veda sezione 4.5.9) ;
- **EXT-04:** Estratto ottenuto dalla desaccarificazione a bassa temperatura della matrice ;
- **EXT-05:** Estratto ottenuto dall'UAE ;

EXT-01		
Picco n	$R_t(min)$	Classe composto
1	5,966	simil Acido gallico
2	7,9	Acido gallico
3	9,6	Acido idrossibenzoico (N.I.)

Tabella 3.18: Identificazione acidi fenolici in EXT-01($\lambda = 280nm$). Per N.I. si intende non identificato

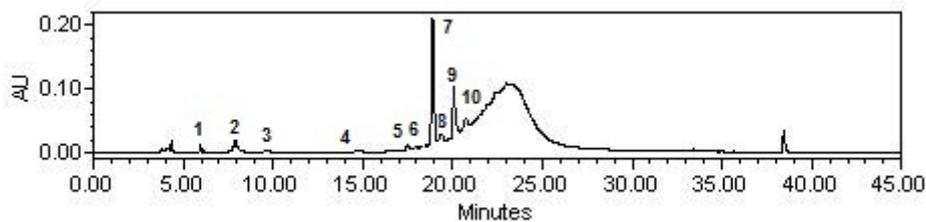


Figura 3.22: Cromatogramma EXT-01 ($\lambda = 280nm$).

EXT-01

Picco n	$R_t(min)$	Classe composto
4	17,47	Catechina
5	17,93	Catechina
6	18,36	Catechina
7	18,88	Catechina
8	19,38	Catechina
9	20,05	Catechina
10	20,75	Catechina

Tabella 3.19: Identificazione catechine in EXT-01($\lambda = 280nm$).

EXT-02

Picco n	$R_t(min)$	Classe composto
1	5,51	Acido idrossibenzoico
2	7,53	Acido gallico

Tabella 3.20: Identificazione acidi fenolici in EXT-02($\lambda = 280nm$).

EXT-02

Picco n	$R_t(min)$	Classe composto
3	16,97	Catechina
4	17,5	Catechina
5	17,88	Catechina
6	18,43	Catechina
7	19,01	Catechina
8	19,67	Catechina
9	21,94	Catechina

Tabella 3.21: Identificazione catechine in EXT-02($\lambda = 280nm$).

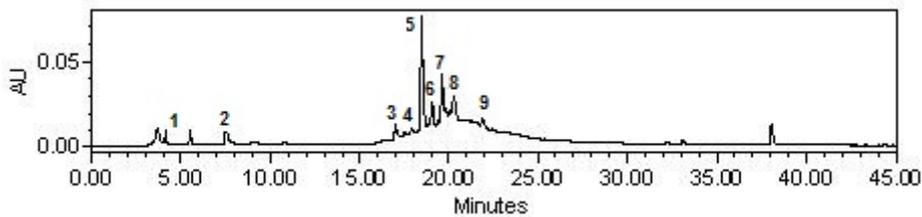


Figura 3.23: Cromatogramma EXT-02 ($\lambda = 280nm$).

Come si può notare dall'analisi dei cromatogrammi i composti presenti maggiormente sono quelli appartenenti alla famiglia delle catechine, oltre a piccole quantità di acidi fenolici. Il segnale allargato riscontrato, con varia intensità per tutti i campioni, è da ascrivere alla presenza di molecole appartenenti alla classe delle proantocianine (oligomeri di vario peso molecolare la cui unità ripetitiva è costituita da catechine). La natura oligomerica delle proantocianidine le rende complesse da separare tramite una

EXT-03

Picco n	$R_t(min)$	Classe composto
1	5,15	Acido idrossibenzoico
2	7,23	Acido gallico

Tabella 3.22: Identificazione acidi fenolici in EXT-03($\lambda = 280nm$).

EXT-03

Picco n	$R_t(min)$	Classe composto
3	16,81	Catechina
4	18,22	Catechina
5	18,16	Catechina
6	19,44	Catechina

Tabella 3.23: Identificazione catechine in EXT-03($\lambda = 280nm$).

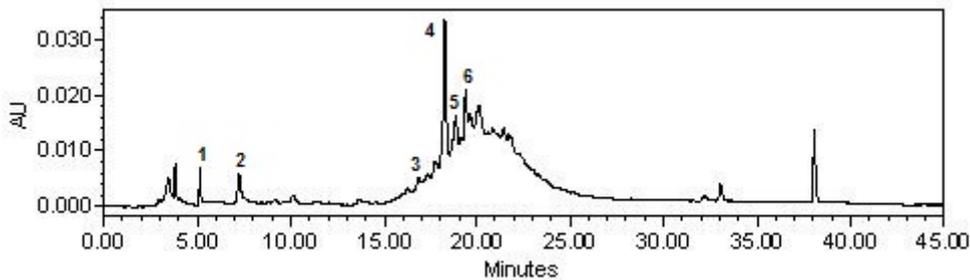


Figura 3.24: Cromatogramma EXT-03 ($\lambda = 280nm$).

EXT-04

Picco n	$R_t(min)$	Classe composto
1	14,08	Catechina
2	17,13	Catechina
3	18,03	Catechina
4	18,66	Catechina
5	18,95	Catechina
6	19,78	Catechina
7	20,36	Catechina
8	21,9	Catechina
9	38	Lipofilo N.I.

Tabella 3.24: Identificazione catechine in EXT-04($\lambda = 280nm$).

cromatografia non dedicata o che non ne preveda un'idrolisi preventiva (per il riconoscimento dei monomeri), e porta altrimenti alla generazione di un segnale allargato per un prolungato tempo di ritenzione. A conferma di quanto detto è possibile osservare la progressiva scomparsa del segnale muovendosi verso lunghezze d'onda maggiori, mentre si registra il suo massimo al tipico assorbimento delle catechine. Si può notare come l'insieme dei picchi corrispondenti alle proantocianidine sottenda un'area maggiore nel caso dell'estratto EXT-01 (estrazione convenzionale in soluzione idroalcolica) rispetto

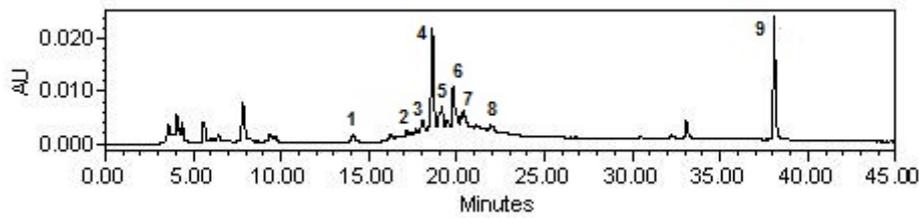


Figura 3.25: Cromatogramma EXT-04 ($\lambda = 280nm$).

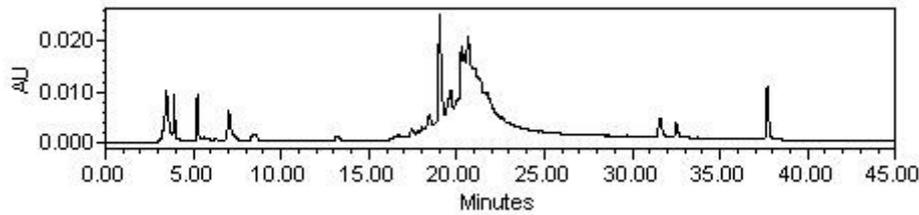


Figura 3.26: Cromatogramma EXT-05 ($\lambda = 280nm$).

al cromatogramma dell'estratto EXT-02 (estrazione convenzionale in acqua), potendo quindi concludere che la differenza tra il valore di TPC nei due composti, maggiore in EXT-01, sia da attribuire ad una presenza maggiore di proantocianidine. La presenza di questi composti, poco solubili in acqua, può rendere complessa o addirittura non applicabile la preparazione di supplementi idrosolubili, campo di applicazione tipico dei polifenoli.

Altro aspetto interessante da notare è la presenza del picco numero 10 nell'estratto desaccarificato 3.24 corrispondente a un composto più lipofilo non identificato (affinità maggiore con acetonitrile). Questo picco è presente nel campione ottenuto dall'UAE in *cup-horn* mentre non è visibile nel permeato in uscita dalla membrana. Questo composto è assente anche nel caso dell'estratto ottenuto in US in seguito all'operazione di desaccarificazione. Si può concludere quindi che le operazioni preliminari eseguite sulla matrice consentano l'allontanamento di questo composto dall'estratto finale.

3.12.2 Metodo: Catechine - 515nm

Vengono di seguito riportati i cromatogrammi a 515 nm, lunghezza d'onda di assorbimento tipica delle antocianine. I risultati vengono riportati per i campioni di estratto EXT-03 ed EXT-05. Negli altri campioni non sono state identificate molecole appartenenti alla classe delle antocianine, i cromatogrammi non vengono perciò riportati.

EXT-03		
Picco n	$R_t(min)$	Classe composto
1	18,16	Antocianina
2	19,34	Antocianina
3	20,13	Antocianina
4	21,80	Antocianina

Tabella 3.25: Identificazione Antocianine in EXT-03($\lambda = 515nm$).

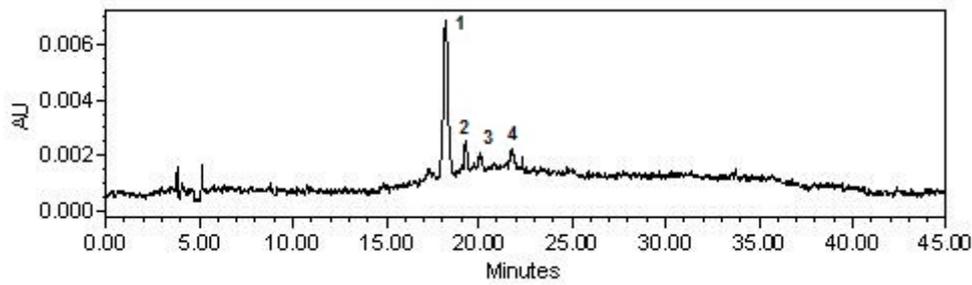


Figura 3.27: Cromatogramma EXT-03 ($\lambda = 515nm$).

EXT-03		
Picco n	$R_t(min)$	Classe composto
1	19,3	Antocianina
2	20,03	Antocianina

Tabella 3.26: Identificazione Antocianine in EXT-05($\lambda = 515nm$).

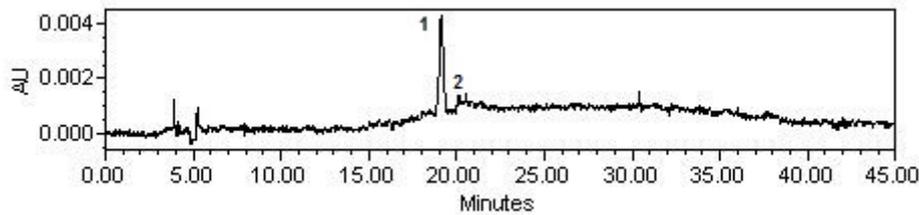


Figura 3.28: Cromatogramma EXT-05 ($\lambda = 515nm$).

Il cromatogramma relativo all'estratto EXT-03 è l'unico in cui si possono osservare dei picchi ben distinti a $\lambda = 515nm$. Questo risultato indica che la frazione di antocianine subisce una forte degradazione sia termica (picchi totalmente assenti nel caso di estrazioni a ricadere, condotte ad alta temperatura) che dovuta ai radicali presenti nel solvente nel caso dell'UAE.

3.12.3 Rapporto catechine/proantocianidine.

Non è stata possibile una quantificazione dei composti identificati mediante cromatografia a causa dell'intenso segnale interferente dovuto alla presenza di oligomeri delle catechine (proantocianidine). E' stato invece effettuato un confronto tra la frazione di catechine e quella di proantocianidine, ottenuto eseguendo un rapporto tra le aree sottese dai cromatogrammi dei vari campioni analizzati. In particolare il confronto è stato eseguito per i campioni EXT-01 e EXT-02 (estrazione quantitativa in soluzione idroalcolica e in acqua rispettivamente). I risultati ottenuti sono riassunti di seguito. Il rapporto indicato in tabella 3.27 si riferisce alla frazione di catechine rispetto alle proantocianidine. Si può inoltre notare che il contenuto di proantocianidine diminuisce dell'83% nell'estratto ottenuto dall'estrazione in acqua rispetto a quello ottenuto dalla soluzione idroalcolica. Nel caso dell'estratto ottenuto dall'UAE la diminuzione è del 91% rispetto alla soluzione idroalcolica.

	Area catec. ($\mu V * s$)	Area Proant. ($\mu V * s$)	Conc. catec/Conc. Proant.
EXT-01	$2,8 * 10^6$	$2,17 * 10^7$	0,14
EXT-02	$1,12 * 10^6$	$3,78 * 10^6$	0,42
EXT-05	$1,01 * 10^6$	$1,97 * 10^6$	1,05

Tabella 3.27: Confronto tra la frazione di catechine e proantocianidine negli estratti. ($\lambda = 280nm$).

Capitolo 4

Progettazione e scale-up.

4.1 Descrizione del processo.

L'impianto che si vuole progettare ha lo scopo di valorizzare gli scarti dell'industria vinicola, in particolare la vinaccia derivante dal processo di vinificazione. Nell'estrazione dei composti di interesse residui nella matrice solida si è voluto utilizzare solamente acqua come solvente (sfruttando l'intensificazione fornita dalla cavitazione generata da US), senza l'ausilio di alcun solvente organico. La biomassa proviene da coltivazioni biologiche piemontesi e viene consegnata così come si presenta in uscita dal processo di fermentazione (al 45% di umidità), durante i periodi tipici della vendemmia ovvero da metà Settembre a metà Ottobre. L'impianto è dimensionato per trattare 2000 ton/anno, rimanendo in funzione per 24 ore al giorno durante il periodo 20 Settembre - 20 Dicembre (processa quindi con una portata di 1 ton/h). Il rapporto di *turn-down* varia dal 50% al 110% della potenzialità nominale. Il vantaggio di un tale tipo di impianto è di poter essere adattato all'estrazione di polifenoli da altri tipi di biomassa (oleuropeina da foglie di ulivo, licopene da scarti di pomodori, ecc.) durante i periodi in cui non si dispone della vinaccia.

Per evitare la degradazione durante il periodo di stoccaggio (la matrice deve essere mantenuta a temperature non superiori a 5 °C) è necessario essiccare la matrice, portandola dal 45% di umidità iniziale ad un massimo del 10%. Successivamente alla fase di essiccazione avviene la separazione dei vinaccioli dal resto della matrice (polpa e bucce), i quali vengono inviati alla sezione di pressatura a freddo per l'ottenimento dell'olio di vinacciolo. La quota di matrice costituita da polpa e bucce viene infine inviata alla sezione di estrazione descritta approfonditamente in seguito. Durante la progettazione si è cercato di dimensionare le apparecchiature in modo da poter riprodurre su grande scala il più fedelmente possibile, le operazioni eseguite in laboratorio. Nelle tabelle 4.1 e 4.2 sono riassunte le caratteristiche fondamentali dell'impianto e dell'alimentazione post essiccazione e separazione vinaccioli (solitamente la frazione massica di semi costituisce circa il 40% del totale).

Alimentazione	Vinaccia d'uva
Potenzialità	2000 ton/anno
Ore giornaliere	24
Giorni all'anno	84
Portata oraria	1 ton/h
Turndown ratio min	0,5
Turndown ratio max	1,1

Tabella 4.1: Caratteristiche generali impianto.

Componente	%(w/w)
mix polifenoli	28
Acqua	10
Inerti	62

Tabella 4.2: Caratteristiche alimentazione in ingresso.

4.2 Generalità impianto.

L'impianto che è stato progettato può essere idealmente suddiviso in tre sezioni fondamentali :

- Sezione di pre-trattamento matrice in ingresso : In questa sezione la matrice viene essiccata ed avviene la separazione dei vinaccioli da polpa e bucce.
- Sezione di estrazione: Sezione principale dell'impianto, in cui avviene l'estrazione dei polifenoli in acqua. E' costituita da due stadi di equilibrio in controcorrente, rappresentati da estrattori ad US a celle di flusso (in modo da ottenere un processo in continuo). Dato il buon recupero delle sostanze desiderate e il costo aggiuntivo delle apparecchiature che si avrebbe inserendo ulteriori stadi, si è deciso di fermarsi al secondo stadio di estrazione.
- Sezione di concentrazione del prodotto: E' la sezione in cui viene concentrata la corrente in uscita dal sistema di estrazione. L'estratto in soluzione infatti presenta una concentrazione in polifenoli del 11% circa (troppo bassa a fini commerciali) e deve perciò essere concentrata mediante l'utilizzo di resine a scambio ionico o di colonne cromatografiche (pratiche più utilizzate industrialmente).

Le operazioni di pre-trattamento e concentrazione non sono state affrontate sperimentalmente e perciò non ne è stata eseguita la progettazione. Il solvente viene recuperato mediante la separazione con membrane polimeriche e ricircolato al sistema di estrazione, previo spurgo per evitare l'accumulo delle sostanze estratte.

4.3 Sezione di estrazione.

Dalle prove sperimentali di estrazione in laboratorio è stata definita la costante di ripartizione tra le fasi k , utilizzata nel calcolo del numero di stadi di equilibrio teorici necessari ad ottenere un dato esaurimento della matrice. Dai bilanci di materia è risultato che in due stadi in controcorrente si riesce a raggiungere un recupero dell'estratto dell'80%. Così come nelle prove da laboratorio da cui è stata calcolata k , il rapporto

solido-liquido viene mantenuto pari a 1 g / 30 mL, la temperatura a 35 °C e il tempo di permanenza a 5 minuti. La corrente di solido essiccato e privo di vinaccioli viene pre-trattata in omogeneizzatore (KM-101) per ridurre il diametro medio delle particelle e migliorare lo scambio di materia nelle fasi successive. In tal caso si utilizza un rapporto solido-liquido pari a 1 g / 10 mL e si mantiene la temperatura a 15 °C al fine di svantaggiare la solubilizzazione dei polifenoli. La corrente di *slurry* in uscita da KM-101 viene infatti inviata al tank ST-102 in cui avviene la fase di desaccarificazione. Questo trattamento consente di ottenere un estratto secco con maggiore purezza in polifenoli negli stadi successivi. Le condizioni operative utilizzate non consentono infatti un'estrazione efficiente dei polifenoli ma non influiscono sulla velocità di estrazione di sali minerali e zuccheri, componenti principali dell'estratto secco. La sospensione viene poi separata per centrifugazione in un decanter (CS-101). Il surnatante viene alimentato ad un filtro a tamburo rotante (RF-101) per eliminare dalla corrente liquida ogni residuo di solido ed è poi inviato alla separazione a membrana che consente di ottenere una corrente di permeato a bassa concentrazione di soluti (che viene ricircolata a ST-101) e una di retentato, contenente la maggior parte dell'estratto di vinaccia. La corrente solida separata dal decanter viene trasportata mediante un albero rotante al primo stadio della sezione di estrazione, dove incontra la corrente di liquido proveniente dal secondo stadio (corrente 50). Il liquido in uscita dallo stadio 1, con portata pari a 10,244 ton/h, rappresenta la corrente più concentrata (corrente 26), e viene inviata ad MS-102 dove avviene il recupero del solvente. Il retentato della membrana (corrente 34), previo spurgo, è alimentato alla sezione di concentrazione per l'ottenimento del prodotto finale. Nel secondo stadio di estrazione, il solvente recuperato in MS-102 incontra la corrente di *make-up* di solvente ed entrambi finiscono in ST-104, serbatoio di alimentazione a UR-102 (secondo stadio di equilibrio). La corrente di raffinato (solido) in uscita dal secondo stadio, dopo essere stata separata dal liquido mediante CS-103, viene pressata in SP-101 in modo da recuperare il liquido imbibito e poi esce dall'impianto nella corrente 54 (0,5 ton/h). Il prodotto è rappresentato dalla corrente 34 (portata 1,281 ton/h al 4,1% in massa di estratto di vinaccia). L'estratto di vinaccia in questa corrente contiene l'11% in massa di mix polifenolico, valore troppo basso ai fini del mercato. Dovranno essere previste perciò delle operazioni di purificazione a valle di MS-102. Una rappresentazione schematica degli stadi di equilibrio e delle correnti coinvolte è visionabile in figura 3.21. Per una migliore comprensione si rimanda al *Process flow diagram* in Appendice A.

4.4 Desing basis.

4.4.1 Caratteristiche prodotto.

Sono di seguito riportate le caratteristiche del prodotto. La composizione percentuale in massa indicata in tabella 4.3 è riferita all'estratto secco di vinaccia totale ed è stata ottenuta mediante analisi ponderali. La frazione polifenolica costituisce il 11% in massa di questo estratto (la restante parte è rappresentata da sali inorganici, zuccheri e composti non individuati nell'analisi HPLC-DAD, si veda sezione 3.12). La portata di prodotto in uscita dall'impianto, intesa come estratto secco totale, è pari a 62 kg/h. La portata di mix polifenolico nella corrente di prodotto è di 6,82 kg/h. Per l'individuazione dei costituenti questo mix si veda sezione 3.12.

Componente	%(w/w)
Inorganici	49
Organici	40
Mix polifenoli	11

Tabella 4.3: Caratteristiche prodotto. Si noti che il mix polifenolico è stato scorporato dall'organico totale.

4.4.2 Caratteristiche *utilities*.

Sono di seguito riportate le caratteristiche delle utilities utilizzate nella conduzione del processo. i consumi specifici sono riferiti all'estratto secco totale prodotto.

Utility	Caratteristiche	Consumo orario	Consumo specifico
Energia elettrica	400 V-3 Ph-50 Hz	16,3 kWh	263 kWh/ton _{Prod}
Acqua di pozzo	15°C e p_{AMB}	12,958 ton/h	209 ton/ton _{Prod}

Tabella 4.4: Caratteristiche prodotto.

4.5 Dimensionamento apparecchiature.

Di seguito vengono descritte le procedure utilizzate nel dimensionamento delle apparecchiature dell'impianto. Le apparecchiature sono dimensionate rispetto alla potenzialità nominale. Tuttavia è stata eseguita una verifica sull'idoneità di pompe e serbatoi per le portate definite dal rapporto di *turndown*.

4.5.1 Pompe centrifughe.

Per poter eseguire il dimensionamento delle pompe centrifughe è stata ipotizzata la disposizione spaziale delle apparecchiature e il diametro dei tubi delle condotte (con rugosità pari ad 80 micron). La prevalenza necessaria alla pompa e le perdite di carico sono state calcolate mediante l'equazione di Bernoulli. In particolare per la prevalenza:

$$H_{TOT} = H_G + \frac{\Delta p}{\rho g} + \sum_{i=1}^n H_v;$$

Dove:

- H_G Carico geodetico;
- H_v Perdite di carico viscosi;
- δp Differenza di pressione tra le due sezioni;

E' stato poi calcolato NPSH disponibile secondo l'equazione che segue, verificando che per ogni pompa tale parametro fosse tale da evitare la cavitazione:

$$NPSH_{DISP} = \frac{p_E + p_B - p_D}{\rho g} + \frac{v_e^2}{2g} - H_{V,s} - H_{G,s}; \quad (4.1)$$

La verifica consiste nell'accertarsi che $NPSH_{DISP} > NPSH_{Required}$. La scelta della pompa viene poi eseguita usando i grafici forniti dal costruttore (FLOWSERVE) partendo dai dati di portata e prevalenza. Un tipico grafico rappresentante le curve caratteristiche di una pompa centrifuga è mostrato in figura 4.1

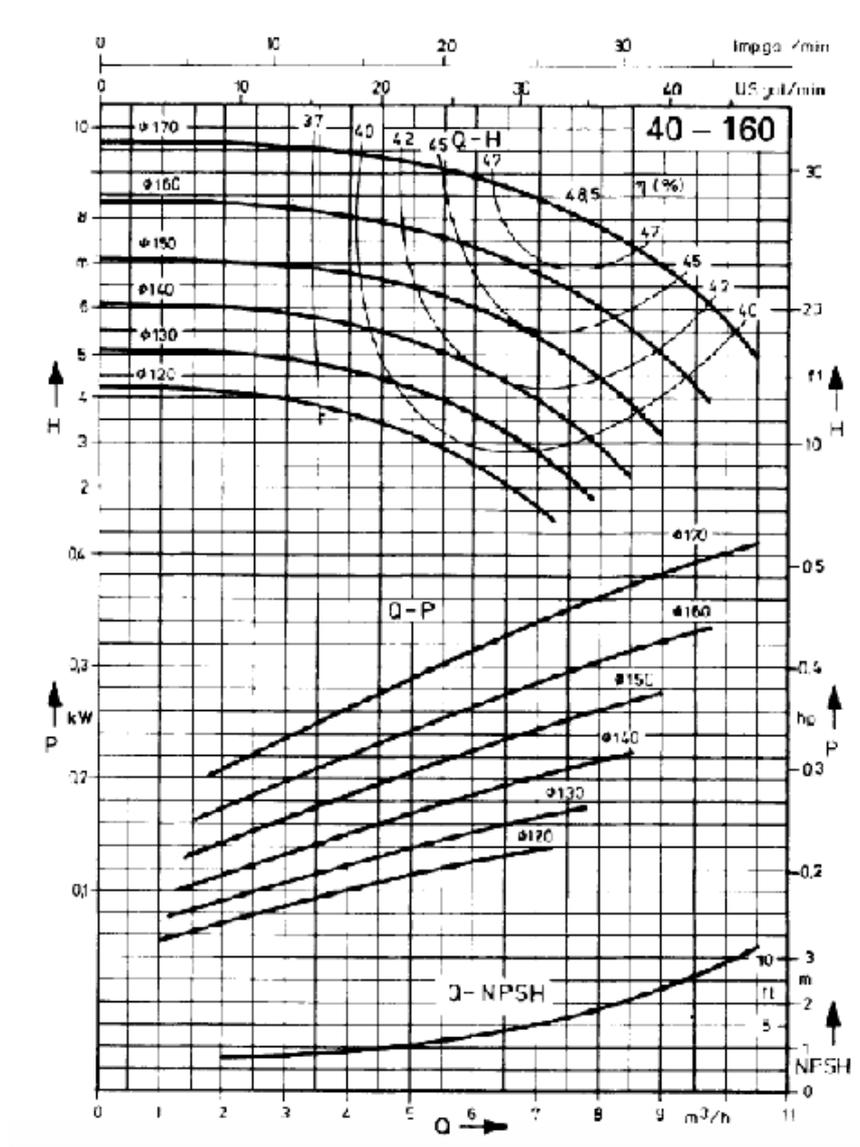


Figura 4.1: Caratteristica generica pompa centrifuga. Da catalogo FLOWSERVE.

4.5.2 Pompe a girante flessibile.

Per il dimensionamento delle pompe a girante flessibile è stato utilizzato come guida il *Warman slurry pump handbook*. Per la gravità specifica della sospensione viene utilizzata la seguente relazione:

$$SG_{SL} = 1 + C_V(SG_S - 1) \quad (4.2)$$

Dove:

- SG_{SL} Gravità specifica sospensione solido-liquido;
- SG_S Gravità specifica solido;
- C_V Concentrazione solido (w/w);

E' stato poi necessario calcolare la velocità critica v_{cr} (da indicazioni del manuale) e verificare che questa sia inferiore a quella effettiva v_{eff} (ottenuta mediante l'ipotesi su disposizione spaziale apparecchiature e diametro tubi). Per quanto riguarda le perdite di carico nel condotto è stata utilizzata la viscosità dell'acqua, dato l'elevato rapporto solido-liquido. I valori di prevalenza, grazie a cui si ottiene la potenza della pompa, sono stati calcolati mediante l'equazione di Bernoulli. Sono state scelte delle pompe a girante flessibile dell'azienda Liverani. Il modello specifico di pompa è stato scelto con l'ausilio dei grafici delle caratteristiche forniti dal costruttore.

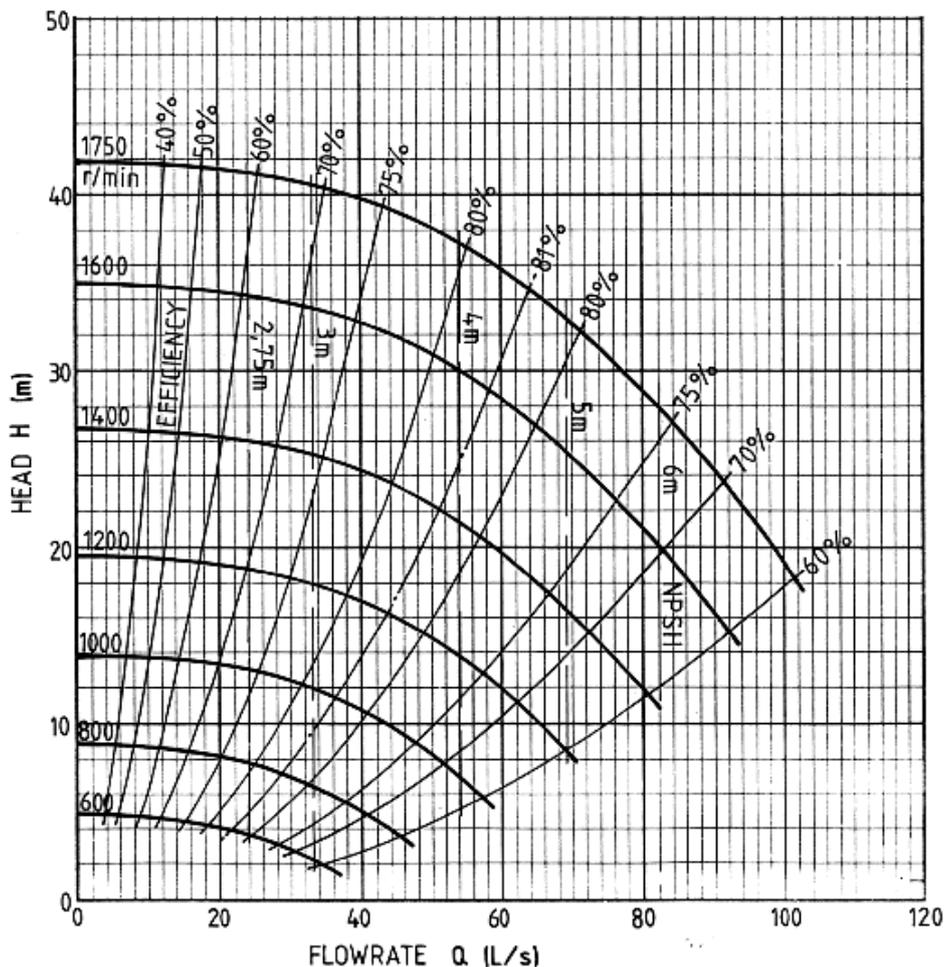


Figura 4.2: Caratteristica generica pompa a girante flessibile. Da catalogo *Warman slurry pump handbook*.

4.5.3 Estrattori ad US (UR-101, UR-102).

Per la sezione di estrazione è stato scelto un estrattore ad ultrasuoni del tipo *flow-through cell* fornito da *Weber Ultrasonic*. Il numero di unità in parallelo necessarie al

trattamento della corrente è stato determinato partendo dal valore del volume del tratto su cui vengono posizionati i trasduttori piezoelettrici e dalla portata da trattare. Di seguito i dati riguardanti le dimensioni della camera di estrazione e alcune informazioni riguardanti il sistema a US che si vuole utilizzare 4.5.

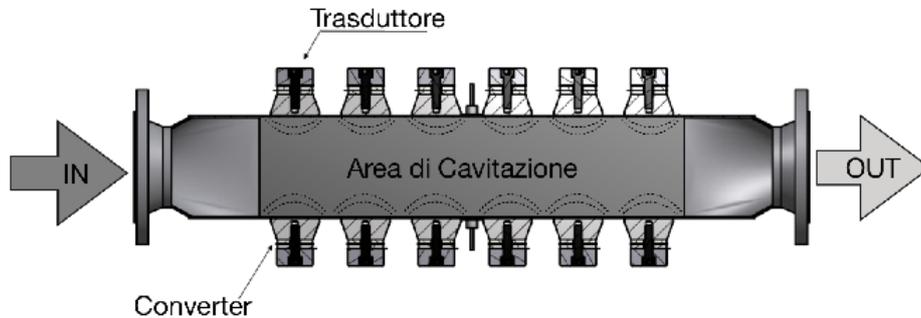


Figura 4.3: Schema della *flow-through cell*.

Il tempo ottimale di permanenza, così come risulta dalle curve cinetiche e dai valori calcolati di $k_L a$, cade tra i 2 e gli 8 minuti (in questa zona la forza spingente per il trasporto di materia è massima, si veda sezione 3.7). Si ha perciò che il numero di unità estrattive in parallelo necessarie a garantire un tempo di permanenza pari a 3 minuti, ad ogni singolo stadio, è pari a 4. La portata volumetrica in ogni estrattore sarà quindi di 44,7 L/min. Considerando il diametro equivalente della sezione dell'estrattore (ovvero la sezione circolare che copre la stessa superficie di quella quadrata) si ricava il numero di Reynolds per l'apparecchiatura in questione che non dovrà essere troppo alto (la turbolenza influisce negativamente sull'efficienza degli US) ma bisogna comunque garantire un regime turbolento per avere un buon mescolamento e rendere plausibile l'ipotesi di concentrazione costante nel *bulk* liquido.

$$Re = \frac{\rho v d_{eq}}{\mu} = 13950 \quad (4.3)$$

Volume (L)	135
Lato (m)	0,10
Lunghezza (m)	6,5
Frequenza (kHz)	40-120

Tabella 4.5: Dimensioni e caratteristiche *flow-through cell*.

4.5.4 Filtri a tamburo rotante (RF-101, RF-102, RF-103,).

Per il dimensionamento del sistema di filtraggio dei solidi è stata scelta la tipologia a tamburo rotante. Si utilizza la procedura dell'esempio numero 6 a pagina 18-94, del manuale *Perry's Chemical Engineers' Handbook*, si ipotizza perciò una filtrazione a pressione costante. Le ipotesi adottate sono descritte a seguire: Si ipotizza anzitutto lo spessore del *cake* allo scarico del solido (da tabella 18-8 dello stasso manuale). Il valore scelto è pari a 0,75 cm. Al fine di definire il volume di lavaggio si impostano le seguenti variabili di processo:

- *Total Dissolved Solid*-TDS: 0,03 w/w
- TDS in liquido finale: 0.005 w/w
- *Residual moisture*-RM nel *cake* solido in uscita: 0,25 w/w

Si calcolano poi dai grafici forniti sul manuale al capitolo 18, le quantità riassunte in tabella 4.6.

Variabile	Valore
W	$10 \frac{kg * ciclo}{m^2}$
Dry time	0,4min
Form time	0,3min

Tabella 4.6: Parametri utilizzati nel dimensionamento del filtro.

Si calcola poi il liquido residuo nel solido in uscita secondo l'equazione (4.4)

$$L_{CAKE} = \frac{W * RM}{100 - RM} \quad (4.4)$$

$$WV_w = \frac{N * L_{CAKE} * W}{n^\circ \text{ cicli}} \quad (4.5)$$

Dove N è il rapporto di lavaggio ottenuto dal grafico in figura 4.4 del manuale, maggiorato del 10%.

Tramite l'equazione (4.5) e il grafico in figura 4.5 si ottiene il tempo di lavaggio necessario e dalle informazioni ricavate precedentemente, il tempo totale ad ogni ciclo. Si definisce il *Rate Determining Step*-RDS e tramite dei fattori di scale-up forniti dal manuale si ottiene l'area del filtro. Rimane da calcolare infine la portata di gas secco necessaria ad ottenere il livello di vuoto necessario a compiere l'essiccazione del *cake* fino al livello desiderato. Tale parametro viene determinato dal seguente grafico 18-118 del *Perry*.

4.5.5 Decanter (CS-101, CS-102, CS-103).

Per la separazione interstadio della sospensione solido liquido in uscita da estrattori ed omogeneizzatore si è scelto di utilizzare il decanter modello F2000 della *Andritz*. Le equazioni per la verifica sono state prese dal manuale fornito dal costruttore e vengono elencate in seguito.

$$\frac{Q_d}{2V_{gd}} = \frac{\pi \Omega^2 L}{g} \frac{r_P^2 - r_B^2}{\ln\{1 - Rec_d[1 - \frac{r_P^2}{r_B^2}]\}} = \sum Rec_d \quad (4.6)$$

Si calcola prima di tutto Rec_d e conseguentemente Q_d (portata teorica massima del decanter). Si confronta infine questo valore con la portata da processare per determinare il numero di unità necessarie. Nel caso considerato è necessaria un'unità CS-101 e due unità in parallelo ciascuno per quanto riguarda CS-102 e CS-103.

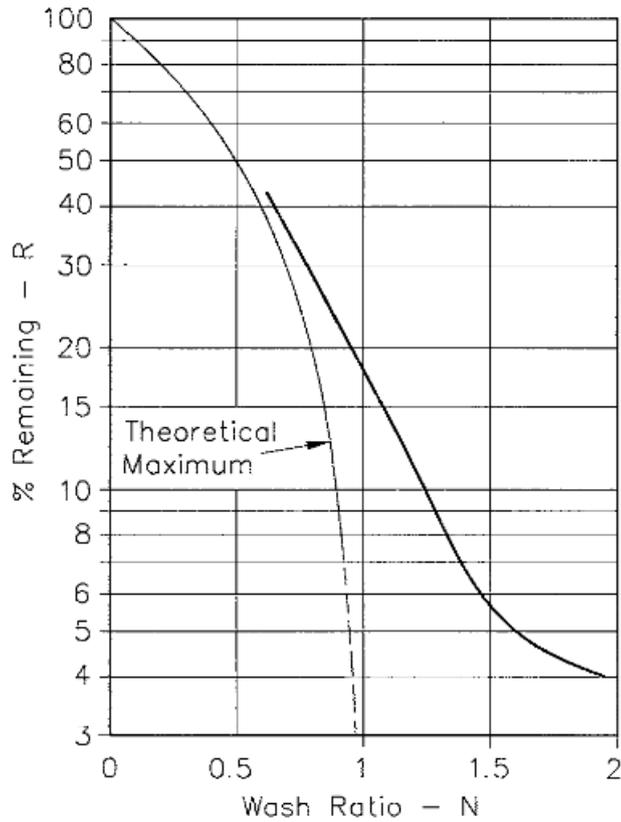


Figura 4.4: Grafico per la determinazione del rapporto di lavaggio. Tratto da [27]

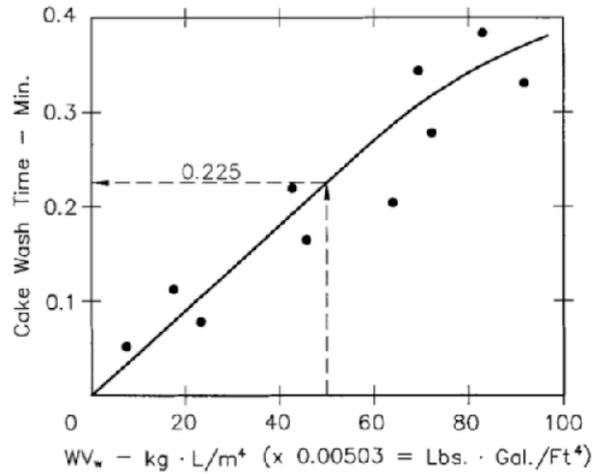


Figura 4.5: Grafico per la determinazione del tempo di lavaggio. Tratto da [27]

4.5.6 Miscelatori (ST-101, ST-102, ST-103, ST-104).

Sono stati scelti dei miscelatori con 4 deflettori a lama piatta con angolo di 45°. Per il dimensionamento si è fatto ricorso alla seguente equazione per il calcolo della velocità minima necessaria alla sospensione del solido:

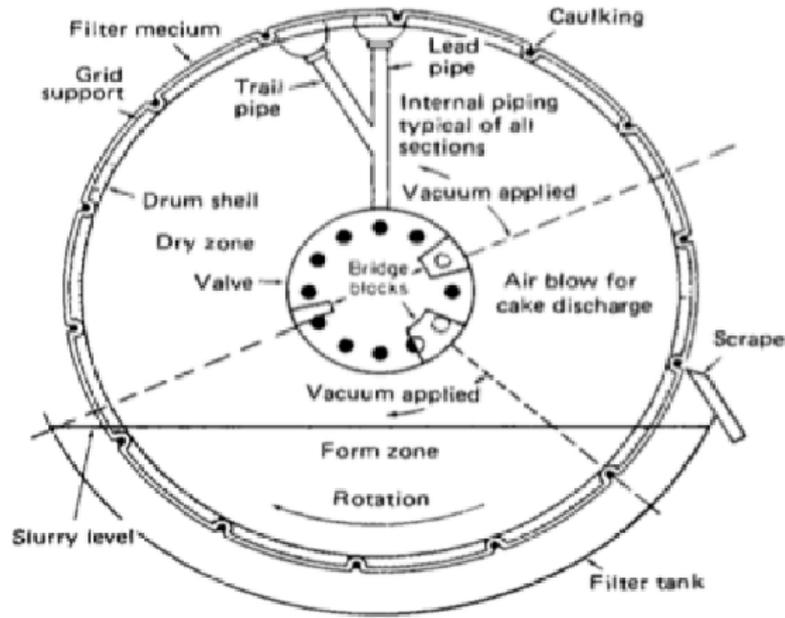


Figura 4.6: Schema illustrante la tipologia di filtro utilizzata. Tratto da [27]

$$N_{js} = S\nu^{0.1} d_P^{0.2} \left(\frac{g(\rho_S - \rho_L)}{\rho_L} \right)^{0.45} \frac{X^{0.13}}{D^{0.85}}; \quad (4.7)$$

Questa quantità viene maggiorata del 10%, ottenendo N in rps (giri al secondo) e viene quindi calcolato il numero di Reynolds definito in (4.8).

$$Re = \frac{DN\rho}{\mu} \quad (4.8)$$

Grazie ai grafici forniti da [27] (figura 18-17 a pagina 18-13) si ottiene il fattore di potenza N_P . Si calcola infine la potenza tramite la (4.9).

$$P = N_P \rho N^3 \frac{D^5}{g_c} \quad (4.9)$$

Dove:

- P è la potenza;
- ρ è la densità;
- D è il diametro dell'*impeller*;
- g_c è una costante caratteristica del sistema (pari a 1 se si utilizzano le unità del SI);

4.5.7 Serbatoi.

Sono stati scelti dei serbatoi cilindrici a fondo emisferico con raccordi toroidali. Si è considerato un tempo di permanenza pari a 50 minuti ed il volume è stato maggiorato arbitrariamente del 20% (spazio di disimpegno) e la scelta è stata effettuata tra i valori di volume disponibili sul mercato (si veda figura 4.9).

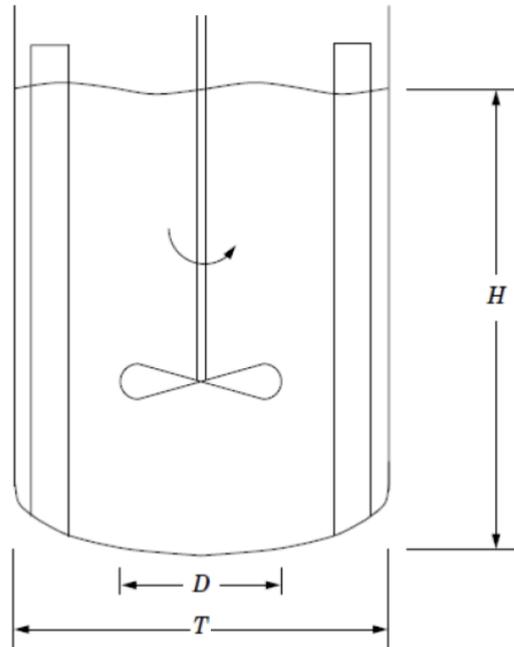


Figura 4.7: Schema agitatore meccanico. Tratto da [27]

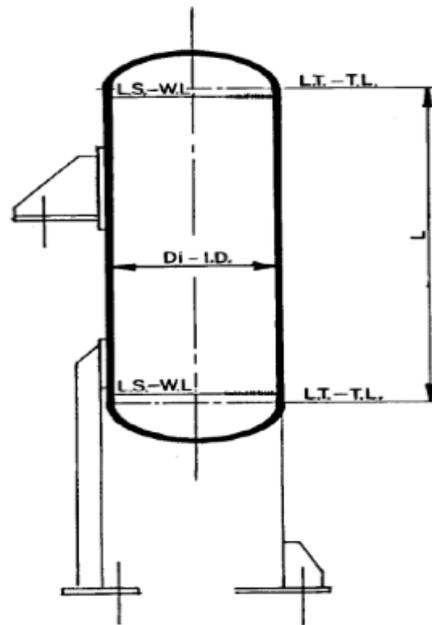


Figura 4.8: Dimensioni caratteristiche serbatoio.

4.5.8 Scambiatori di calore (HE-101).

L'inserimento di uno scambiatore di calore è stato necessario per raffreddare la corrente di estratto che va dal primo al secondo stadio (corrente 50). La corrente deve essere raffreddata da 41°C a 33°C (temperatura di ingresso del liquido nel primo stadio in ST-103). Per il calcolo della superficie di scambio e la tipologia di scambiatore è stato utilizzato il *Perry's Chemical Engineers' Handbook*. E' stata scelta la tipologia di

CAPACITA' NOMINALE Nominal capacity (m^3)	Di I.D. (mm)	L (mm)
1	900	1500
2	1100	2000
3	1200	2500
4	1300	3000
5	1400	3000
7,5	1600	3500
10	1800	3500
15	2000	4500
20	2200	5000
25	2400	5000
30	2600	5500
50	3000	6500
80	3200	9000
100	3200	11500

Figura 4.9: Dimensioni caratteristiche commerciali serbatoio.

scambiatore *shell and tube*, data la bassa potenza scambiata. Per la determinazione del coefficiente globale di scambio si è ricorso ai dati tabulati del manuale (tabella 11-3, da [27]), da cui è stato preso il valore minimo come ipotesi cautelativa. Si considera un flusso turbolento sia lato shell che lato tubi. La superficie necessaria allo scambio è pari a $5 m^2$

4.5.9 Separatori a membrana polimerica (MS-101, MS-102).

Per il recupero e l'allontanamento del solvente dalla corrente di estratto sono state utilizzate delle membrane da NanoFiltrazione, evitando così gli enormi costi energetici derivanti da eventuali apparecchiature per l'evaporazione del liquido. Sono stati eseguiti dei test su di un piccolo impianto pilota fornito dall'azienda *HydroAirResearch*, processando una corrente di estratto di vinaccia d'uva in acqua. Dai dati ottenuti dalle analisi di Folin-Ciocalteu sul campione concentrato e sul permeato (riassunti nella tabella 4.7), sono stati calcolati il flusso al solvente e la reiezione percentuale ai soluti considerati (tabella 4.8) utilizzati poi per la determinazione dell'efficienza di separazione e della superficie necessaria. In quanto al flusso di permeato, è stato maggiorato del 30% (a causa della temperatura maggiore rispetto a quella mantenuta durante il test) secondo le indicazioni fornite dal costruttore. Le superfici necessarie sono visionabili in tabella 4.9.

	Volume (L)	Conc.PF(g_{GAE}/L)	Conc.estr.secco($g_{EXTR.}/L$)
Retentato	8,6	1,071	10,8
Permeato	91,4	0,003	0,123

Tabella 4.7: Dati sperimentali separazione a membrana impianto pilota.

$\%R_{EXTR.}$	$\%R_{PF}$	Flussopermeato(L/m ² /h)
89	95	31

Tabella 4.8: Parametri caratteristici membrana.

MS-101	MS-102
82 m ²	254 m ²

Tabella 4.9: Superficie installata membrane.

4.5.10 Omogeneizzatore KONMIX e pressa a vite (KM-101, SP-101).

Riguardo all'omogeneizzatore (KM-101) ed alla pressa (SP-101) non è stato necessario effettuare il dimensionamento poichè si è scelto di usare dei modelli disponibili sul mercato. Si utilizza un *high shear homogenizer* della KONMIX modello KRB/3 (potenza nominale 4kW, portata massima pari a 5 m³/h). Riguardo la pressa, è stato scelto il modello MDS-132 della BENENV. Da prove eseguite su un impianto pilota è stato dimostrato che l'omogeneizzatore, grazie agli elevati sforzi di taglio che genera nel fluido, può consentire di incrementare l'efficienza di estrazione anche se non ai livelli consentiti dall'utilizzo di un sistema ad US. Viene di seguito riportata la curva cinetica sperimentale ottenuta nelle prove, insieme alla linearizzazione eseguita nel calcolo delle costanti del Modello di Peleg (figure 4.10 e 4.11).

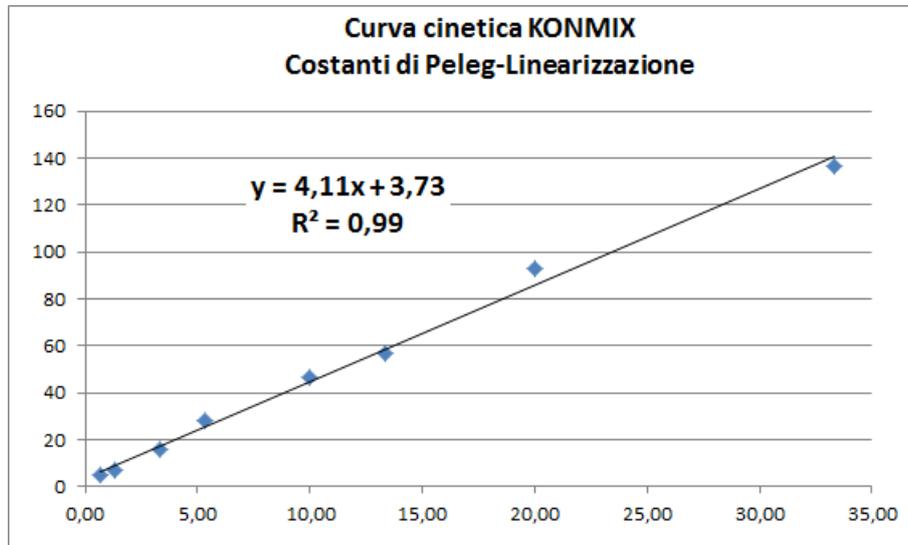


Figura 4.10: Determinazioni delle costanti del modello. Linearizzazione.

Risulta perciò $k_1 = 3,73$ e $k_2 = 4,11$. Di seguito viene invece riportato un'immagine illustrante lo schema di funzionamento della pressa a vite (4.13).

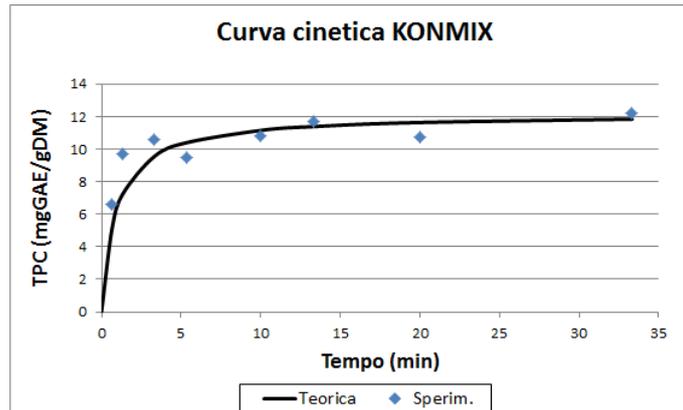


Figura 4.11: Determinazioni delle costanti del modello. Curva cinetica.

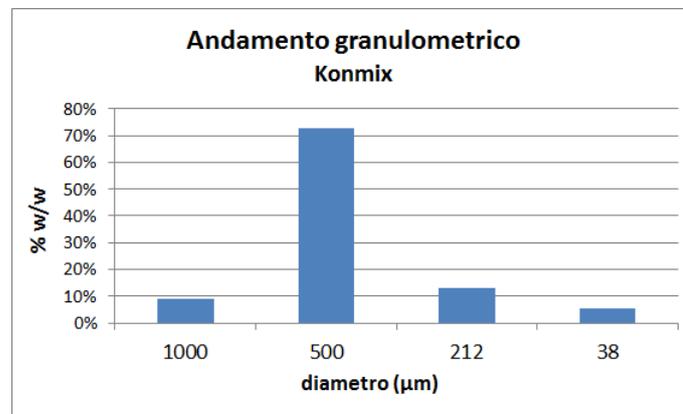


Figura 4.12: Andamento della granulometria dopo passaggio in KONMIX.

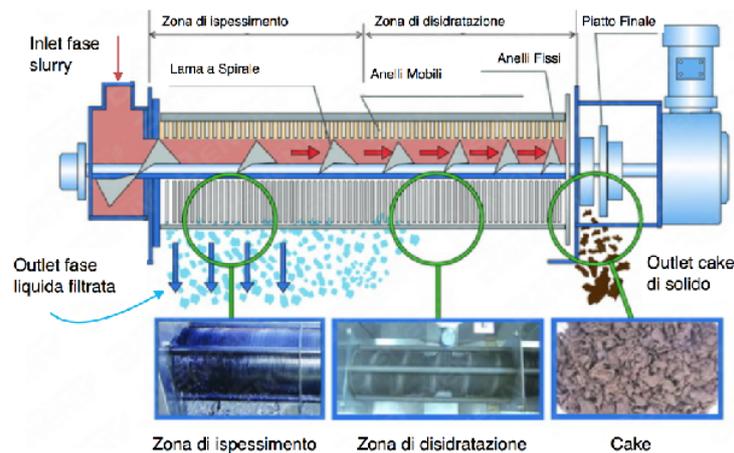


Figura 4.13: Schema costruttivo della pressa a vite utilizzata.

4.6 Sistema di controllo automatico.

Al fine del controllo di processo è stato scelto di inserire i seguenti *loop*:

- Controllo di portata in rapporto tra corrente numero 3 e numero 2. Viene garantito un rapporto L/S di $10 \text{ m}^3/\text{ton}$

- Controllo di portata in rapporto tra corrente numero 30 e numero 37. Viene garantito un rapporto L/S di $10 \text{ m}^3/\text{ton}$;
- Nei filtri a tamburo rotante (**RF-101**, **RF-102**, **RF-103**) vengono controllati il livello del liquido e la pressione;
- Controllo pressione **SP-101** mediante regolazione aria compressa su controcono di pressione;
- Controllo temperatura fluido caldo (corrente 51) in uscita da scambiatore (**HE-101**);
- Controllo pressione su correnti in ingresso a **MS-101** e **MS-102** al fine di evitare danni alla membrana.

Capitolo 5

Conclusioni.

Durante questa tesi, è stato definito un protocollo ottimizzato per l'estrazione da vinaccia d'uva di polifenoli, utilizzando acqua come solvente e sfruttando l'intensificazione degli ultrasuoni (US). Questo è avvenuto tramite lo *screening* delle principali variabili che influiscono sull'efficienza del processo. È stata definita una procedura di comminazione della matrice in modo da ridurre il diametro medio delle particelle ed incrementare la velocità di scambio di materia. La tecnica impiegata è stata la criomacinazione, che prevede il congelamento della matrice in azoto liquido e il successivo passaggio in un planetario a sfere.

A scopo di confronto è stata ricavata una curva granulometrica del solido trattato in questo modo, tramite passaggio su appositi setacci. L'andamento delle rese estrattive è stato monitorato principalmente tramite valutazione di due parametri: la resa di estratto secco per grammo di matrice ed il contenuto totale di polifenoli (*Total Polyphenols Content-TPC*). Il TPC è stato misurato mediante il metodo analitico di Folin-Ciocalteu, registrando l'assorbanza dell'apposito reattivo all'interno dei campioni ad una lunghezza d'onda di 725 nm, grazie ad uno spettrometro UV-vis. Sui campioni ottimizzati è stata poi condotta un'identificazione generale dei polifenoli presenti nell'estratto, tramite analisi HPLC-DAD, registrando i cromatogrammi alle lunghezze d'onda tipiche per le diverse famiglie di metaboliti. Da questi dati risulta che gli estratti hanno un contenuto predominante di composti della classe delle catechine. Sono state anche riscontrate piccole quantità di acidi fenolici (simil-acido gallico) oltre che alcune antocianine. Per l'esecuzione delle prove estrattive sono stati utilizzati diversi approcci e reattori.

La determinazione della quantità massima di polifenoli estraibile è stata eseguita in un sistema convenzionale a riflusso, in cui il solvente viene ricondensato in continuo nella camera di reazione, permettendo di lavorare alla temperatura di ebollizione dello stesso. A questo scopo viene testata l'affinità verso diversi solventi (acqua, acqua in ambiente acido e soluzione idroalcolica) valutandone quindi il TPC.

Il miglior solvente estrattivo, come atteso, si è rivelato essere la soluzione idroalcolica ($H_2O + EtOH50\%v/v$), nonostante in questo solvente si ritrovi una quantità maggiore di proantocianidine, poco solubili in acqua e quindi poco adatte alla formulazione di supplementi alimentari idrosolubili (uno dei possibili utilizzi dei polifenoli). Questa estrazione è stata impiegata come confronto con una tecnica ed un solvente convenzionale, in contrapposizione con il processo assistito da US.

I medesimi test eseguiti a ricadere sono stati condotti anche sulla frazione di vinaccioli contenuti della matrice (il 44% in massa del totale) al fine di scorporare il contributo dato ai TPC dai diversi costituenti della vinaccia. Considerando che il

solvente d'estrazione su cui si focalizza questo lavoro di tesi è l'acqua, e visti gli scarsi risultati ottenuti dai semi estratti in essa, si è scelto di separare le due frazioni e destinare i vinaccioli alla pressatura a freddo per l'ottenimento di olio.

Dopo la caratterizzazione della matrice condotta in questo modo, si è passati a valutare due diversi sistemi di estrazione assistiti da ultrasuoni. Il tipo *probe-type*, costituito da un *horn* in titanio ed un generatore di ultrasuoni a potenza modulabile (300 W - 500 W) e frequenza di 21 kHz, e un sistema di tipo *cup-horn*. Per quest'ultima tipologia di sistema è stato utilizzato l'estrattore REUSS (Contes, Francia), alimentato da un generatore di ultrasuoni alla potenza fissa di 200 W e alla frequenza di 24 kHz. Il sistema di tipo *probe-type* non è stato comunque considerato ai fini del lavoro in quanto, come risultato dai bilanci di energia, poco efficiente nella trasmissione dell'energia acustica alla sospensione solido-liquido. Concentrandosi quindi sul sistema *cup-horn*, si è determinato il rapporto solido-liquido (S/L) ottimale per trattamenti a 35°C (più vicino possibile a RT), monitorando l'andamento del TPC. I risultati migliori sono stati ottenuti al crescere della quantità di liquido, tuttavia non sono stati considerati rapporti superiori a 1 g/30 mL, per via delle elevate portate di solvente che sarebbero state necessarie per trasporre il processo su scala industriale.

Fissato questo parametro, nello stesso sistema sono state quindi determinate le cinetiche di estrazione a 35°C per un intervallo di trattamento compreso tra 2 e 60 minuti, considerando acqua ed acqua in ambiente acido (pH=2,5 mediante aggiunta di acido cloridrico al 36%). E' stato osservato che i valori di TPC, nel primo caso, subiscono una rapida diminuzione dopo circa dieci minuti di trattamento.

Questo fenomeno è stato ipotizzato essere conseguenza della degradazione cui vanno incontro i composti polifenolici in ambienti ricchi di radicali molto reattivi (tipici dei sistemi ad US). La soluzione acida è stata utilizzata al fine di ottenere una maggiore stabilità della frazione antocianica, fatto poi verificato, ma con conseguenze negative su resa e selettività riguardo all'estrazione complessiva dei polifenoli (riduzione di resa del 40% rispetto all'utilizzo di sola acqua, nei primi 10 minuti di trattamento).

I dati ottenuti dalle cinetiche di estrazione per i due diversi sistemi US assistiti, sono stati utilizzati per la determinazione delle costanti caratteristiche del modello di Peleg, ottenendo così una curva teorica in grado di descrivere l'andamento dell'estrazione nel tempo. Tuttavia, avendo riscontrato un forte fenomeno di denaturazione nel caso di estrazione condotta a pH neutri, per la costruzione dell'apposita curva cinetica si è reso necessario definire anche una cinetica di degradazione. I dati acquisiti sono stati quindi impiegati per adeguare i valori di TPC ottenuti in acqua nel sistema a US, estrapolando la relativa equazione, emendata della componente degradativa.

Considerando la definizione di flusso di materia data dalla legge della diffusione di Fick sono stati inoltre calcolati i coefficienti di scambio di materia $k_L a$ (la determinazione dell'area specifica di scambio è molto complessa per sistemi solido-liquido di questo genere, rendendo perciò impossibile calcolare il solo coefficiente k_L). Il coefficiente è stato calcolato nel punto di "ginocchio" della curva cinetica calcolata secondo Peleg, in cui la forza spingente per lo scambio di materia è massimo ($k_L a = 0,6 \text{ min}^{-1}$).

Per poter ottenere un confronto con il sistema *cup-horn*, sono state condotte prove in condizioni silenti, applicando medesimi parametri di temperatura e rapporto S/L, in un sistema agitato meccanicamente, con agitatore alla velocità di rotazione di 400

RPM.

L'estrazione assistita da US ha permesso di ottenere rese e selettività di estrazioni superiori del 30% rispetto al sistema ad agitazione meccanica nei primi minuti di trattamento. Dopo i 10 minuti di sonicazione i fenomeni di degradazione diventano preponderanti rendendo questo tipo di sistema meno performante. Questo fenomeno non è stato osservato per il sistema ad agitazione in cui quindi le sostanze estratte non vengono degradate. Questo problema assume rilevanza minore se si considera che il punto di lavoro scelto, dal ginocchio delle curve cinetiche, cade tra i 2 e gli 8 minuti, consentendo perciò di non considerare i fenomeni degradativi.

Un aspetto critico per le estrazioni è la temperatura a cui esse vengono condotte. Per entrambi i sistemi (US e convenzionale) sono state quindi eseguite delle variazioni di questo parametro. Come risultato dalle prove, l'incremento di temperatura favorisce la resa e la selettività di estrazione in entrambe le configurazioni. Per il sistema a US comunque tali incrementi sono consistenti solamente fino a 50 °C, temperatura oltre la quale il fenomeno della cavitazione ultrasonica perde di efficienza, consentendo perciò una minore intensificazione del processo estrattivo. In eventuali applicazioni industriali sarebbe comunque preferibile mantenere la T a 35 °C per ragioni legate al risparmio di *utilities*

Al procedere dei test, è risultato chiaro come uno dei maggiori problemi riguardanti l'estratto di vinaccia ottenuto sia il basso livello di purezza in polifenoli (bassa selettività di estrazione). A questo scopo si è deciso di applicare uno stadio di desaccarificazione, precedente all'estrazione vera e propria. Questo stadio è stato eseguito in un sistema agitato meccanicamente a bassa temperatura (1-2 °C) ed utilizzando un rapporto S/L di 1g / 10 mL. Si è scelto di operare in queste condizioni, sfavorevoli alla solubilizzazione dei polifenoli, in modo da riuscire ad allontanare la quantità maggiore possibile di zuccheri e sali minerali ed ottenere estratti con una più alta frazione di composti attivi negli stadi successivi. Nello stadio successivo alla desaccarificazione, la selettività di estrazione è incrementata del 37% per l'UAE e del 44% nel caso del sistema ad agitazione meccanica.

Si è valutato infine l'esaurimento della matrice tramite estrazioni US assistite in stadi multipli, sia in configurazione a flussi incrociati che in controcorrente, ciascuno della durata di 6 minuti, in modo da rimanere sul punto di ginocchio della curva estrattiva senza raggiungere la degradazione dei composti attivi. Da questi esperimenti è stata calcolata la costante di ripartizione ($k = 0,038$) tra la fase solida e il solvente, considerando che alla fine del trattamento di sonicazione fosse stato raggiunto l'equilibrio.

I valori delle costanti e dei parametri ottenuti nell'attività di laboratorio, sono stati utilizzati per la progettazione e dimensionamento di un impianto industriale volto all'estrazione assistita da ultrasuoni di vinaccia d'uva in acqua. Lo stadio di criomacinazione, per motivi di costi, è sostituito da un passaggio in un omogeneizzatore (KONMIX, *in line high shear homogenizer*). Su tale tipo di apparecchiatura sono state anche eseguite delle prove di estrazione e ne è stata determinata sia la curva granulometrica risultante che la curva cinetica di estrazione mediante il modello di Peleg. Sul prodotto ottenuto tramite questo processo sono stati inoltre condotti dei test di concentrazione su di un impianto pilota a membrane per nanofiltrazione, *HydroAirResearch*. È stato calcolato il flusso al solvente, pari a $31 \frac{L}{h * m^2}$ e la reiezione ai soluti (89%). L'utilizzo delle membrane è risultato conveniente per la separazione del solvente (la corrente è stata concentrata di 9 volte), evitando così di doverlo evaporare tutto. L'estratto ottenuto dalla corrente di retentato ha comunque una concentrazione di PF

troppo bassa ai fini commerciali (frazione in massa di PF del 10%).

L'impianto progettato è stato collocato idealmente in Piemonte e possiede una potenzialità di 2000 ton/anno, trattate in un arco temporale di 84 giorni (dal 20 Settembre al 20 Dicembre, processando quindi una portata di 1 ton/h di vinaccia) ed è stato considerato un rapporto di *turndown* che va dal 50% al 110% della potenzialità nominale. L'approvvigionamento della matrice avviene nei periodi tipici della vendemmia (20 Settembre - 20 Ottobre) e questa viene conferita così come si presenta in uscita dal processo di vinificazione (umidità al 45%). Bisogna perciò essiccare la biomassa fino a raggiungere un contenuto di umidità non superiore al 10% così da evitare la degradazione della matrice durante lo stoccaggio. Il cuore dell'impianto è costituito da un doppio stadio di estrazione in controcorrente, rappresentato da due estrattori ad ultrasuoni del tipo *flow-through cell* (*Weber Ultrasonic*). L'impianto progettato consente di ottenere 125 ton/anno di estratto di vinaccia, all'11% in massa di polifenoli (recupero del 79 %). Il principale vantaggio dell'impianto considerato è sicuramente la possibilità di utilizzare acqua come solvente. Ciò comporta costi minori sia nell'acquisto del solvente sia nelle fasi di recupero e smaltimento. Inoltre, la temperatura relativamente bassa (35°C) consente ulteriori risparmi energetici molto consistenti se si considera l'elevato rapporto solido liquido e quindi la grande quantità di energia che sarebbe richiesta. La sezione di concentrazione via membrane consente il recupero del solvente e la concentrazione della corrente di prodotto a costi ridotti, evitando l'utilizzo di apparecchiature evaporative. In questo caso infatti, un'eventuale distillazione dovrebbe essere condotta sottovuoto a bassa temperatura (per evitare la degradazione dei composti polifenolici), comportando maggiori costi e difficoltà tecniche. Altro aspetto fondamentale è l'adattabilità dell'impianto a diversi tipi di biomassa. Si riesce così a superare i problemi imposti dalla stagionalità della biomassa trattata.

Il principale problema è invece rappresentato dalla relativamente ridotta concentrazione massica nella corrente di prodotto in uscita dall'impianto (10 %). La separazione a membrane non ha consentito infatti una efficiente separazione a causa dei pesi molecolari molto simili tra i polifenoli e i polisaccaridi presenti nell'estratto. Considerando però la quantità di inorganici presenti nell'estratto finale, si potrebbe raggiungere una concentrazione massica del 20% (livello minimo per la commercializzazione), eliminando i sali presenti nell'estratto con delle resine a scambio ionico. Questo tipo di approccio potrebbe essere applicato anche per raggiungere concentrazioni estremamente più elevate, impiegando materiali selettivi verso i polifenoli.

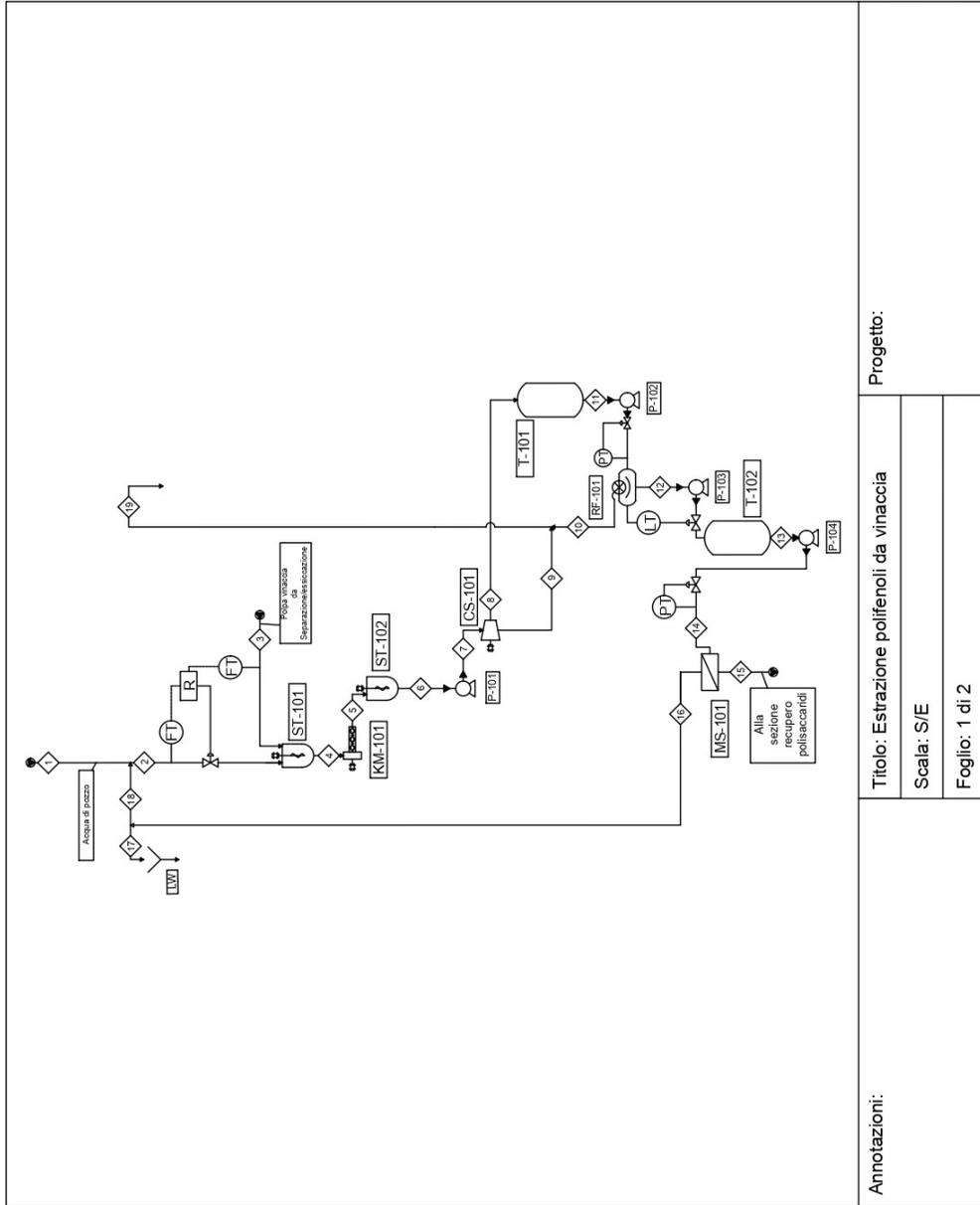
Bibliografia

- [1] Wikipedia (2019), *Storia del vino*, 'https://it.wikipedia.org/wiki/Storia_del_vino', L'enciclopedia libera.
- [2] Wikipedia (2019), *Uva*, 'https://it.wikipedia.org/wiki/Uva', L'enciclopedia libera.
- [3] Zacharof, M., *Grape Winery Waste as Feedstock for Bioconversions: Applying the Biorefinery Concept.*, **2016**
- [4] Devesa-Rey, R., *Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling.*, **2011**
- [5] Bravo, L., *Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance*, **1998**
- [6] Lu, Y., Foo, Y., *The polyphenol constituents of grape pomace*, **1999**
- [7] Beres, C., Costa, G., et al, *Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review*, **2017**
- [8] Tournour, H., Segundo, M., et al, *Valorization of grape pomace: Extraction of bioactive phenolics with antioxidant properties.*, **2015**
- [9] Arvanitoyannis, I., Ladas, D., Mavromatis, A., *Potential uses and applications of treated wine waste: a review.*, **2006**.
- [10] Wikipedia (2019), *Green Chemistry*, 'https://en.wikipedia.org/wiki/Green_chemistry', L'enciclopedia libera.
- [11] www.wineinstitute.org (2019), 'https://www.wineinstitute.org/resources/statistics', Wine institute.
- [12] regione.piemonte.it (2019), *Dati e valori del Piemonte vitivinicolo del 2017*, 'https://www.regione.piemonte.it/web/search/node?keys=produzione+vitivinicola'
- [13] Söliyom, C., et al, *Thermal degradation of grape marc polyphenols*, **2014**
- [14] Chemat, F., Vian, M., Cravotto, G., *Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles.*, **2012**.
- [15] Tang, S., et al, *The 24 Principles of Green Engineering and Green Chemistry: "IMPROVEMENTS PRODUCTIVELY"*, **2012**.
- [16] American Chemical Society, *Green Chemistry*, 'https://www.acs.org/content/acs/en/greenchemistry.html', www.acs.org, **2019**
- [17] Keil, F. J., *Modeling of Process Intensification – An Introduction and Overview.*, **2007**.
- [18] Stankiewicz, A. I., Moulijn, J., *Process Intensification: Transforming Chemical Engineering.*, **2000**.
- [19] Cravotto, G., Cintas, P., *Power ultrasound in organic synthesis: moving cavitation chemistry from academia to innovative and large-scale applications*, **2005**.
- [20] Toma, M., et al, *Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction.*, **2000**.

- [21] Xie, P., et al, *Reduced pressure extraction of oleuropein from olive leaves (Olea europaea L.) with ultrasound assistance.*, **2013**.
- [22] Gogate, P., *Cavitation reactors for process intensification of chemical processing applications: A critical review.*, **2007**.
- [23] Suslick, K., *The chemical effects of ultrasound.*, **1989**.
- [24] Chemat, F., et al, *Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications A Review*, **2016**.
- [25] Both, S., Chemat, F., Stube, J., *Extraction of polyphenols from black tea – Conventional and ultrasound assisted extraction.*, **2013**.
- [26] Peleg, M., *An Empirical model for the Description of Moisture Sorption Curves.*, **1988**.
- [27] Perry, R.H., *Perry's Chemical Engineers' Handbook.*, **2007**.

Appendice A

Process Flow Diagram



Annotazioni:

Titolo: Estrazione pollfenoli da vinaccia

Scala: S/E

Foglio: 1 di 2

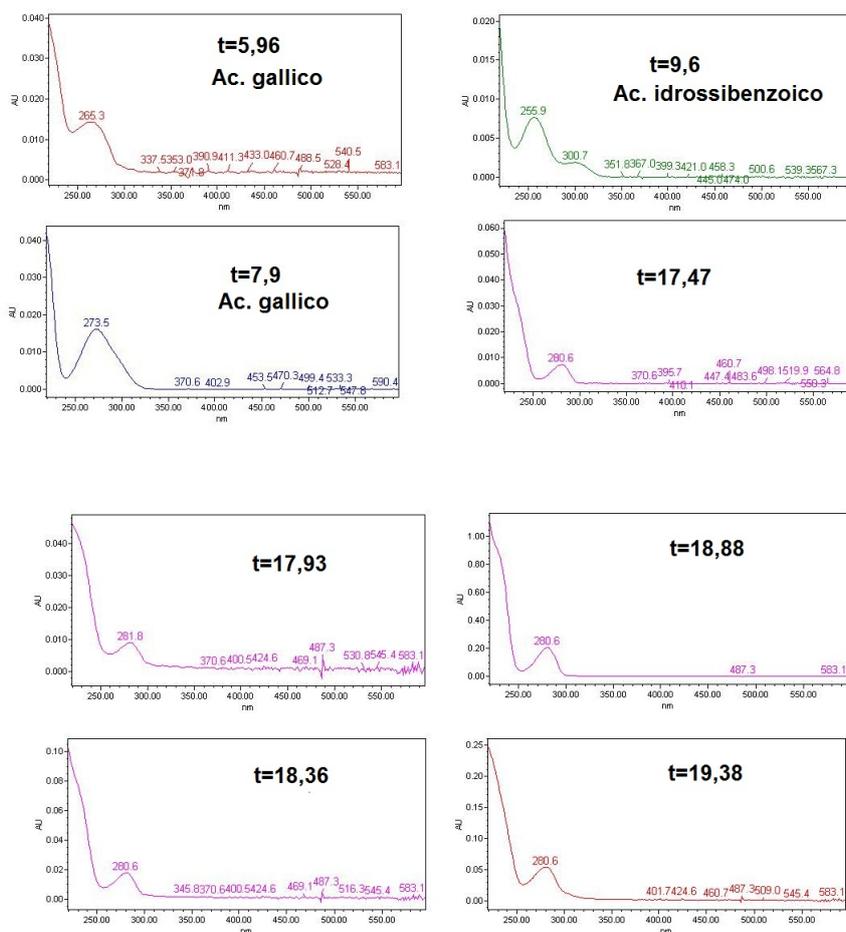
Progetto:

Appendice B

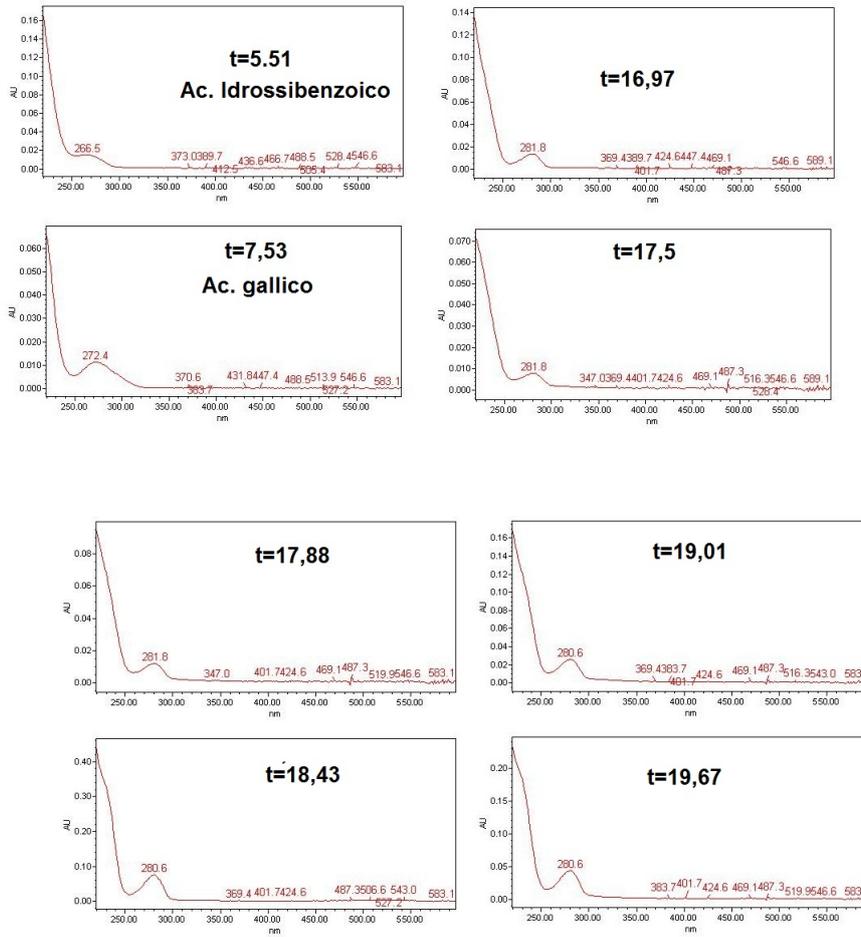
Assorbanze HPLC

Vengono di seguito riportati gli spettri di assorbimento ottenuti dall'analisi HPLC. Il tempo indicato nei grafici è misurato in minuti ed indica il tempo di ritenzione. Se non specificato diversamente lo spettro di assorbimento si riferisce a molecole appartenenti alla classe delle catechine.

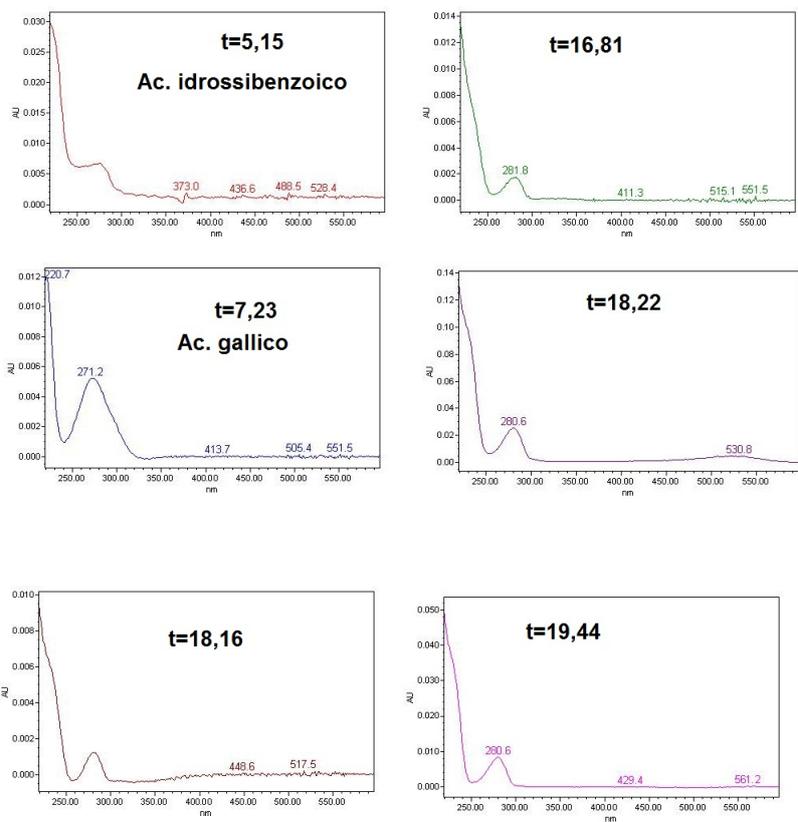
B.1 EXT-01



B.2 EXT-02



B.3 EXT-03



B.4 EXT-04

