

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

Estrazione di carotenoidi da scarti della lavorazione del pomodoro tramite Deep Eutectic Solvent



Relatore

dott.ssa Silvia FRATERRIGO GAROFALO
prof. Debora FINO

Candidato

Veronica MALLEN

Ottobre 2023

*“Niente nella vita va temuto,
dev'essere solamente compreso.
Ora è tempo di comprendere di più,
così possiamo temere di meno”*

Marie Curie

Indice

1	Introduzione	1
1.1	Il pomodoro	1
1.1.1	Le origini del pomodoro	1
1.1.2	La coltivazione del pomodoro.....	1
1.1.3	L'utilizzo industriale del pomodoro	2
1.2	Valorizzazione dei cascami	3
1.2.1	I carotenoidi	3
1.2.2	Il licopene.....	4
1.2.3	Il β -carotene	5
1.2.4	Possibili applicazioni.....	6
1.3	Estrazione con solvente.....	7
1.3.1	I solventi organici.....	7
1.3.2	I DES	8
1.3.3	I NaDES.....	11
1.4	Stato dell'arte.....	12
1.4.1	Estrazione con solventi organici	12
1.4.2	Estrazione con DES.....	14
1.4.3	Estrazione assistita	14
1.5	Scopo della tesi.....	16
2	Materiali e metodi.....	19
2.1	Composti chimici utilizzati	19
2.2	Caratterizzazione matrice.....	19
2.2.1	Umidità	19
2.2.2	Proteine	20
2.2.3	Lipidi	21
2.2.4	Ceneri.....	22
2.2.5	Carboidrati	22
2.2.6	Polifenoli.....	23
2.2.7	Carotenoidi.....	25
2.3	Deep Eutectic Solvent.....	27
2.3.1	Sintesi	27
2.3.2	Densità	30
2.3.3	Viscosità.....	30

2.3.4	Spettro IR.....	31
2.4	Screening DES.....	31
2.5	Procedura estrattiva.....	32
2.6	Design Of Experiment (DOE).....	33
2.6.1	DOE a 3 variabili.....	34
2.6.2	DOE a 2 variabili.....	36
2.7	Estrazione nelle condizioni migliori del DOE	38
2.7.1	Estrazione con acetone	38
2.7.2	Estrazione con etere di petrolio.....	39
2.8	Cinetica di estrazione.....	39
2.9	Caratterizzazione dell'estratto	41
3	Risultati	43
3.1	Caratterizzazione matrice.....	43
3.1.1	Molecole bioattive.....	44
3.2	Deep Eutectic Solvent.....	46
3.2.1	Sintesi	46
3.2.2	Densità	48
3.2.3	Viscosità.....	49
3.2.4	Spettro IR.....	51
3.3	Screening DES.....	56
3.4	Design Of Experiment (DOE).....	58
3.4.1	DOE a 3 variabili.....	58
3.4.2	DOE a 2 variabili.....	64
3.4.1	Elaborazione modello del DOE a 2 variabili	64
3.4.2	Superfici di risposta del DOE a 2 variabili	68
3.4.1	Predizione del DOE a 2 variabili.....	71
3.5	Estrazione nelle condizioni migliori del DOE	73
3.6	Cinetica di estrazione.....	73
3.6.1	Modello di Peleg	75
3.7	Caratterizzazione dell'estratto	77
3.7.1	Retta di taratura del β -carotene per l'HPLC	77
3.7.2	Retta di taratura del licopene per l'HPLC	78
3.7.3	Analisi HPLC	79

4	Analisi e sviluppi futuri	81
4.1	Determinazione potere antiossidante dei carotenoidi	81
4.2	Separazione DES	81
5	Conclusioni	83
6	Riferimenti bibliografici	85
	Indice delle figure.....	I
	Indice delle tabelle.....	III

1 Introduzione

1.1 *Il pomodoro*

1.1.1 Le origini del pomodoro

Il pomodoro (*Solanum lycopersicum* L.) è un frutto appartenente alla famiglia delle Solanaceae originario del Sudamerica occidentale. La popolazione che abitava quelle regioni, i Maya, lo coltivarono e lo diffusero nelle Americhe. Gli Aztechi, che vivevano in Messico, lo chiamarono tomatl ovvero frutto polposo. Fu scoperto intorno al 1520 dal conquistador Hernán Cortés. Grazie ai viaggi compiuti da Cristoforo Colombo, i semi della pianta arrivarono per la prima volta in Spagna nel XVI secolo, qui prese il nome di tomate, come riportato dai dizionari. I pomodori portati in Europa erano in realtà due con caratteristiche diverse: il pomodoro e il tomatillo, il primo aveva il caratteristico aspetto del pomodoro rosso e tondo mentre il secondo possedeva un involucro verde che si spaccava quando il frutto all'interno era maturo e veniva utilizzato in cucina per la salsa verde messicana.

Inizialmente il pomodoro era indigesto agli europei poiché conteneva troppa solanina, un glicocaloide tossico che provoca alterazioni nervose, così fu utilizzato come pianta ornamentale o medicinale. Un erborista olandese lo reputò addirittura afrodisiaco. [1]

L'Italia fu il secondo paese europeo a conoscere il pomodoro, in particolare la prima testimonianza ufficiale fu nel 1548 quando Cosimo de' Medici ricevette in regalo un cesto di pomodori. La pianta si diffuse lentamente nel nostro Paese a causa della diffidenza del popolo in quanto difficilmente associabile ad altri cibi noti a quell'epoca, inoltre, non aiutava a combattere la fame come facevano la patata e il mais. Inizialmente fu introdotto negli orti botanici e negli anni a seguire si iniziò a coltivarlo. Soltanto nel XVIII secolo il pomodoro iniziò ad essere affermato come ingrediente da cucina con la stessa fama attuale. [2]

Oggi il pomodoro è uno degli alimenti più conosciuti in Europa grazie anche alla sua capacità di associarsi a un'enorme varietà di altri alimenti ed erbe aromatiche. In Italia è considerato il re della cucina mediterranea a causa dell'elevato consumo nella dieta, infatti, lo troviamo nella pasta al pomodoro, nella pizza, nella parmigiana, nell'insalata o nella caprese, con le bruschette e in tanti altri piatti tipici.

1.1.2 La coltivazione del pomodoro

Il pomodoro è una pianta orticola amante degli habitat caldi (12-30 °C) e predilige terreni drenanti ed esposti al sole, ma grazie alla sua capacità di adattamento si è facilmente diffusa in tutto il mondo. Presenta circa 75.000 varietà che si adeguano ai differenti climi e terreni di coltivazione, anche a quelli più estremi.

In Italia, grazie alla conformazione del suo territorio e alle condizioni pedoclimatiche, è possibile produrre il pomodoro tutto l'anno sfruttando le diverse latitudini e la coltivazione protetta. La produzione è localizzata principalmente in Puglia e in Emilia-Romagna, seguono Campania e Sicilia. [3]

L'ultima statistica pubblicata dall'Organizzazione delle Nazioni Unite (FAO) riguardante le culture fa riferimento all'anno solare 2021. La produzione mondiale di pomodoro, in

quell'anno, si è aggirata intorno 256,8 milioni di tonnellate, di cui il 2,6% ovvero circa 6,64 milioni di tonnellate è stato raccolto in Italia. [4]

1.1.3 L'utilizzo industriale del pomodoro

Il pomodoro richiesto dall'industria alimentare, noto come pomodoro da industria, deve rispettare alcune caratteristiche principali, tra cui: polpa molto consistente, piccola taglia, rapida maturazione, facile distacco dalla pianta e resistenza alle malattie. Circa l'85% della produzione di pomodoro è destinata all'industria alimentare rendendo l'Italia il primo trasformatore al mondo di derivati di pomodoro destinati direttamente al consumo finale. [5]

Nel 2023 l'Italia risulta il terzo paese produttore al mondo di pomodoro da industria, dopo Stati Uniti e Cina, mentre su scala europea si colloca al primo posto. [6] Nel 2022 sono state trasformate 5,5 milioni di tonnellate di pomodoro ottenute dalla semina di 65.180 ettari, nonostante i problemi di siccità riscontrati. [7] Nel 2023 risultano, invece, messi a coltura circa 68.600 ettari di terreno con una previsione di produzione stimata intorno di 5,6 milioni di tonnellate ma dipenderà dalle rese agricole e dal maltempo che negli scorsi mesi ha già danneggiato gravemente il raccolto. [8]

La necessità di conservare il pomodoro per tutto l'anno ha portato la filiera alimentare a trattarlo per produrre salsa, polpa e concentrato, ciascuno di essi richiede un diverso processo produttivo che garantisce proprietà e sapori caratteristici. È inevitabile che l'industria produca degli scarti durante le lavorazioni della materia prima. Di seguito si riportano i dettagli dei derivati del pomodoro.

- Salsa o passata di pomodoro: è un prodotto cotto e frullato, usato come base per sughi e salse, si presenta privo di semi e bucce che costituiscono il sottoprodotto;
- Polpa: è una conserva di pomodori in pezzi che prevede l'aggiunta di succo o concentrato, sono privati della buccia che rappresenta lo scarto di produzione;
- Concentrato di pomodoro: il pomodoro è cotto per molte ore così da eliminare la maggior parte dell'acqua.

L'industria agroalimentare genera, durante la trasformazione, circa il 10-30% di sottoprodotti del pomodoro in ingresso. Questi sono chiamati nel loro insieme "cascami", si tratta di bucce, semi e frutti scartati che generalmente sono venduti o ceduti ad altre aziende. Abitualmente i cascami, mostrati in **Figura 1.1**, sono destinati all'alimentazione zootecnica. Accanto al classico riutilizzo, negli ultimi anni, le aziende di medie-grandi dimensioni hanno iniziato a pensare ed attuare strategie di valorizzazione di essi. [9]



Figura 1.1 Il pomodoro e i cascami prodotti dalla sua lavorazione

1.2 Valorizzazione dei cascami

Il pomodoro è un alimento ricco di vitamine, quali vitamina C, vitamina K e folati, ma anche di sali minerali come il potassio. Inoltre, rappresenta un'ottima fonte di fitonutrienti tra cui il β -carotene e il licopene. Il pomodoro fresco e tutti i suoi derivati contengono un'elevata quantità di antiossidanti capaci di ritardare l'invecchiamento e contrastare la crescita di cellule cancerogene. Il loro contenuto dipende fortemente da: grado di maturazione, varietà, parametri ambientali, tecniche agronomiche quali irrigazione e concimazione, periodo e località di coltivazione. [10]

La valorizzazione degli scarti e dei sottoprodotti dell'industria alimentare è fondamentale per garantire la sostenibilità ambientale. A seconda della trasformazione impiegata si distinguono due tipi di valorizzazione dei cascami differenti: quella energetica e quella non energetica.

La valorizzazione energetica usa i cascami come fonte di bioenergia basandosi su due processi:

- **Digestione anaerobica:** è la soluzione più sfruttata ed efficiente. È un processo biologico che avviene negli appositi "digestori" in cui, grazie all'azione di speciali microrganismi, avvengono specifiche reazioni chimiche che trasformano la sostanza organica in biogas in assenza di ossigeno. È stato dimostrato che la conversione dei cascami in biogas riduce l'impatto ambientale dell'8-15% in quanto limita la quantità di cascami e allo stesso tempo abbassa la richiesta di energia fossile; [9]
- **Torrefazione:** è una tecnologia ancora poco utilizzata, ma a differenza della precedente consente di raggiungere livelli qualitativi più alti. Richiede però che i cascami siano pretrattati in condizioni anaerobiche a pressione atmosferica e temperature comprese tra 200 e 300 °C. Si producono composti volatili con conseguente riduzione del peso dei cascami pari al 26%. [9]

L'obiettivo della valorizzazione non energetica, invece, è quello di recuperare i componenti bioattivi. Gli scarti contengono, a seconda della materia prima, rilevanti quantità residue di composti bioattivi, come proteine, lipidi, carboidrati e fibre. Il pomodoro presenta un elevato valore nutraceutico di grande interesse per le aziende farmaceutiche e alimentari per la produzione di integratori e alimenti funzionali. L'estrazione dei composti di interesse però può richiedere un costo elevato a causa dei trattamenti di cui il cascame potrebbe necessitare, come per esempio: pretrattamento della biomassa, purificazione ed essiccazione degli estratti e l'uso di grandi quantità di solventi. [9]

L'estrazione di molecole bioattive è un esempio di economia circolare in quanto gli scarti diventano materie prime in altri cicli produttivi, riducendo al minimo la quantità di rifiuti prodotti. Il costo dei prodotti nutraceutici è molto elevato a causa della loro scarsa biodisponibilità, risulta quindi fondamentale instaurare un processo di estrazione delle molecole ad alto valore aggiunto dagli scarti alimentari dove esse sono naturalmente presenti.

1.2.1 I carotenoidi

I carotenoidi rappresentano una vasta classe di pigmenti organici liposolubili, ovvero insolubili in acqua ma solubili nei lipidi. La struttura di base è un tetraterpene che presenta una lunga catena di 40 atomi di carbonio con doppi legami coniugati. Le proprietà cromofore dei carotenoidi dipendono dalla struttura e dalla lunghezza della catena centrale, all'aumentare del numero di insaturazioni coniugate il colore riflesso si sposta dal giallo al rosso in quanto

assorbono la luce a specifiche lunghezze d'onda nel campo del visibile (400-500 nm). Spesso la struttura assume forma ciclica. In presenza di luce, calore ed ossigeno tendono ad ossidarsi diventando incolori e perdendo le loro proprietà. [11]

I carotenoidi si suddividono in due gruppi: i primi sono i caroteni, caratterizzati da una struttura idrocarburica polinsaturata, i secondi, invece, sono le xantofille, derivati ossigenati dei caroteni. I caroteni sono abbondanti in arance, albicocche, carote, pomodori, peperoni e cachi. Mentre le xantofille si trovano nel mondo vegetale e in alcuni organismi animali. [12]

In natura sono noti almeno 600 tipi di carotenoidi, si trovano in molti alimenti, tra cui frutta, ortaggi e verdure a foglia verde. Nei vegetali i carotenoidi, contenuti nei cloroplasti, contribuiscono allo svolgimento della fotosintesi, assorbendo radiazioni luminose diverse da quelle della clorofilla svolgendo un'importante azione antiossidante. I carotenoidi sono presenti anche in molti organismi animali, come invertebrati, pesci e uccelli dove hanno funzione ornamentale e attrattiva. Gli esseri umani però non sono in grado di sintetizzarli quindi è necessario che siano introdotti esclusivamente attraverso l'alimentazione. In particolare, negli organismi animali i caroteni sono i precursori della vitamina A.

I carotenoidi più importanti presenti nel pomodoro sono il licopene e il β -carotene, di seguito se ne approfondiscono i dettagli.

1.2.2 Il licopene

Il licopene è un tetraterpene contenente 8 unità isopreniche, la cui formula molecolare è $C_{40}H_{56}$. La struttura presenta una lunga catena idrocarburica avente 11 legami coniugati e due anelli terminali aperti, mostrata in **Figura 1.2**. Nei vegetali, si presenta nella configurazione di tipo trans che risulta essere la più stabile termodinamicamente.

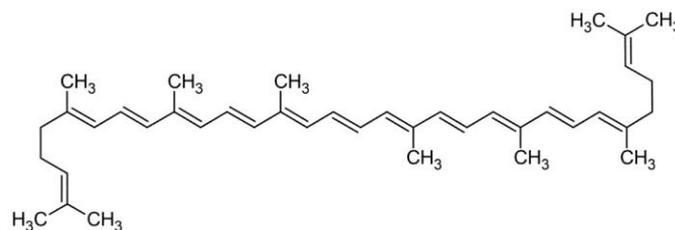


Figura 1.2 Struttura del licopene

Si trova nei frutti dal colore rosso, come pomodori, peperoni, anguria e pompelmo rosa. In particolare, nel pomodoro il licopene è l'ultimo carotenoide a formarsi ma è anche il più importante.

È un fitochimico sintetizzato soltanto dalle piante e dai microrganismi, gli organismi umani quindi sono obbligati ad assumerlo attraverso i cibi. Si tratta di un pigmento che dona il caratteristico colore rosso all'alimento che lo contiene, più la colorazione è rossa maggiore è il contenuto di licopene. È di grande interesse il fatto che i prodotti ottenuti dalla trasformazione del pomodoro riportano una maggior biodisponibilità di licopene rispetto ai pomodori freschi facendo sì che l'organismo umano riesca ad assorbirlo con maggiore facilità. Si è anche dimostrato che, se consumati insieme a una fonte di grassi buoni o alimenti contenenti β -carotene, l'assorbimento del licopene è favorito. [13]

Il mondo scientifico mostra grande interesse nella valorizzazione del licopene a causa dei benefici che esso è in grado di apportare. Nonostante sia il carotenoide maggiormente presente nell'organismo umano, è particolarmente consigliato il suo assorbimento per il benessere e la salute umana, pur non essendo un nutriente essenziale. La caratteristica principale è il suo elevato potere antiossidante, infatti, il licopene essendo una specie altamente reattiva è in grado di neutralizzare i radicali liberi, in particolare quelli dell'ossigeno. Questa sua peculiarità risulta molto importante nel proteggere l'epidermide dai danni causati dai raggi UV e nella prevenzione di malattie croniche, come cancro, malattie cardiovascolari ed osteoporosi. [14]

La richiesta di licopene è aumentata notevolmente negli anni, nel 2021 il valore commerciale di mercato è stato stimato intorno ai 126 milioni di dollari e si prevede che entro il 2026 raggiungerà i 161 milioni di dollari. [15] Poiché il costo del licopene ha raggiunto prezzi troppo elevati, oltre i 150 €/mg, i cascami di pomodoro risultano essere un'ottima materia prima per aumentare l'offerta. [16] [17]

Il licopene essendo una sostanza lipofila si concentra nei tessuti esterni del frutto rendendo ancor di più promettente il suo recupero dai sottoprodotti. Grazie a ricerche condotte sulle bucce di pomodoro, si è dimostrato che esse contengono elevati livelli di polifenoli totali ed attività antiossidante rispetto alle frazioni composte di semi e polpa. Infatti, il 53% dei polifenoli totali, il 52% dei flavonoidi totali, il 48% di licopene totale e il 43% dell'acido ascorbico si trovano nelle bucce di pomodoro. [18]

1.2.3 Il β -carotene

Il β -carotene ha una struttura simile a quella del licopene ma si differenzia per i due anelli chiusi terminali mentre la formula molecolare è la stessa, presentata in **Figura 1.3**. Le insaturazioni presenti sulla catena idrocarburica assorbono dalla luce bianca le radiazioni con lunghezza d'onda appartenenti al visibile, riflettendo le altre che appaiono a noi di colore rosso-arancione.

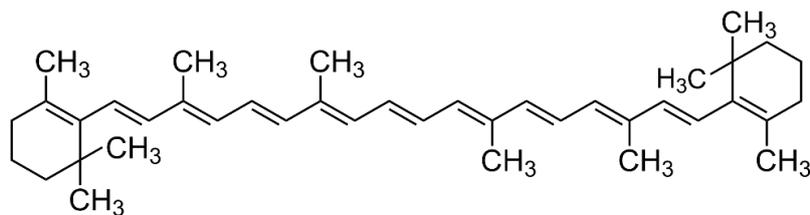


Figura 1.3 Struttura del β -carotene

È un pigmento rosso arancio che si trova in molti frutti e nelle verdure fresche. È poco solubile in acqua e moderatamente solubile nella maggior parte dei solventi organici, come etere di petrolio, metanolo ed etanolo. Come il licopene, maggiore è l'intensità del colore arancione maggiore è il contenuto di β -carotene.

Il β -carotene è anch'esso un potente antiossidante che viene sintetizzato dalle piante come metabolita secondario. È il carotenoide che riporta la più alta attività biologica, infatti, essendo una provitamina l'organismo umano è in grado di trasformarla in vitamina A o retinolo. La vitamina A è un nutriente molto importante per il differenziamento dei tessuti, la crescita, il sistema immunitario e la vista. [19]

In passato veniva estratto dai vegetali nonostante l'elevato costo dovuto alla stagionalità della materia prima e ai luoghi di produzione. A livello industriale, il β -carotene è sintetizzato con la reazione di Wittig. [20]

1.2.4 Possibili applicazioni

I composti naturali estratti dai cascami di pomodoro, ovvero i carotenoidi, hanno numerose applicazioni in campi anche molto differenti tra loro. Di seguito si analizzano in dettaglio le singole possibili applicazioni.

I carotenoidi, ma in particolare il licopene, è utilizzato come additivo naturale nella preparazione di alimenti e bevande grazie alle sue capacità coloranti. Un qualsiasi additivo deve essere innanzitutto valutato e autorizzato all'impiego dall'EFSA (European Food Safety Authority), l'organismo europeo che garantisce la sicurezza del consumatore. Tutti gli additivi autorizzati devono però rispondere a precisi requisiti di purezza, per quanto riguarda le sostanze coloranti per uso alimentare si fa riferimento alla Direttiva della Commissione 95/45/EC. Il licopene è stato autorizzato come colorante alimentare nel 1997. [21] La Direttiva definisce tutte le caratteristiche che deve soddisfare, riportate di seguito. È un liquido viscoso di colore rosso, identificato con la sigla "E 160 d", ottenuto mediante estrazione con solvente dai pomodori. Soltanto alcuni solventi sono concessi e la loro concentrazione residua non deve superare 50 mg/kg. [22]

Un altro campo di impiego sono gli integratori alimentari. È stato dimostrato che il licopene gode di importanti capacità scavenger, ovvero di cattura, nei confronti dei radicali liberi di 2 e 10 volte superiori rispetto a quelle possedute rispettivamente da β -carotene e vitamina E. Ciò ha fatto sì che si riponga sempre più interesse verso questa preziosa sostanza naturale. Dagli studi effettuati si mostra che il licopene ha particolari effetti nutraceutici verso le patologie che riportano stress ossidativo. In particolare, è utilizzato per il trattamento di patologie che coinvolgono la prostata, per la prevenzione di malattie cardiovascolari essendo in grado di inibire l'ossidazione del colesterolo LDL riducendone il valore, e malattie degenerative del sistema nervoso quali Alzheimer e Parkinson. Inoltre, recenti studi hanno dimostrato il rallentamento dell'osteoporosi grazie all'assunzione del licopene. Possiede anche la capacità di prevenire il cancro limitando lo sviluppo di cellule portatrici della malattia. Grazie a tutti gli effetti benefici che apporta all'organismo umano, la ricerca punta al suo impiego anche nell'industria farmaceutica. Il licopene naturale può essere assunto come integratore alimentare in forma monocomposta o in abbinamento con altri principi attivi. L'organismo umano è in grado di assorbirlo in autonomia con le reazioni metaboliche senza dover aggiustarne la composizione con additivi e/o conservanti. [23] È però importante non abusare di questo antiossidante naturale. L'EFSA ha fissato la dose giornaliera accettabile (ADI) pari a 0,5 mg/kg di peso corporeo. [24] Per quanto riguarda i carotenoidi e nello specifico del β -carotene, la loro assunzione come integratori alimentari è consigliata in caso di carenza di vitamina A.

Sempre grazie alle sue eccellenti proprietà antiossidanti, il licopene trova applicazione anche in ambito dermatologico e cosmetico. I radicali liberi, infatti, sono i responsabili dell'invecchiamento cutaneo e grazie all'applicazione di creme contenenti licopene si ottiene un effetto anti-età naturale che agisce su rughe, colorito spento ed ispessimento del derma. Le formulazioni che lo contengono permettono di proteggere la cute e favorire la produzione delle proteine più importanti della pelle ovvero collagene ed elastina. Inoltre, il licopene è in grado di aumentare la protezione dell'epidermide rendendola meno sensibile alle radiazioni UVA e

UVB, limitando il rischio di eritemi, scottature e la comparsa di macchie scure. Il suo utilizzo combinato ad altri principi attivi può agire anche contro cellulite e smagliature. [25] Attualmente molti marchi hanno in commercio linee cosmetiche o singoli prodotti a base di licopene ottenuto tramite estrazione dal pomodoro, tra cui Dolcepura, PuraVida Bio e Lelang.

Riassumendo, i carotenoidi trovano applicazioni come coloranti o integratori alimentari mentre il licopene, grazie alle sue proprietà antiossidanti, riscontra numerosi campi di impiego richiamando maggiore attenzione da parte della comunità scientifica.

1.3 Estrazione con solvente

È possibile ottenere i carotenoidi a partire da una matrice solida vegetale tramite estrazione con solvente. Si tratta di un'estrazione solido-liquido, detta anche lisciviazione, che permette di estrarre un soluto disperso nel solido inerte mediante un solvente liquido, anch'esso inerte. Alla fine del processo si ottiene un residuo solido che contiene l'inerte insolubile e l'estratto costituito dal soluto più il solvente. La stessa tecnica si può utilizzare anche per estrarre gli oli essenziali dalle piante aromatiche ed officinali. [26]

L'estrazione si basa su fenomeni diffusivi descritti matematicamente dalla legge di Fick. In particolare, le molecole di solvente entrano in contatto con le particelle di biomassa, per capillarità diffondono all'interno del solido per poi reagire con le molecole di interesse assorbendole. La resa del processo estrattivo dipende da numerosi fattori: temperatura, pressione, agitazione, tempo di contatto, solvente utilizzato e dimensione delle particelle solide.

1.3.1 I solventi organici

I solventi organici sono liquidi di natura non acquosa caratterizzati da una bassa temperatura di ebollizione e un basso peso molecolare. In quanto organici, sono costituiti da idrocarburi a cui sono legate delle sostanze come alcool, glicoli e chetoni. Hanno numerose applicazioni industriali ma principalmente sono utilizzati per estrarre composti solubili in essi.

È fondamentale conoscere le proprietà e le caratteristiche del solvente organico che si vuole utilizzare a causa della sua potenziale pericolosità per la salute dell'uomo e per l'ambiente. La maggior parte dei solventi organici, infatti, è volatile risultando potenzialmente inquinanti di notevole pericolosità. Le grandi aziende di solito cercano di recuperare il solvente dopo l'estrazione per limitare le emissioni nell'ambiente poiché aumentano il livello di ozono atmosferico oppure causano la contaminazione del suolo e dell'acqua. Questi solventi possono causare, inoltre, diversi effetti collaterali e indesiderati quando l'organismo umano entra in contatto con essi per inalazione, ingestione o contatto con la pelle. Infine, guardando alla sicurezza, sono quasi tutti infiammabili e possono stratificare a seconda della densità relativa dell'aria rendendoli molto pericolosi.

I solventi organici si distinguono in polari e apolari. Quelli polari presentano alti valori del momento di dipolo e un'elevata costante dielettrica facilitando lo scioglimento di sostanze a loro volta polari, un esempio è l'acqua nella quale si disciolgono facilmente le sostanze idrofile come gli zuccheri. Al contrario, i solventi apolari hanno bassa polarità e costante dielettrica e sono affini con molecole idrofobiche.

Al termine dell'estrazione, i residui contenenti i solventi organici devono essere considerati rifiuti speciali. Per il loro smaltimento è necessario tenere in considerazione tutti i potenziali rischi e trattarli di conseguenza, generalmente richiede costi molto alti. [27]

Inoltre, i metodi di estrazione tradizionali hanno bisogno di elevate quantità di solventi organici per raggiungere buone rese se la matrice utilizzata è di origine naturale.

1.3.2 IDES

L'estrazione di carotenoidi da cascami di pomodoro con tecniche sostenibili, ovvero solventi green, rientra nel concetto di sostenibilità del processo di estrazione.

Nel 2004, il professore A. P. Abbott per la prima volta introdusse il termine “*Deep Eutectic Solvent*”, detti DES, per descrivere miscele eutettiche costituite da sali di ammonio quaternari e composti donatori di legame ad idrogeno.

I DES sono preparati a partire da due o più composti che, a seconda della loro temperatura di fusione, sono solidi o liquidi a temperatura ambiente. Quando essi sono miscelati in specifici rapporti molari si ottiene una miscela liquida e omogenea. I DES contengono ioni non simmetrici che hanno una bassa energia reticolare e, attraverso il legame idrogeno, si verifica una delocalizzazione di carica che causa l'abbassamento della temperatura di fusione della miscela rispetto ai singoli componenti, come mostrato in **Figura 1.4**.

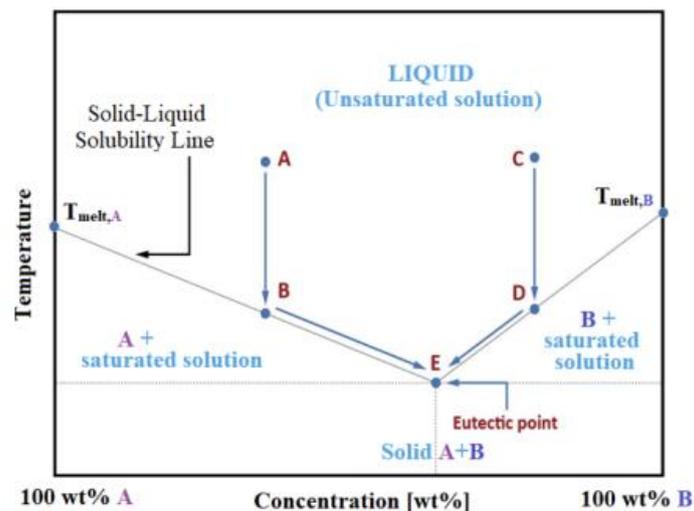


Figura 1.4 Diagramma di fase di una miscela eutettica tratta da Hansen *et al.* (2021) [28]

In **Figura 1.4** sono riportati $T_{melt,A}$ e $T_{melt,B}$, rispettivamente i punti di fusione dei composti A puro e B puro. Il punto eutettico corrispondente al punto E è un invariante isobarico, rappresenta la composizione della miscela per la quale si raggiunge una temperatura minima di fusione, in tali condizioni si ha la coesistenza di tutte e tre le fasi del sistema liquido-solido in equilibrio. La regione superiore del grafico rappresenta le miscele liquide stabili, variando la composizione della soluzione e la temperatura non si altera l'equilibrio. Al di sotto della temperatura eutettica, invece, si hanno miscele solide stabili caratterizzate da varie microstrutture composte da regioni discrete di A e B. Partendo da una miscela liquida rappresentata dal punto C si diminuisce lentamente la temperatura, oltrepassata la linea di

solubilità del componente B, ovvero a partire dal punto D si ha la solidificazione del composto B fino al raggiungimento della regione caratterizzata da una miscela bifasica: la fase solida costituita da B e la fase liquida la cui composizione è definita dalla temperatura. Diminuendo la temperatura dal punto C, si può usare la regola della leva per ricavare la composizione del liquido rimanente. È interessante osservare che, quando si raffredda vicino al punto eutettico, il liquido residuo tende alla composizione eutettica, quindi, le ultime gocce di liquido nella miscela quasi completamente solida hanno sempre composizione eutettica qualsiasi sia la composizione originale della miscela. Lo stesso ragionamento è fatto a partire dal punto A, in questo caso però si ottiene una miscela bifasica contenente il solido A. [28]

Con il termine DES si fa riferimento alle miscele liquide che hanno composizione molto vicina a quella eutettica, infatti, il rapporto molare dei costituenti influisce sulla temperatura di fusione del DES.

I DES sono considerati liquidi ionici (IL) di nuova generazione, in quanto hanno caratteristiche fisiche simili a quelli tradizionali tra cui bassa volatilità, conduttività ed elevato potere solvente. In generale, le proprietà fisiche dei DES dipendono dai composti utilizzati per ottenere la miscela eutettica. Le proprietà chimiche dei DES e dei IL, invece, sono significativamente differenti e lo dimostrano anche le diverse aree di applicazione. I DES sono sistemi ottenuti da una miscela eutettica di acidi e basi di Lewis o Brønsted che contengono diverse specie di anioni e/o cationi. Invece, i IL sono formati da sistemi composti principalmente da un tipo discreto di anione e catione. A differenza dei liquidi ionici, i DES hanno numerosi vantaggi:

- Facile preparazione;
- Stabilità in presenza di acqua;
- Basso costo;
- Non derivati dal petrolio;
- Elevata biodegradabilità;
- Bassa tossicità. [29]

Grazie a questi benefici, i DES hanno subito una veloce diffusione nei settori chimici sostituendo molto spesso i solventi organici. In particolar modo, nel settore dell'estrazione di molecole da fonti naturali. [30]

La preparazione di un DES richiede la selezione di un accettore di legami ad idrogeno e un donatore di essi, si scelgono due composti facilmente reperibili, economici e stabili a temperature inferiori ai 100°C che vengono poi miscelati insieme. Si ottiene un solvente utilizzabile che non genera scarto. Variando i rapporti molari dei componenti è possibile modificare le caratteristiche dei DES come polarità, densità, viscosità e capacità solvente. Inoltre, è possibile aggiungere dell'acqua ottenendo così una miscela ternaria definita "*aqueous DES*" (aDES) per ridurre notevolmente la viscosità. Un enorme vantaggio dei DES è che si possono creare in base alle esigenze e alla flessibilità di cui si necessita.

Nell'industria chimica a causa dell'elevato consumo di solventi organici, si creano enormi volumi di rifiuti con un grande impatto ambientale e costi di smaltimento eccessivi. Ciò è in contrasto con il concetto di solvente "ideale" che dovrebbe essere economico, stabile, biodegradabile, sicuro dal punto di vista della salute umana e dell'ambiente, facilmente maneggiabile e separabile dai prodotti di estrazione. I DES rappresentano i solventi quanto più

vicini al concetto di ideali, per questo motivo negli ultimi anni si è assistito ad un aumento esponenziale dei lavori scientifici incentrati su di essi, come si osserva in **Figura 1.5**.

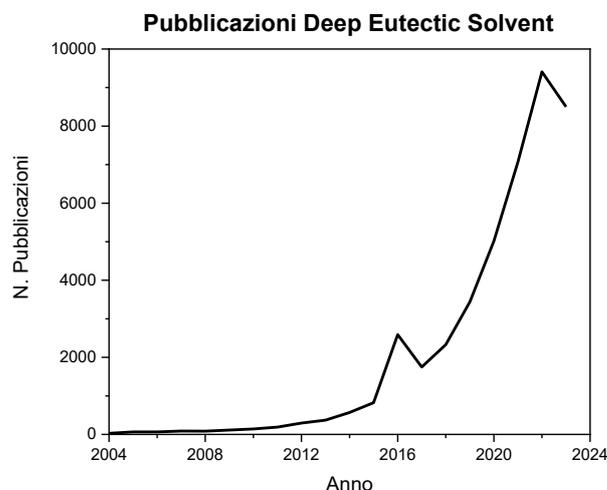


Figura 1.5 Pubblicazioni sui DES dalla prima citazione nel 2004 (ultima rilevazione 2023 del 17/9/23), fonte Google Scholar

Inizialmente i DES vennero introdotti in campo elettrochimico come solventi alternativi ai liquidi ionici dove mostrarono grandi risultati nell'elettrocatalisi, nell'elettrodeposizione e nell'elettropulitura dei metalli. Presto sono stati impiegati nel campo della catalisi in quanto capaci di modificare il loro pH a seconda dei costituenti e influenzare la velocità e la selettività di una reazione. Inoltre, è stata dimostrata la loro capacità di disciogliere una grande varietà di molecole, per esempio sono in grado di separare e purificare la CO₂ o macromolecole organiche come le proteine.

Per quanto riguarda le matrici vegetali, i DES sono in grado di disgregarne parzialmente le pareti cellulari aumentando la permeabilità del solvente. Grazie a questa capacità all'inizio venivano utilizzati per il pretrattamento delle biomasse. Attualmente sono considerati ottime alternative ai tradizionali solventi organici per l'estrazione di molecole dalle biomasse.

Facendo riferimento alle estrazioni da fonti naturali, l'uso dei DES elimina il rischio di trovare residui pericolosi nell'estratto favorendone l'impiego per uso cosmetico e nutraceutico. L'estrazione con DES garantisce:

- Estratti biocompatibili pronti all'uso;
- Estrazione più efficace e selettiva rispetto ai solventi organici;
- Maggiore sicurezza durante il processo estrattivo grazie all'utilizzo di solventi non volatili, non infiammabili e non tossici.

A seconda della fonte naturale utilizzata, dall'estrazione si ottengono varie molecole di origine naturale, come i composti fenolici, i flavonoidi, le proteine e i polisaccaridi. In particolare, da matrici vegetali si estraggono principalmente composti fenolici.

La resa e la selettività ottenute, scegliendo come solventi i DES, dipendono da numerosi fattori. Infatti, l'estrazione è influenzata da: affinità tra il DES e il composto di interesse, rapporto molare tra i costituenti del DES, rapporto matrice/solvente, eventuale contenuto di acqua presente nel DES e condizioni di lavoro (temperatura, pressione e tempo).

Come detto in precedenza, i DES sono considerati solventi green in quanto non volatili e costituiti da sostanze abbondanti in natura e non tossiche. Nonostante ciò, anche i DES riportano delle problematiche che potrebbero limitarne l'utilizzo su larga scala, tra queste:

- Minore inerzia chimica rispetto ai solventi organici che porta alla formazione di sottoprodotti poiché i costituenti del DES possono partecipare alla reazione chimica;
- Maggiore difficoltà nella purificazione dei prodotti di interesse, i DES non essendo volatili non possono essere recuperati per semplice distillazione ma richiedono una separazione complessa e costosa (precipitazione, estrazione liquido-liquido con solventi organici, colonna cromatografica) che abbassa notevolmente la resa;
- Scarsa conoscenza delle proprietà eco-tossicologiche dei DES. [31]

1.3.3 I NaDES

I “*Natural Deep Eutectic Solvent*” (NaDES) sono DES di origine naturale, da cui il nome, che garantiscono la completa sostenibilità del solvente. Sono preparati a partire da composti presenti in natura, in genere si tratta di metaboliti primari di origine vegetale come acidi organici, zuccheri, alcoli, ammine e amminoacidi. Mostrano le stesse caratteristiche dei DES a cui si aggiungono ulteriori vantaggi: nessuna tossicità ed elevata biodegradabilità. I NaDES, quindi, rispettano tutti i requisiti di un solvente green e ideale.

In particolare, se si sintetizza un NaDES usando composti apolari si ottiene un solvente idrofobico, chiamato “*Hydrophobic Natural Deep Eutectic Solvent*”(HNaDES). Per la sua sintesi si usano i terpeni (mentolo, timolo e cloruro di colina) e come donatori del legame ad idrogeno acidi grassi, amminoacidi e zuccheri. In generale i HNaDES sono meno viscosi di quelli idrofili risultando più efficaci nel trasporto di massa, infatti, recentemente hanno dimostrato di essere estrattori altamente efficienti per l'estrazione di molecole bioattive idrofobiche. [32]

I NaDES presentano forti legami ad idrogeno tra i suoi componenti e i composti estratti aumentando di conseguenza la resa del processo e stabilizzando l'estratto ottenuto. Queste peculiarità, unite alla loro elevata sostenibilità, li rende grandi fonti di interesse scientifico in particolar modo negli ultimi anni in cui si è posta sempre più attenzione alla biodisponibilità e alla sostenibilità, come si osserva in **Figura 1.6**. [33]

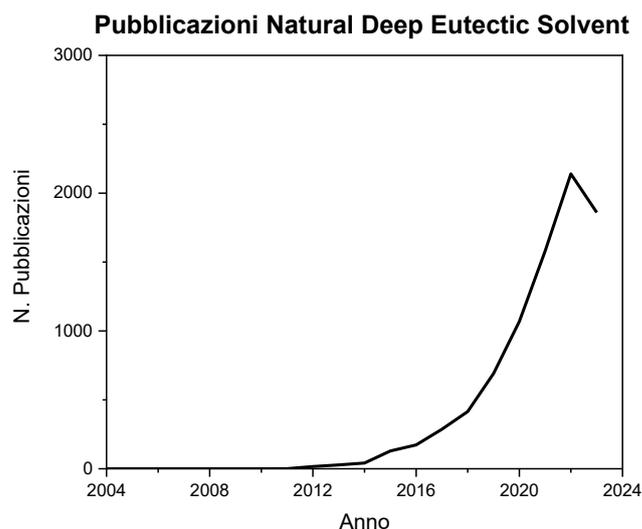


Figura 1.6 Pubblicazioni sui NaDES dal 2004 (ultima rilevazione 2023 del 17/9/23), fonte Google Scholar

Le estrazioni che utilizzano i NaDES come solventi garantiscono estratti vegetali con le seguenti caratteristiche:

- Alto carico di principi attivi;
- Shelf life prolungata;
- Miglior attività biologica e azione terapeutica;
- Maggiore permeabilità e biodisponibilità;
- Alta efficienza di estrazione di molecole naturali; [34]
- Proprietà sensoriali accettabili;
- Basso costo. [35] [29]

Alcuni studi hanno mostrato la necessità di lavorare con un elevato quantitativo di solvente di estrazione, in ottica di scale-up potrebbe essere un problema la richiesta di tanto volume di NaDES per trattare grandi quantità di biomassa industriale, soprattutto se non è previsto il riciclo del solvente. Allo stesso tempo però si riportano rese di estrazione simili a quelle ottenute con i solventi organici. [9]

1.4 Stato dell'arte

Le estrazioni utilizzano una biomassa da cui ricavare composti di interesse, è bene però evidenziare il fatto che ciascuna biomassa ha le proprie caratteristiche che dipendono da numerosi fattori secondari che hanno influito sulle proprietà finali del pomodoro. La biomassa riveste un ruolo fondamentale nella resa di estrazione rendendo le rese e i contenuti di biomolecole talvolta molto diversi tra loro.

1.4.1 Estrazione con solventi organici

Le tecniche estrattive tradizionali utilizzano solventi organici per estrarre molecole di interesse da matrici vegetali. Il residuo finale però richiede costi di smaltimento elevati in quanto necessita di un trattamento speciale. In letteratura si trovano numerosi metodi per estrarre

carotenoidi dai cascami di pomodoro utilizzando solventi organici, in Tabella 1.1 si riporta il solvente, le condizioni operative e i risultati ottenuti.

Tabella 1.1 Stato dell'arte riguardo l'estrazione con solventi organici

Solvente di estrazione	Condizioni operative	Rese	Riferimento	
Etil acetato	0,2 mg di biomassa in 30 ml di solvente	21,15 mg/100g	Lavecchia & Zuorro (2008) [36]	
Esano		13,5 mg/100g		
Esano/Acetone/Etanololo 50:25:25		Estrazione di licopene a 40 °C per 3 ore in agitazione		130,5 mg/100g
Acetone	1 g di biomassa in 30 ml di solvente	222,09 mg/100g	Zuorro (2020) [37]	
Esano/Etanololo/Acetone 31:33:37	Estrazione di licopene a 40 °C per 30 min in agitazione a 350 rpm	268,08 mg/100g		
Esano/Acetone 50:50	1 mg di biomassa in 100 ml di solvente	Lycopene 34,11 µg/g	Lazzarini <i>et al.</i> (2022) [16]	
	Estrazione a 63 °C per 20 min	β-carotene 2117,64 µg/g		
Acetone	Estrazione di carotenoidi	43,5 µg/g	Baaka <i>et al.</i> (2016) [38]	
Esano		32,1 µg/g		
Etanololo		26,32 µg/g		
Etil acetato		35,84 µg/g		
Acetone	0,075 g di biomassa in 3 ml di solvente	8,75 mg/100g	Kyriakoudi <i>et al.</i> (2022) [32]	
	Estrazione di carotenoidi a 25 °C per 60 min in agitazione a 750 rpm			
Etanololo	Estrazione di β-carotene a 60°C per 30 min	849,6 µg/g	Jamaleddine <i>et al.</i> (2023) [39]	
Etanololo/Etil acetato		1521 µg/g		
Etil acetato		1293,7 µg/g		
Acetone	10 g di biomassa in 100 ml di solvente	33,4 mg/kg	Strati & Oreopoulou (2011) [40]	
Esano		25,2 mg/kg		
Etanololo		6,1 mg/kg		
Etil acetato		31,5 mg/kg		
Esano/Etanololo 50:50		Estrazione di carotenoidi a 25 °C per 30 min in agitazione		28,1 mg/kg
Esano/Acetone 50:50				30,5 mg/kg
Esano/Etil acetato 50:50				36,5 mg/kg

Se l'obiettivo fosse estrarre soltanto il licopene si otterrebbero rese molto basse a causa della bassa specificità tra il solvente organico e il licopene. Infatti, dalla matrice si estrarrebbero anche altri carotenoidi e xantofille richiedendo un lungo e costoso processo di purificazione a valle che non garantisce un elevato grado di purezza. Per questo abitualmente si utilizzano miscele di solventi organici previo studio di ottimizzazione della composizione. [37]

1.4.2 Estrazione con DES

Per l'estrazione dei carotenoidi si opta principalmente per i NaDES e in particolare, essendo sostanze idrofobiche, si utilizzano i HNaDES. A seconda del NaDES utilizzato la resa è significativamente differente in quanto cambia l'affinità con i carotenoidi, al contrario i solventi organici riportano rese simili tra loro fatta eccezione per le miscele. Per questo motivo si fa molto spesso uno screening dei NaDES per valutare le loro capacità estrattive. In letteratura non sono presenti molti articoli che trattano l'estrazione di carotenoidi dai cascami di pomodoro utilizzando i NaDES come è mostrato in **Tabella 1.2**.

Tabella 1.2 Stato dell'arte riguardo l'estrazione con DES

Solvente di estrazione	Condizioni operative	Rese	Riferimento
Mentolo/Acido caprilico 1:1		2,55 mg/100g	
Mentolo/Acido laurico 1:1	0,075 g di biomassa in 3 ml di solvente	4,97 mg/100g	
Timolo/Acido caprilico 1:1	Estrazione di carotenoidi a 25 °C per 60 min in agitazione a 750 rpm	3,54 mg/100g	Kyriakoudi <i>et al.</i> (2022) [32]
Timolo/Acido laurico 1:1		4,69 mg/100g	
Acido caprilico/Acido laurico 1:2		7,74 mg/100g	
Mentolo/Acido lattico 8:1	1 g di biomassa in 120 ml di solvente Estrazione di licopene a 70 °C per 10 min	1446,6 µg/g	Silva <i>et al.</i> (2019) [15]
Mentolo/Acido lattico 8:1	Estrazione di β-carotene a 60°C per 30 min	96,4 µg/g	Jamaleddine <i>et al.</i> (2023) [39]

1.4.3 Estrazione assistita

I cascami di pomodoro sono una fonte ricca di carotenoidi ma, a causa della loro localizzazione nelle membrane dei cloroplasti e la compattezza del tessuto della buccia di pomodoro, risultano difficilmente raggiungibili dal solvente di estrazione. In teoria, l'efficienza di estrazione

potrebbe essere migliorata utilizzando condizioni di estrazione più severe, ma il rischio che i carotenoidi subiscano una degradazione ossidativa aumenterebbe proporzionalmente. Quindi, per ottenere rese maggiori si fanno dei pretrattamenti sulla matrice con tecniche che vanno ad incrementare il trasferimento di massa o energia. L'estrazione assistita, ovvero l'estrazione tradizionale accoppiata con metodi di pretrattamento o in combinazione con altre tecniche, richiede costi elevati e influenza le proprietà del composto estratto. In generale, la scelta di condurre un'estrazione assistita garantisce la riduzione di temperature e tempi. [37]

La matrice può subire un pretrattamento con enzimi, oppure si utilizzano gli ultrasuoni o le microonde in abbinamento all'estrazione. Un'altra possibilità è quella di utilizzare fluidi supercritici come solventi di estrazione. Tutte le tecniche hanno in comune l'obiettivo di degradare parzialmente la matrice favorendo così il rilascio dei carotenoidi nel solvente.

Per l'estrazione assistita da enzimi (EAE) innesca l'idrolisi della rete polisaccaridica della parete cellulare del pomodoro in cui si accumulano le molecole bioattive con conseguente facilità di penetrazione del solvente e miglioramento nel rilascio dei carotenoidi. Non è una vera e propria tecnica di estrazione quanto più un pretrattamento enzimatico della matrice. Generalmente si utilizzano gli enzimi cellulasi e pectinasi, a seconda della matrice utilizzata riportano rese molto diverse, infatti, la cellulasi è più efficace sulle bucce e sui frutti interi di pomodoro mentre la pectinasi sui rifiuti industriali. Il pretrattamento non è però in grado di aumentare notevolmente la resa di estrazione se utilizzato in combinazione con solventi organici. [36]

L'estrazione assistita da microonde (MAE) si basa sul fenomeno dell'irraggiamento. Le microonde aumentano rapidamente la temperatura che porta ad un abbassamento della viscosità del DES utilizzato favorendo l'estrazione. La MAE richiede una temperatura di estrazione inferiore ma soprattutto riduce i tempi richiesti evitando la formazione di sottoprodotti e la degradazione dei carotenoidi. L'efficienza dipende dall'individuazione dei parametri ottimali. Tendenzialmente basse potenze delle microonde diminuiscono l'interazione delle molecole di interesse con la matrice ma al contempo migliorano l'estraibilità dei composti target limitandone la degradazione. [41]

Per l'estrazione assistita da ultrasuoni (UAE) si usa un sonicatore ad alta potenza. Si sfrutta il fenomeno della cavitazione acustica, a causa del collasso delle bolle di gas nel solvente si generano dei microambienti ad alta energia che distruggono le pareti della matrice o forniscono l'energia necessaria all'attivazione della reazione chimica. [31] È una tecnica semplice e poco costosa, considerata un metodo sostenibile in quanto necessita di minor solvente e ridotti tempi di estrazione. L'efficacia degli UAE dipende da diversi fattori, tra cui la viscosità del solvente, le caratteristiche della matrice vegetale (umidità, dimensioni delle particelle) e le condizioni di lavoro delle apparecchiature ad ultrasuoni (potenza, frequenza). [15] Se si sceglie come solvente un NaDES per l'estrazione UAE, l'uso degli ultrasuoni è in grado di prevenire i danni termici subiti dai composti estratti. [42]

L'estrazione con fluidi supercritici (SFE) è una tra le tecnologie ecologicamente più sicure in quanto utilizza come solvente di estrazione un fluido a pressione e temperatura vicina o superiore al suo valore critico migliorando il potere di estrazione del solvente. Si possono scegliere diversi composti anche se abitualmente si opta per l'anidride carbonica (CO₂) in quanto non è tossica ed infiammabile, è economica e disponibilità elevata. Nelle sue condizioni critiche (temperatura di -31 °C e pressione di 73 bar) la CO₂ ha proprietà chimico-fisiche che

favoriscono la solubilizzazione dei composti chimici e quindi l'estrazione, come bassa viscosità ed elevata capillarità. Lavorando in condizioni prossime a quelle ambientali, permette di estrarre composti termolabili senza degradarli. Inoltre, il solvente è riciclato quasi completamente terminata l'estrazione poiché abbassando temperatura e pressione la CO₂ ritorna allo stato gassoso rilasciando i soluti solubilizzati che saranno facilmente recuperati. L'unica pecca del suo utilizzo è il costo energetico richiesto per mantenere il fluido in stato supercritico, non economicamente sostenibile per applicazioni su larga scala. [16]

In letteratura numerosi articoli trattano l'estrazione assistita di carotenoidi da cascami di pomodoro, confrontando l'efficienza delle diverse tecniche e talvolta paragonandole all'estrazione classica. Abitualmente, le estrazioni di biomolecole sono sempre accoppiate ad altri metodi per assicurarsi rese elevate che giustifichino l'applicazione di economia circolare.

1.5 Scopo della tesi

Negli ultimi anni la sostenibilità ha assunto una grandissima importanza in ogni aspetto della società. Nel 2015 le Nazioni Unite hanno sottoscritto l'Agenda 2030 per lo sviluppo sostenibile, i 193 Paesi membri dell'ONU (Organizzazione delle Nazioni Unite) si sono impegnati a raggiungere 17 obiettivi stabili entro il 2030. Di nostro interesse è l'obiettivo n.12 che recita "Garantire modelli sostenibili di produzione e di consumo". Uno tra i principi fondamentali sui quali si basa una società sostenibile è ridurre gli sprechi, in particolar modo quello delle materie prime. [43] Per raggiungere tale scopo è importante considerare i sottoprodotti e gli scarti di una lavorazione industriale come fonte, ovvero progettare un processo nuovo oppure adattare uno già esistente che consideri gli sprechi dell'industria come materia prima, rappresentando ciò che si intende con economia circolare. Ciò è facilmente applicabile all'industria agroalimentare in cui le materie prime trattate sono vegetali ricchi di biomolecole di grande interesse scientifico. La maggior parte delle trasformazioni genera un'elevata quantità di scarti e talvolta anche di sottoprodotti che in passato si è sempre stati soliti considerare rifiuti. Soltanto negli ultimi decenni si è posta maggior attenzione all'ambiente e al sempre più evidente riscaldamento globale osservandone i danni causati, così si è iniziato a comprendere l'importanza ma soprattutto la necessità di avere comportamenti sostenibili che salvaguardino le persone e l'ambiente che abitano il globo terrestre. In questo contesto entra anche il concetto di esaurimento delle materie prime, infatti, è sempre più difficile sostenere una popolazione mondiale pari a 8 miliardi secondo l'ultimo Rapporto UNFPA 2023 tanto che le risorse stanno via via esaurendo. Risulta quindi importante evitare gli sprechi e trovare nuove materie prime per ottenere prodotti di cui necessitiamo per evitare di doverli sintetizzare chimicamente. [44]

Da quanto visto nei paragrafi precedenti l'applicazione degli scarti dell'industria alimentare, nel caso di questo studio del pomodoro, risponde alla necessità di trovare substrati alternativi con potenziale valore commerciale. Dai cascami di pomodoro, ovvero bucce, semi e frutti scartati, è possibile recuperare sostanze di grande interesse quali i carotenoidi. In questa applicazione, l'utilizzo di solventi sostenibili per l'estrazione di molecole bioattive risponde all'ambizione di ridurre l'impatto ambientale e contribuire al risolvere i problemi di inquinamento dell'atmosfera. Per comprendere maggiormente l'importanza dell'estrazione dei carotenoidi si riportano alcuni esempi di effetti benefici che potrebbero scaturire dall'impiego di essi e in particolare del licopene. I carotenoidi sono ricchi di pigmenti colorati e trovano largo utilizzo nell'industria alimentare come additivi. Tra i carotenoidi estratti spicca nello specifico il licopene, il quale esibisce un'elevata attività antiossidante, adatta alla prevenzione di molte

malattie croniche come cancro, malattie cardiovascolari e neurodegenerative. Al contempo il licopene presenta proprietà antietà e fotoprotettive in grado di proteggere la cute. Tutto ciò rende gli estratti di pomodoro ingredienti interessanti nelle formulazioni di prodotti farmaceutici, cosmetici e nutraceutici.

Questo lavoro sperimentale si è focalizzato sull'ottenimento di un estratto a partire dai cascami di pomodoro che trova impiego come potenziale componente per altri settori industriali. A questo proposito, si è dapprima posta l'attenzione sulla caratterizzazione chimica della matrice utilizzata e successivamente si è analizzata nello specifico l'estrazione con diversi solventi. L'obiettivo della tesi è quello di condurre un'estrazione che abbia un minor impatto ambientale e allo stesso tempo sia più economica in termini di semplicità impiantistica e di consumi energetici. Lo studio, quindi, si è basato sulla ricerca di un solvente di estrazione sostenibile per ottenere un estratto con la più alta concentrazione possibile di carotenoidi, responsabili del potere antiossidante e colorante del pomodoro. Inoltre, per ottimizzare la resa di estrazione in termini di contenuto di carotenoidi sono stati condotti diversi esperimenti che differivano per le condizioni operative. Da letteratura si è osservato che i principali parametri che possono influenzare la resa estrattiva sono il tipo di solvente e la sua concentrazione in volume, la temperatura, il tempo e il rapporto biomassa/solvente. Al fine di rispettare le esigenze legate alla sostenibilità si è scelto di sintetizzare alcuni *Natural Deep Eutectic Solvent*, solventi completamente green rispetto ai solventi organici tipicamente usati come acetone, metanolo ed etere di petrolio. I NaDES, costituiti da mentolo e diversi acidi grassi, hanno il vantaggio di avere origine naturale pertanto è possibile evitare la purificazione dell'estratto a valle del processo di estrazione che risulta invece necessaria negli altri casi poiché il solvente utilizzato è tossico e richiede speciali trattamenti di smaltimento. In particolare, sono state valutate le proprietà intrinseche dei solventi sintetizzati per approfondire la loro conoscenza, quali densità, viscosità e spettri IR. In seguito, sono state condotte numerose estrazioni utilizzando NaDES differenti nella composizione e nel rapporto molare al fine di individuare quello con maggior capacità estrattiva, i risultati ottenuti sono stati analizzati con il Test ANOVA e TUKEY al fine di validarli. Identificato il miglior NaDES si è proseguito con l'ottimizzazione dell'estrazione per determinare le migliori condizioni operative. Il Design of Experiment (DOE) ha consentito di massimizzare l'efficienza degli esperimenti e di minimizzare gli sprechi, i costi e il tempo ottenendo quante più informazioni possibili con un numero minimo di esperimenti. A questo scopo è stato selezionato il modello di regressione lineare (MLR) che ha consentito l'ottimizzazione della resa di carotenoidi variando dapprima 3 parametri contemporaneamente (temperatura, tempo e rapporto biomassa/solvente) e successivamente soltanto 2 parametri simultaneamente (temperatura e tempo). Gli esperimenti sono stati eseguiti in ordine sparso e casuale al fine di massimizzare la variabilità dei dati, garantirne la ripetibilità ed evitare un errore sistematico. Il software *CAT (Chemometric Agile Tool)* del gruppo di chemiometria della Società Chimica Italiana [45], tramite la metodologia della superficie di risposta (RSM), ha consentito la ricerca e la stima del punto ottimale che esprime le migliori condizioni di estrazione. L'attenzione si è poi spostata sul paragone tra l'estrazione tradizionale con solventi organici e quella sostenibile con NaDES per comprendere se la sostenibilità pecca nella resa del processo. Dopo avere individuato le condizioni operative che consentono di ottenere il massimo quantitativo di carotenoidi si è proseguito con la valutazione della cinetica di estrazione. Infine, il lavoro si è concluso quantificando i principali carotenoidi contenuti nell'estratto tramite analisi HPLC. Dal punto di vista teorico si analizzano i metodi proposti in letteratura per determinare il potere antiossidante dell'estratto e per separare i carotenoidi dal

NaDES. Questo lavoro mira a contribuire, in maniera sostenibile, alla valorizzazione dei cascami di pomodoro attraverso il suo riciclaggio, sfruttando le sue potenziali proprietà antiossidanti e coloranti rispondendo alle esigenze descritte all'inizio di questo paragrafo e rispecchiando la visione di industria sostenibile ed economia circolare a cui si cerca di ambire.

Nei prossimi capitoli verranno descritti e analizzati i metodi e i risultati ottenuti durante l'attività sperimentale condotta su campioni di cascami di pomodoro presso i laboratori DISAT del Politecnico di Torino. Lo studio si è articolato in diverse fasi:

- Caratterizzazione della matrice riponendo particolare attenzione al contenuto di umidità, proteine, grassi, ceneri, carboidrati, polifenoli e carotenoidi;
- Sintesi dei *Natural Deep Eutectic Solvent* e valutazione delle loro caratteristiche chimico-fisiche quali densità, viscosità e spettro IR;
- Esperimenti di estrazione con i NaDES sintetizzati nelle medesime condizioni operative al fine di fare uno screening e individuare il solvente migliore, i risultati ottenuti sono validati dal Test ANOVA e dopo dal Test TUKEY per garantire la loro ripetibilità;
- Esperimenti di estrazione con il NaDES migliore a differenti valori di temperatura, tempo e rapporto biomassa/solvente. Le condizioni operative e il numero di esperimenti sono stati forniti dal DOE. Dai risultati ottenuti si è individuata la variabile meno rilevante;
- Esperimenti di estrazione con il NaDES migliore variando temperatura e tempo. Le condizioni operative e il numero di esperimenti sono stati forniti dal DOE. Dai risultati ottenuti si è ricavata la condizione ottimale di estrazione che massimizza la resa;
- Esperimenti di estrazione con acetone ed etere di petrolio nella condizione ottimale individuata in precedenza per confrontare l'efficacia di estrazione dei solventi organici con il NaDES;
- Studio della cinetica estrattiva di estrazione;
- Valutazione del contenuto di licopene e β -carotene presenti nell'estratto attraverso l'analisi HPLC.

2 Materiali e metodi

Nel mese di marzo 2023 sono stati acquistati al supermercato dei pomodori a grappolo provenienti dall'Italia per fare la passata di pomodoro. Uno dei passaggi richiesti prevede l'utilizzo del passaverdure che ci permette di separare la polpa. Si raccolgono gli scarti, costituiti di semi e bucce di pomodoro, e poi si congelano per conservare nel tempo le caratteristiche chimiche.

2.1 Composti chimici utilizzati

In questo lavoro di tesi sono stati utilizzati i seguenti composti: Sulfanilamide, Solfato di sodio anidro, Etere di petrolio, Metanolo, Acido gallico, Reattivo di Folin-Ciocalteu, Carbonato di sodio, Acetone, Mentolo, Acido Butirrico, Acido Esanoico, Acido Caprilico, Acido Laurico, Acido Palmitico, β -carotene e Licopene. Sono tutti della Sigma-Aldrich con grado di purezza $\geq 98\%$.

Per le pesate si usa una bilancia analitica digitale chiusa XS BALANCE modello BL 224 avente capacità di 220 mg e risoluzione $\pm 0,0001$.

2.2 Caratterizzazione matrice

La caratterizzazione della matrice prevede la quantificazione del contenuto di umidità, proteine, carboidrati, lipidi e ceneri. Di seguito saranno descritte le tecniche analitiche applicate per la determinazione delle sostanze sopra citate.

Per l'analisi dell'umidità si usa la biomassa fresca, al contrario tutte le altre analisi e le successive estrazioni richiedono una matrice secca ottenuta essiccando lo scarto fresco in una stufa ad aria a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 12 ore.

2.2.1 Umidità

Per valutare il contenuto di umidità si segue il procedimento proposto dalla raccolta "Metodi di analisi utilizzati per il controllo chimico degli alimenti" (Rapporti ISTISAN 96/34) dell'Istituto Superiore di Sanità. [46]

Si pesano 5 mg di biomassa fresca e si essicano in una stufa ad aria, termostata a $103\text{ }^{\circ}\text{C}$ per una notte. L'analisi è di tipo gravimetrico, ovvero si valuta il peso della biomassa fresca e poi quello dopo l'essiccazione, mostrate in **Figura 2.1**, per ottenere il tenore di acqua contenuto nei campioni. La percentuale di umidità è calcolata secondo la (2.1):

$$\text{Umidità \%} = \frac{E-m}{E} \cdot 100 \quad (2.1)$$

dove: E = massa iniziale in grammi del campione
 m = massa in grammi del campione secco



Figura 2.1 A sinistra campione di pomodoro fresco, a destra campione dopo l'essiccazione

2.2.2 Proteine

Per la determinazione delle proteine si segue il metodo *Dumas*, riconosciuto ufficialmente dalle organizzazioni internazionali AOAC, AACC, ISO, DIN, ASBC, AOCS, OIV. Per ipotesi assume che tutto l'azoto presente nella matrice sia azoto proteico. [47]

Per la quantificazione si utilizza un analizzatore elementare ELEMENTAR modello vario MACRO Cube, esso permette di valutare il contenuto di C, H, S e N nel campione.

Si pesano 20 mg di campione e lo si pone nell'analizzatore dove è riscaldato ad alta temperatura in un forno per far avvenire rapidamente la combustione a 1050 °C in presenza di ossigeno puro. Per favorire la combustione completa, si aggiunge al campione l'ossido di tungsteno in rapporto 1:1. Dalla reazione si producono principalmente acqua, anidride carbonica ed ossidi di azoto. La miscela di gas ottenuta attraversa una camera di riduzione contenente rame riscaldato a circa 650 °C all'interno della quale l'ossigeno è rimosso mentre gli ossidi di azoto si convertono in azoto elementare. L'acqua e l'anidride carbonica sono rimosse da trappole dedicate. Infine, un rilevatore di conducibilità termica misura il segnale gassoso che viene poi convertito in contenuto di azoto totale. Lo schema del processo è schematizzato in **Figura 2.2**.

Per l'analisi dei dati ottenuti è necessaria una curva di calibrazione, si inviano all'analizzatore i bianchi contenenti 35 mg di Sulfanilamide.

Il contenuto di proteine è espresso dalla formula (2.2). Il fattore correttivo di Jones permette di convertire la percentuale di azoto ottenuta dal metodo Dumas in percentuale di proteine, esso dipende dalla matrice utilizzata. Per i vegetali il fattore moltiplicativo è pari a 4,4. [48]

$$\text{Proteine \%} = N\% \cdot 4,4 \quad (2.2)$$

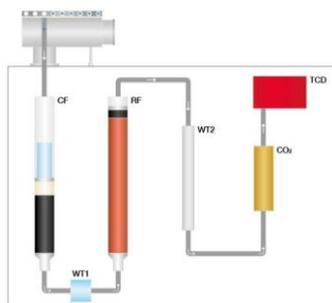


Figura 2.2 Schema delle fasi del metodo Dumas, tratto da VELP Scientifica [47]

2.2.3 Lipidi

Per valutare il contenuto di lipidi è stato seguito il procedimento indicato dalla raccolta “Metodi di analisi utilizzati per il controllo chimico degli alimenti” (Rapporti ISTISAN 96/34) dell’Istituto Superiore di Sanità, in particolare si è scelto il metodo *Soxhlet*. [46]

Il Soxhlet (vedi **Figura 2.3**) è un estrattore che estrae le sostanze grasse e apolari dalla matrice solida basandosi su un’estrazione solido-liquido. Si inserisce nel Soxhlet un ditale di estrazione in carta tappato da cotone, all’interno si trovano 2 g di campione e un’uguale quantità di solfato di sodio anidro Na_2SO_4 capace di assorbire l’eventuale umidità residua nella matrice. Sotto l’estrattore si posiziona un pallone contenente 200 ml di solvente organico, a sua volta immerso in un bagnetto termico mantenuto a 70 °C dalla piastra riscaldante ARGOLAB modello M3-D. Quando il solvente raggiunge la sua temperatura di ebollizione genera vapore che va nella parte superiore dell’estrattore, la quale, essendo raffreddata con acqua, favorisce la condensazione del solvente che cade nella parte centrale dove si trova il filtro. Il solvente entra così in contatto con la matrice estraendone le molecole di interesse. L’estrazione ha una durata di 6 ore.

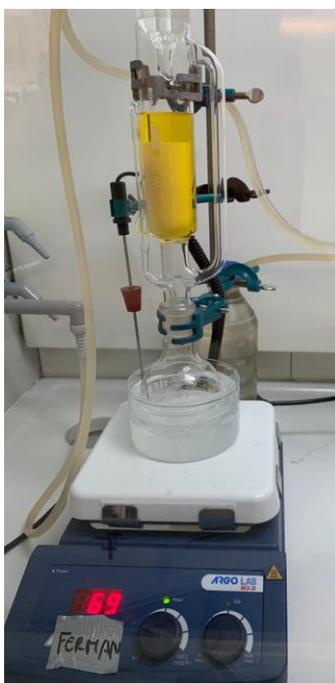


Figura 2.3 Estrattore utilizzato per l’applicazione del metodo Soxhlet

Come solvente organico si usa etere di petrolio che ha un punto di ebollizione intorno ai 40 °C. Al termine dell’estrazione si allontana per distillazione il solvente dal pallone tramite l’evaporatore rotante HEIDOLPH modello LABOROTA 4000 efficient. Si impone una condizione di vuoto pari a 400 mbar creata dalla pompa da vuoto DEL TEK modello PC 3001 vario e si immerge il pallone in un bagno a 50 °C, il solvente evapora ed è raccolto in un secondo pallone, può essere riutilizzato come solvente di estrazione o per processi secondari. Infine, si pesa l’estratto ottenuto dall’estrazione Soxhlet. La percentuale di lipidi è calcolata secondo la (2.3):

$$\text{Lipidi \%} = \frac{A-B}{C} \cdot 100 \quad (2.3)$$

dove: A = peso in grammi del pallone contenente la materia grassa estratta

B = peso in grammi del pallone

C = peso in grammi del campione di estrazione

2.2.4 Ceneri

Per valutare il contenuto di ceneri si fa riferimento alla raccolta “Metodi di analisi utilizzati per il controllo chimico degli alimenti” (Rapporti ISTISAN 96/34) dell’Istituto Superiore di Sanità, in particolare si segue il metodo gravimetrico. [46]

Si pesa 1 mg di campione su un crogiolo in ceramica e lo si pone nella muffola CARBOLITE modello GSM 11/8, anche detta calcinatore, a 550 °C per 6 ore o comunque fino al raggiungimento di una massa costante. Durante l’incenerimento si ha la combustione completa della sostanza organica in presenza di aria. Al termine della prova si lascia raffreddare il campione a temperatura ambiente e poi si pesa il crogiolo contenente la cenere (vedi **Figura 2.4**). La percentuale di ceneri è calcolata secondo la (2.4):

$$\text{Ceneri \%} = \frac{m_r}{m_0} \cdot 100 \quad (2.4)$$

dove: m_r = massa in grammi del residuo

m_0 = massa in grammi del campione d’analisi



Figura 2.4 Campioni riposti in crogioli di ceramica dopo l’incenerimento

2.2.5 Carboidrati

La determinazione dei carboidrati rispetta i criteri previsti dal report “Food Energy - Methods of analysis and conversion factors” del Food and Agriculture Organization. [49] Attraverso calcoli matematici, il metodo permette non solo la determinazione dei carboidrati ma anche del valore energetico degli alimenti. È applicabile a qualsiasi prodotto, alimento o bevanda, purchè sia destinato all’alimentazione umana. Il calcolo segue il principio dei carboidrati disponibili calcolati secondo la (2.5):

$$\text{Carboidrati \%} = 100 - \text{proteine \%} - \text{lipidi \%} - \text{ceneri \%} \quad (2.5)$$

2.2.6 Polifenoli

La determinazione del contenuto totale di polifenoli negli scarti di pomodoro segue i criteri previsti dalla ISO 14502-1:2005 “*Determination of substances characteristic of green and black tea*” dell’International Organization for Standardization. [50]

Si pesano all’interno della falcon 200 mg di campione a cui si aggiungono 10 ml di metanolo al 70%. Si posiziona la provetta all’interno dell’incubatore BIOSAN modello Orbital Shaker-Incubator ES-20/60 dove è riscaldata a 70 °C e agitata a 200 rpm per 30 min. La soluzione di metanolo al 70% estrae i polifenoli contenuti nel campione grazie all’affinità reciproca. Terminata l’estrazione, si preleva il surnatante, ovvero la quota liquida in superficie, per conservarlo in un’altra falcon. Si diluisce nuovamente la matrice residua con la soluzione di metanolo per estrarre eventuali polifenoli rimasti nel campione e si ripete il processo di estrazione nell’incubatore. Grazie alle due estrazioni si migliora la resa di estrazione. Infine, si uniscono i surnatanti ottenuti e si ripone la falcon in frigorifero.

Per quantificare i polifenoli si usa lo spettrofotometro UV-visibile a singolo raggio HACH LANGE modello DR 5000. Lo strumento lavora tra i 200 e gli 800 nm, è presente una lampada che genera una radiazione luminosa, questa attraversa un monocromatore in cui è separata nelle diverse lunghezze d’onda e grazie agli specchi i raggi sono amplificati, attraverso una fenditura si direzionano correttamente per poi colpire il campione, la porzione di radiazione che non interagisce con il campione va al rilevatore che analizza le radiazioni emesse e quelle trasmesse per quantificare l’assorbanza o la densità ottica. Lo schema del funzionamento dello spettrofotometro è schematizzato in **Figura 2.5**. Poiché lo strumento è a singolo raggio, è necessario fare il bianco o utilizzare una retta di taratura.

Per la retta di taratura si usano standard di un flavonoide puro, l’acido gallico, a cinque diverse concentrazioni note. Su una navicella si pesano 113,29 mg di acido gallico e si diluiscono in 100 ml di acqua distillata, la soluzione ottenuta costituisce lo standard iniziale, standard A, avente concentrazione più bassa. Lo standard è utilizzato per ottenere quelli a concentrazioni successive rispettando l’equazione di diluizione espressa dalla formula (2.6):

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \quad (2.6)$$

dove: C_1 = concentrazione iniziale di acido gallico fissa a 1132,9 $\mu\text{g/ml}$
 V_1 = volume di acido gallico da aggiungere in 10 ml di standard A per avere C_2
 C_2 = concentrazione dello standard desiderato
 V_2 = volume iniziale fissato a 10 ml

Con lo spettrofotometro si misura l’assorbanza degli standard, si correla la concentrazione di ciascuno con la rispettiva assorbanza per ricavare la retta di taratura, essa ci consente di ottenere la concentrazione di polifenoli nei campioni a partire dall’assorbanza misurata.

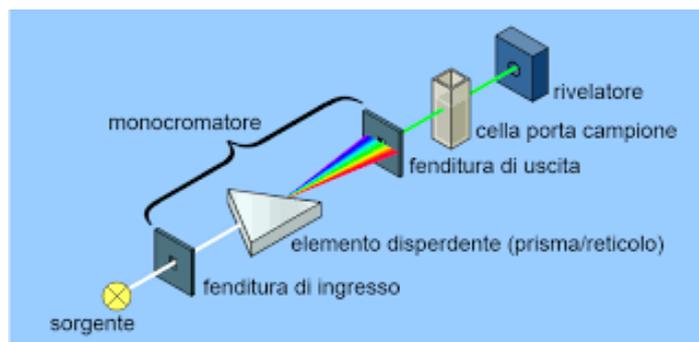


Figura 2.5 Schema del funzionamento dello spettrofotometro

Per l'analisi dei polifenoli sono necessari due reagenti, il primo è il reagente di Folin mentre il secondo è una soluzione di carbonato di sodio. Poiché i polifenoli sono molto diversi tra loro, reagiscono a lunghezze d'onda diverse dello spettro UV-visibile rendendo impossibile l'analisi, per ovviare questo problema si usa il reagente di Folin, è una soluzione che reagisce con i polifenoli contenuti nel campione inducendo l'assorbimento alla stessa lunghezza d'onda. La prima soluzione è preparata diluendo 5 ml di Folin in 50 ml di acqua distillata. Il secondo reagente, invece, ha lo scopo di stabilizzare il campione, la soluzione è ottenuta pesando 7,5 g di carbonato di sodio a cui si aggiungono 100 ml di acqua.

L'aggiunzione del Folin al campione fa variare la colorazione verso il blu, come si osserva in **Figura 2.6**.



Figura 2.6 Standard dopo l'aggiunzione del reagente di Folin

Gli standard per la retta di taratura e le soluzioni di reagenti sono conservati al buio per una notte.

Il giorno successivo si procede con l'analisi dei campioni e degli standard. I campioni sono filtrati, per rimuovere gli eventuali residui di matrice, con un filtro a siringa di dimensioni pari a $0,22 \mu\text{m}$ e poi diluiti in acqua distillata con diluizioni 1:10, 1:100 e 1:1000. La procedura di analisi, identica sia per i campioni di estrazione che per i bianchi, è la seguente: si prelevano 0,3 ml di campione e si aggiungono 1,5 ml di soluzione di Folin, dopo 3 minuti si aggiungono 1,2 ml di soluzione di carbonato di sodio, trascorsa un'ora al buio è possibile procedere con l'analisi allo spettrofotometro. L'assorbanza è misurata alla lunghezza d'onda di 735 nm.

Il contenuto di polifenoli è espresso dalla formula (2.7). Il fattore moltiplicativo a denominatore è il coefficiente di estinzione per il β -carotene in etere di petrolio, esso dipende dal solvente usato per l'estrazione. Per l'etere di petrolio il fattore moltiplicativo è pari a 2.592.

$$\text{Concentrazione Polifenoli } \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right] = \frac{(D_{\text{sample}} - D_{\text{intercept}}) \cdot V_{\text{sample}} \cdot d}{S_{\text{std}} \cdot w_{\text{sample}}} \quad (2.7)$$

dove: D_{sample} = assorbanza del campione misurata dallo spettrofotometro
 $D_{\text{intercept}}$ = intercetta della retta di taratura
 V_{sample} = volume in ml di solvente usato per l'estrazione
 d = fattore di diluizione del campione analizzato allo spettrofotometro
 S_{std} = pendenza della retta di taratura
 w_{sample} = massa in grammi del campione di estrazione

2.2.7 Carotenoidi

Per la valutazione del contenuto di carotenoidi si segue la procedura proposta da Jaeger de Carvalho et al. nel loro lavoro “*Total carotenoid content, α -carotene and β -carotene, of landrace pumpkins (*Cucurbita moschata* Duch): A preliminary study*”. In particolare di tratta nel dettaglio si tratta di un'estrazione sottovuoto con solvente organico. [51]

Si mettono 3 mg di campione all'interno di un imbuto in vetro con fondo sinterizzato sul cui fondo in precedenza è stato posizionato un filtro avente dimensioni di 0,22 μm . Il bicchiere è poi appoggiato su una beuta collegata a una pompa da vuoto (vedi **Figura 2.7 (a)**). Si aggiungono al campione 10 ml di acetone e si avvia la pompa, all'interno della beuta si raggiunge una pressione inferiore a quella ambiente che richiama il solvente di estrazione contenente i carotenoidi estratti (vedi **Figura 2.8 (b)**). Si aggiunge ulteriore acetone al campione e si avvia nuovamente la pompa, l'operazione è ripetuta più volte fino a quando il solvente recuperato appare limpido avendo estratto tutti i carotenoidi.

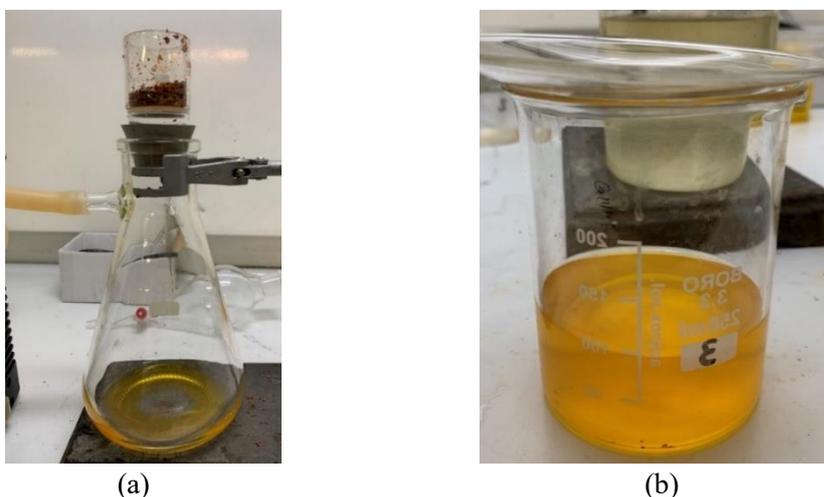


Figura 2.7 (a) Estrazione con pompa da vuoto, (b) Soluzione di acetone e carotenoidi estratti

Successivamente è necessario separare il solvente di estrazione. Si usa un imbuto separatore, ha una forma conica sormontata da una semisfera chiusa in basso da un rubinetto. Separa due miscele di liquidi immiscibili grazie ad una fase solvente composta da due liquidi diversi caratterizzati da diverse densità e polarità. Il solvente si miscela con i liquidi da estrarre secondo la loro affinità: la fase polare si miscela con la parte più polare da estrarre mentre la fase apolare

ha lo stesso comportamento con la quota meno polare, infine, a causa del diverso peso specifico delle fasi solventi stratificano all'interno dell'imbuto. In questo caso si vuole separare la miscela di acetone e carotenoidi usando una fase solvente costituita da acqua distillata ed etere di petrolio. Nell'imbuto si travasa la soluzione di acetone, poi si aggiungono 40 ml di etere di petrolio per ottenere una soluzione omogenea ed infine, si fa percolare sui bordi acqua distillata fino a quando si osserva una buona separazione delle fasi (vedi **Figura 2.8**). È importante che l'ultimo passaggio sia eseguito lentamente per evitare la formazione dell'emulsione. Per facilitare la separazione è consigliato agitare l'imbuto così da migliorare il contatto tra l'acetone e l'acqua. L'acqua distillata porta alla separazione completa della fase acquosa da quella organica, infatti, in superficie si osserva la soluzione più leggera di etere e carotenoidi mentre sul fondo si deposita la fase più densa costituita da acqua e acetone. Aprendo lentamente la valvola manuale, si recupera la fase più pesante. Infine, si trasferisce la soluzione di etere e carotenoidi in un becker e si aggiungono 15 g di solfato di sodio anidro che assorbe le eventuali molecole di acqua residue, si miscela e poi si rimuove il solido.

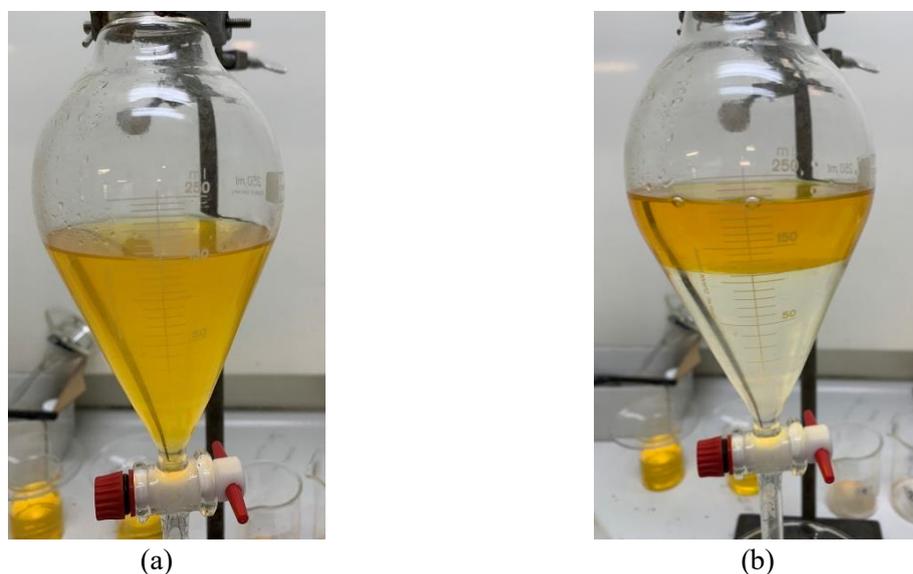


Figura 2.8 Separatore trifasico: (a) dopo l'etere di petrolio, (b) dopo l'acqua distillata

Per quantificare i carotenoidi, la soluzione finale è analizzata con uno spettrofotometro a singolo raggio che misura l'assorbanza del campione. È richiesto il bianco per la taratura della misura, lo standard è fatto con l'etere di petrolio. È fondamentale che l'assorbanza misurata sia sempre inferiore a 1 per garantire l'affidabilità della misura, se così non fosse è necessario diluire sufficientemente il campione con etere di petrolio. Si usa una diluizione di 1:2 dei campioni. L'assorbanza è misurata a una lunghezza d'onda pari a 450 nm.

Il contenuto di carotenoidi è ottenuto con la formula (2.8). Il fattore moltiplicativo a denominatore è il coefficiente di estinzione per il β -carotene nel solvente di estrazione. Per l'etere il fattore moltiplicativo è pari a 2.592.

$$\text{Concentrazione Carotenoidi} \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right] = \frac{D_{\text{sample}} \cdot V_{\text{sample}} \cdot d \cdot 10^4}{\text{Fattore} \cdot w_{\text{sample}}} \quad (2.8)$$

dove: D_{sample} = assorbanza del campione misurata dallo spettrofotometro
 V_{sample} = volume in ml di solvente di estrazione
 d = fattore di diluizione del campione analizzato allo spettrofotometro
 w_{sample} = massa in grammi del campione di estrazione

2.3 Deep Eutectic Solvent

In questo studio si utilizzano come solventi di estrazione sostenibili i *Natural Deep Eutectic Solvent*, ovvero DES sintetizzati a partire da composti di origine naturale. Per semplicità da qui in poi i NaDES saranno definiti DES.

2.3.1 Sintesi

Per la sintesi dei DES sono necessari due composti, uno agisce da donatore di elettroni (HDB) mentre l'altro si comporta da accettore di elettroni (HDA) degli stessi elettroni. Si sintetizzano 5 DES differenti i cui costituenti sono riportati in **Tabella 2.1**.

Tabella 2.1 DES sintetizzati

	HDB	HDA
DES 1		Acido Butirrico
DES 2		Acido Esanoico
DES 3	Mentolo	Acido Caprilico
DES 4		Acido Laurico
DES 5		Acido Palmitico

Come si può osservare dalla **Tabella 2.1** il mentolo è stato scelto come HDB, si tratta di un alcol chirale avente formula molecolare $C_{10}H_{20}O$ che ha diversi stereoisomeri, struttura mostrata in **Figura 2.9**. Si utilizza il (-)-Mentolo, nome IUPAC (1R-2S-5R)-2-isopropil-5-metilcicloesanolol, si presenta sotto forma di cristalli aghiformi di colore bianco. È estratto dall'olio essenziale della menta da cui ha origine l'odore caratteristico, ha una temperatura di fusione intorno ai 41 °C ed è insolubile in acqua. [52]

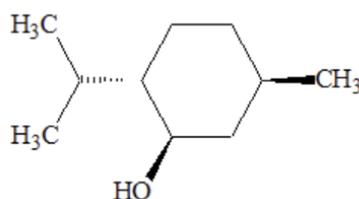


Figura 2.9 Struttura del mentolo

Nella **Tabella 2.1** sono riportate diverse scelte di HDA, sono tutti acidi grassi saturi in quanto non presentano nessun doppio legame nella catena carboniosa. Di seguito si analizza più nel dettaglio le caratteristiche degli acidi grassi scelti.

- 1) DES 1: si utilizza l'acido n-butirrico, formula molecolare $C_4H_8O_2$ e struttura riportata in **Figura 2.10**, nome IUPAC acido butanoico. È un liquido ad elevata viscosità con tipico odore di burro rancido, è ottenuto dalla fermentazione butirrica o per ossidazione dell'aldeide n-butirrica, ha una temperatura di fusione di $-5,1\text{ }^\circ\text{C}$ ed è solubile in acqua. In natura è presente esterificato con il glicerolo nei grassi animali o vegetali. [53]

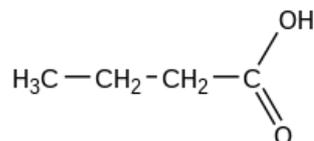


Figura 2.10 Struttura dell'acido butirrico

- 2) DES 2: si usa l'acido capronico, formula molecolare $CH_3(CH_2)_4COOH$ e struttura mostrata in **Figura 2.11**, nome IUPAC acido esanoico. È un liquido incolore e oleoso il cui odore ricorda il sudore umano, ha una temperatura di fusione di $-2\text{ }^\circ\text{C}$ ed è solubile in acqua. In natura è presente nel latte di capra o nell'olio di arachidi. [54]

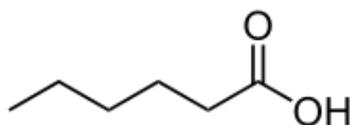


Figura 2.11 Struttura dell'acido esanoico

- 3) DES 3: utilizza come HDA l'acido caprilico, formula molecolare $C_8H_{16}O_2$ e struttura riportata in **Figura 2.12**, nome IUPAC acido ottanoico. Si presenta come liquido incolore oleoso con odore di rancido, ha una temperatura di fusione di $16\text{ }^\circ\text{C}$ ed è poco solubile in acqua. [55]

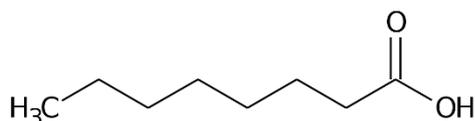


Figura 2.12 Struttura dell'acido caprilico

- 4) DES 4: si usa l'acido laurico, formula molecolare $CH_3(CH_2)_{10}COOH$ e struttura mostrata in **Figura 2.13**, nome IUPAC acido dodecanoico. È un solido con colore bianco tendente al giallastro, ha una temperatura di fusione di $44\text{ }^\circ\text{C}$ ed è altamente insolubile in acqua. In natura si trova nei gliceridi di origine vegetale come nell'olio di cocco. [56]

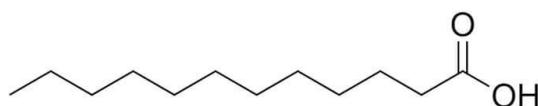


Figura 2.13 Struttura dell'acido laurico

- 5) DES 5: si utilizza l'acido palmitico, formula molecolare $CH_3(CH_2)_{14}COOH$ e struttura presentata in **Figura 2.14**, nome IUPAC acido esadecanoico. Appare come un solido bianco, ha una temperatura di fusione di 64 °C ed è particolarmente insolubile in acqua. In natura è presente esterificato con il glicerolo in molti grassi e oli di origine animale o vegetale. [57]

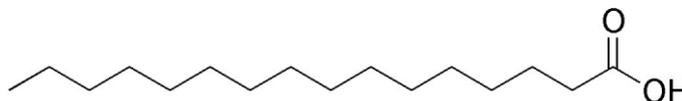


Figura 2.14 Struttura dell'acido palmitico

Ciascuno dei DES riportati in **Tabella 2.1** è sintetizzato nei rapporti molari: 1:1, 1:2 e 2:1.

Per la sintesi si fissa una base molare uguale per tutti i DES pari a 0,04 mol. Nota quindi la base molare e i pesi molari dei singoli composti, si calcola la massa di ciascuno rispettando il rapporto molare scelto secondo la formula (2.9):

$$w = MW \cdot base\ molare \cdot rapporto\ molare \quad (2.9)$$

dove: w = massa in grammi di HDB o HDA
 MW = peso molare in g/mol di HDB o HDA
 $base\ molare$ = moli fissate a 0,04 mol
 $rapporto\ molare$ = rapporto corrispondente di HDB o HDA

Si pesano le masse di entrambi i composti necessari, si uniscono in un becker in cui si posiziona un'ancoretta magnetica. Il becker è poi posizionato su una piastra riscaldante magnetica, la sintesi è condotta alla temperatura di 50 °C e agitata a 200 rpm fino a quando non si osserva una soluzione liquida completamente omogenea (circa 20 min). [58] [59]

Le analisi successive, così come le estrazioni, sono fatte soltanto sui DES rimasti allo stato liquido e riportati in **Tabella 2.2**.

Tabella 2.2 DES utilizzati per le analisi e le estrazioni

	HDB	HDA	Rapporto molare
			1:1
DES 1	Mentolo	Acido Butirrico	1:2
			2:1
			1:1
DES 2	Mentolo	Acido Esanoico	1:2
			2:1
			1:1
DES 3	Mentolo	Acido Caprilico	1:2
			2:1

2.3.2 Densità

Non essendoci un densimetro a disposizione, la densità è valutata applicando la sua definizione. La misura è fatta a temperatura ambiente di 25 °C e a pressione atmosferica. La densità è calcolata con la formula (2.10):

$$\rho = \frac{m}{V} \quad (2.10)$$

dove: ρ = densità in g/cm^3 del DES analizzato
 m = massa in g del suddetto
 V = volume in cm^3 del suddetto

Si fissa un volume, in un cilindro graduato si misurano 2 ml corrispondenti a 2 cm^3 . Dopo aver prelevato il volume corretto, il cilindro è posizionato su una bilancia analitica digitale SARTORIUS modello Cubis avente risoluzione $\pm 0,000001$ e si valuta il peso, previa taratura del cilindro.

2.3.3 Viscosità

La viscosità rappresenta l'attrito interno di un liquido, è valutata con il reometro ANTON PAAR modello MCR 302. È uno strumento apposito che misura le proprietà reologiche di sistemi allo stato liquido e di fluidi strutturati come sospensioni, emulsioni e soluzioni polimeriche.

Il campione è posto tra due elementi di misura, il rotore e lo statore, aventi geometria circolare, la rotazione caratteristica del rotore fa sì che anche il campione compia un moto circolare. Lo strumento, nota la geometria e lo sforzo di taglio, misura il momento torcente e la velocità di rotazione del rotore per ricavare la viscosità. [60]

La viscosità è misurata a una temperatura di 25 °C, con una velocità di rotazione del rotore che varia tra 0,1 e 1000 Hz e il gap, ovvero la distanza finale tra il rotore e lo statore alla quale si effettua l'analisi, pari a 0,5 mm. Il plate utilizzato ha un diametro di 25 mm, è della ANTON PAAR modello INSET I-PP25/SS in stainless steel. La scelta del plate dipende dalla viscosità presumibile del campione.

Per garantire l'affidabilità delle misure è importante che il campione abbia sempre lo stesso quantitativo di gocce tale da andare a raggiungere perfettamente i bordi del plate quando si arriva al gap impostato.

La viscosità è calcolata con la formula (2.11):

$$\mu = \tau \cdot \dot{\gamma} \quad (2.11)$$

dove: μ = viscosità in $Pa \cdot s$ del DES analizzato
 τ = sforzo di taglio in Pa , definito il rapporto tra la forza applicata e la superficie
 $\dot{\gamma}$ = velocità di rotazione in Hz del rotore

2.3.4 Spettro IR

Utilizzando lo spettrofotometro a infrarossi BRUKER modello TENSOR 27 si possono ottenere gli spettri IR dei DES. Di solito l'analisi è fatta con campioni allo stato solido o gassoso, ma è anche possibile usarlo sui liquidi.

La spettroscopia infrarossa studia l'assorbimento della radiazione infrarossa delle molecole organiche. I raggi IR appartengono alla regione dello spettro magnetico che ha lunghezze d'onda comprese tra 750 e 10^5 nm, in particolare la banda è compresa tra la radiazione visibile e quella delle microonde. È una tecnica analitica basata sull'interazione tra una radiazione elettromagnetica e la materia, quando una molecola organica è colpita dalla radiazione IR, l'energia dalla radiazione stessa è ceduta e convertita in energia vibrazionale. In particolare, si può avere una vibrazione di stretching, ovvero uno stiramento lungo l'asse di legame, oppure una vibrazione di bending, si ha un piegamento con conseguente variazione dell'angolo di legame. Soltanto quando si verifica una variazione del momento dipolare dovuto alle vibrazioni sopracitate, si osserva una vibrazione IR attiva poiché la molecola produce un campo elettrico oscillante che scambia energia con le onde elettromagnetiche permettendone l'assorbimento. [61]

Lo strumento utilizza una sonda ATR, un cristallo di diamante, per misurare l'indice di rifrazione del campione. Si pone il campione al centro del cristallo, la sonda invia una radiazione infrarossa sul campione, la quota trasmessa sarà amplificata e mandata al rilevatore che genererà poi lo spettro IR. Lo strumento, quindi, valuta la trasmittanza alle singole lunghezze d'onda analizzate.

Per tarare lo strumento è necessario fare il bianco, si fa una misura senza alcun campione così da valutare l'anidride carbonica e l'acqua contenuti nell'aria dell'ambiente di lavoro e sottrarli nelle misure del campione. Dopo ogni misura la sonda è pulita con etanolo per rimuovere ogni eventuale residuo del campione precedente.

2.4 Screening DES

Per scegliere il migliore DES per l'estrazione dei carotenoidi dagli scarti di pomodoro, si segue il protocollo di estrazione proposto dall'articolo "Recovery of β -carotene from pumpkin using switchable natural deep eutectic solvents" pubblicato su Ultrasonics Sonochemistry. [42]

Il protocollo proposto è il seguente: si mettono in contatto 100 mg di campione con differenti NaDES con un rapporto 1:10, l'estrazione è condotta a temperatura ambiente ovvero 25 °C per 24 ore in un incubatore agitato a 450 rpm, è necessario fare il triplicato delle prove.

Poiché i NaDES sintetizzati sono leggermente viscosi, seguendo il protocollo sopra descritto i risultati non risultano validati dal triplicato. Così si aumenta il quantitativo di biomassa utilizzato per l'estrazione mantenendo le altre condizioni invariate. Nelle falcon, quindi, si pesano 300 mg di biomassa a cui si aggiungono 3 ml di DES, rispettando il rapporto biomassa:solvente pari a 1:10 e si pongono poi nell'incubatore.

Terminata l'estrazione, si centrifugano i campioni a 20 °C e 5000 rpm per 15 min in una centrifuga THERMO SCIENTIFIC modello SL 16R così da separare completamente il surnatante dalla biomassa residua.

Si preleva dalla falcon 1 ml di surnatante e si fa una diluizione 1:4 con etere di petrolio affinché l'assorbanza sia inferiore a 1. Si fa il bianco con l'etere di petrolio allo spettrofotometro e poi si trasferiscono i campioni nelle apposite cuvette per la misura dell'assorbanza. Il contenuto di carotenoidi è valutato con la formula (2.8).

Per la validazione dei dati ottenuti si esegue il test ANOVA ONE e il test TUKEY tramite il software Minitab 18.

Il test Anova o analisi della varianza, basandosi su ipotesi fondamentali scelte dall'utente, verifica l'eventuale presenza di differenze statisticamente significative tra le medie di tre o più gruppi indipendenti che hanno in comune una sola variabile. Scelta l'ipotesi, si impone un livello di confidenza, ovvero un margine di errore accettabile che rende l'ipotesi valida qualora non lo fosse. Se l'ipotesi è rispettata, il software calcola l'*f*-value e il *p*-value. In particolare, il *p*-value è una misura della probabilità, ovvero indica la probabilità che la variabilità nelle medie dei dati campione sia il risultato di pura casualità. Le medie, e quindi anche i dati sperimentali, risultano significativi soltanto se il *p*-value è inferiore ad α . Il test Anova eseguito ha come ipotesi che tutte le medie dei campioni debbano essere uguali tra loro e un livello di confidenza α pari a 0,05. Se l'Anova riscontra risultati significativi non riporta quali gruppi specifici risultano significativamente diversi l'uno dall'altro, per determinarli è necessario un ulteriore test a confronto multiplo come il test Tukey. [62] [63]

Il test di Tukey, anche detto test di differenza significativa onesta di Tukey, è un test post-hoc basato sulla distribuzione dell'intervallo studiato. Il test confronta tutte le possibili coppie di dati. Si basa sulle seguenti ipotesi: le osservazioni sono indipendenti all'interno e tra i gruppi; i gruppi per ciascuna media nel test sono normalmente distribuiti; c'è omogeneità della varianza. Anche questo test richiede di imporre un livello di confidenza per individuare il migliore risultato ottenuto. Il test Tukey condotto ha un livello di confidenza pari a 0,05.

2.5 Procedura estrattiva

Il protocollo estrattivo utilizzato per gli esperimenti successivi è il seguente: si mettono in contatto 300 mg di campione con 3 ml di solvente di estrazione, ovvero rapporto biomassa/solvente di 1:10, in un boccettino di vetro al cui interno è posta un'ancoretta magnetica. I boccettini di vetro sono poi immersi in un bagnetto termico mantenuto alla temperatura desiderata. L'estrazione avviene su una piastra riscaldante magnetica che impone la temperatura e garantisce un'agitazione pari a 200 rpm. Terminata l'estrazione, i prodotti dell'estrazione sono trasferiti dal boccettino ad una falcon.

Si centrifugano i campioni a 20 °C e 5000 rpm per 15 min in una centrifuga, così da separare completamente il surnatante dalla biomassa residua. Si preleva 1 ml di surnatante e si fa una diluizione con etere di petrolio con un rapporto tale da garantire che l'assorbanza sia inferiore a 1. Si fa il bianco con l'etere di petrolio allo spettrofotometro e poi si trasferiscono i campioni nelle apposite cuvette per la misura dell'assorbanza. Infine, il contenuto di carotenoidi è valutato con la formula (2.8).

2.6 Design Of Experiment (DOE)

Come anticipato nel capitolo introduttivo, la resa di estrazione è influenzata da diversi parametri. In questo studio si è analizzato principalmente l'effetto della temperatura di estrazione (T), della durata dell'estrazione (t) e del rapporto biomassa/solvente (B/S). Per ottimizzare il processo è necessario individuare le condizioni operative che massimizzano la resa di estrazione, espressa in termini di contenuto di carotenoidi.

Il Design Of Experiment (DOE) è uno strumento che permette di studiare la relazione che intercorre tra più variabili in ingresso e una variabile chiave di uscita. È stato introdotto nel 1926 quando Ronald Fisher pose le basi fondamentali del DOE, quali il principio fattoriale, la randomizzazione, la replicazione e il blocco.

Un disegno sperimentale appare come una matrice di prove sperimentali da effettuare per studiare e ottimizzare un sistema. Il risultato di ciascun esperimento dipende da più fattori che agiscono contemporaneamente. Al fine di ottimizzare le condizioni sperimentali è necessario considerare l'azione di tutte queste variabili e le loro interazioni. Risulta conveniente progettare opportunamente gli esperimenti necessari così da ottenere la massima informazione dal sistema in oggetto eseguendo il minor numero possibile di prove. Le variabili che influenzano il sistema sono variate contemporaneamente in modo sistematico, così da poter studiare il singolo effetto di ciascuna variabile ma allo stesso tempo anche le loro interazioni. Questo approccio sperimentale si differenzia da quello classico, quest'ultimo prevede di variare una variabile alla volta, mantenendo fisse le altre con il rischio di non identificare importanti interazioni tra le variabili considerate. In particolare, rispetto al metodo classico, l'utilizzo del DOE ha consentito di ridurre notevolmente il numero di esperimenti necessari per ricavare i parametri ottimali di estrazione pur non intaccando l'accuratezza. Pertanto, è un'ottima strategia che permette di massimizzare l'efficienza degli esperimenti e allo stesso tempo di minimizzare gli sprechi, i costi e il tempo. Inoltre, per evitare che i risultati siano affetti da errori sperimentali, i dati sono analizzati mediante metodi statistici adeguati basati sui principi del DOE sopra citati. Per quanto riguarda i principi del DOE: la replica consiste nella ripetizione dell'esperimento così da ottenere un risultato più preciso e valutare l'errore sperimentale; la randomizzazione, invece, si riferisce all'ordine casuale con cui devono essere condotti gli esperimenti, il blocco è utile ad isolare l'effetto di errore sistematico e a impedire che ne oscuri gli effetti principali; a questo scopo vengono suddivisi gli esperimenti in gruppi simili tra loro.

Inizialmente si conduce un DOE a 3 variabili per studiare l'effetto di esse sulla risposta, in seguito, al fine di migliorare l'efficienza dell'ottimizzazione del sistema si fa un DOE a 2 variabili eliminando il fattore meno influente.

Per entrambi i DOE si utilizza un design CCF (Central Composite Faced), per il quale sono richiesti un numero specifico di esperimenti calcolabile con la formula (2.12):

$$\text{numero di esperimenti} = 2^k + 2 \cdot k + N \quad (2.12)$$

dove: k = numero di fattori o variabili
 N = numero di repliche

Sulla base di considerazioni statistiche, l'esperimento corrispondente al punto centrale del CCF è replicato tre volte affinché, nella valutazione della deviazione standard, il peso delle condizioni intermedie risulti maggiore. [64]

Lo strumento chemiometrico utilizzato per l'elaborazione e l'interpretazione dei risultati ottenuti dal DOE è il MLR (Multiple Linear Regression). Il modello statistico si focalizza sulla relazione tra una variabile dipendente, nota come variabile di risposta, e una o più variabili indipendenti o predittive. In questo studio la variabile di risposta corrisponde al contenuto di carotenoidi mentre le variabili predittive sono T, t e B/S. Il modello predittivo di regressione lineare multipla rappresenta la diretta generalizzazione multivariata del metodo dei minimi quadrati e descrive una dipendenza lineare tra il contenuto di carotenoidi e le variabili indipendenti. Definendo con x_i le variabili predittive e con y la variabile di risposta, il modello è definito dall'equazione (2.13):

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k (\beta_i \cdot x_i) + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k (\beta_{ij} \cdot x_{ij}) + \varepsilon \quad (2.13)$$

dove: β_0 = intercetta del modello
 β_i = coefficienti di regressione
 ε = errore residuo

I primi termini lineari considerano l'influenza delle singole variabili predittive mentre il terzo è un termine esponenziale che valuta il comportamento delle variabili con sé stesse quando $i = j$ e la dipendenza tra l'una e l'altra se $i \neq j$.

Per tutte le analisi statistiche e le interpretazioni si usa il software CAT (Chemometric Agile Tool) sviluppato dal Gruppo Italiano di Chemiometria della SCI (Società Chimica Italiana, Roma, Italia), disponibile gratuitamente. [45] Lo strumento è molto utile per valutare l'accuratezza del modello e predire i dati sperimentali ottenuti ma anche per risalire ai valori ottimali di temperatura, tempo e rapporto biomassa/solvente tali per cui si massimizza la resa di estrazione dei carotenoidi. Quest'ultima valutazione è evidenziata tramite la metodologia della superficie di risposta (RSM). I grafici di RSM vengono originati dalla prospettiva grafica generata dopo l'idoneità del modello matematico e forniscono uno strumento utile per la ricerca delle condizioni ottimali per il processo in questione. [65]

2.6.1 DOE a 3 variabili

Si inizia selezionando i fattori che influenzano la risposta del processo, ovvero il contenuto di carotenoidi, questi sono: T [°C], t [min] e B/S [g/ml]. I range di variazione dei tre parametri sono stati reperiti in letteratura sulla base di studi precedentemente condotti. Nel presente studio di tesi si utilizzano i seguenti domini sperimentali:

- T = 25 - 65 °C;
- t = 10 - 50 min;
- B/S = 0,1 - 0,3 g/ml.

I livelli di variazione individuati sono tre (-1, 0, 1) come è possibile notare in **Tabella 2.3**.

Tabella 2.3 Livelli di variazione dei fattori utilizzati per il DOE a 3 variabili

	Indice di variazione	Valore di variazione
Temperatura	-1	25 °C
	0	45 °C
	1	65 °C
Tempo	-1	10 min
	0	30 min
	1	50 min
Biomassa/Solvente	-1	1:10
	0	1:20
	1	1:30

Il design CCF utilizzato è rappresentato in **Figura 2.15**.

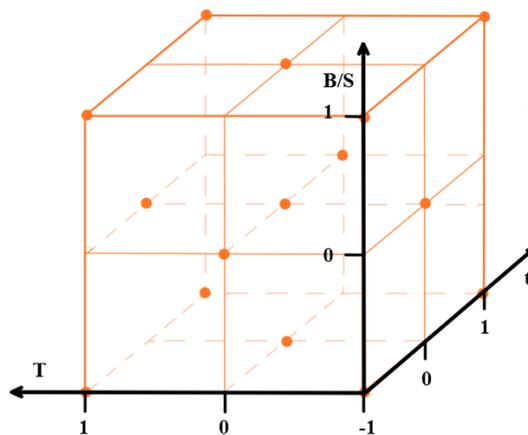


Figura 2.15 Rappresentazione grafica del design CCF utilizzato per il DOE a 3 variabili

Essendo il DOE a 3 variabili si ha che $k = 3$, il centro del design CCF è replicato 3 volte allora $N = 3$, quindi secondo la formula (2.12) è necessario condurre in totale 17 esperimenti, riportati in **Tabella 2.4**.

Tabella 2.4 Esperimenti progettati dal DOE a 3 variabili tramite l'applicazione del modello CCF e definizione delle condizioni operative per ognuno di essi

Exp. No.	T [°C]	t [min]	B/S [g/ml]	T [°C]	t [min]	B/S [g/ml]
1	-1	-1	-1	25	10	1:10
2	1	-1	-1	65	10	1:10
3	-1	1	-1	25	50	1:10
4	1	1	-1	65	50	1:10
5	-1	-1	1	25	10	1:30
6	1	-1	1	65	10	1:30
7	-1	1	1	25	50	1:30
8	1	1	1	65	50	1:30
9	-1	0	0	25	30	1:20
10	1	0	0	65	30	1:20
11	0	-1	0	45	10	1:20
12	0	1	0	45	50	1:20
13	0	0	-1	45	30	1:10
14	0	0	1	45	30	1:30
15	0	0	0	45	30	1:20
16	0	0	0	45	30	1:20
17	0	0	0	45	30	1:20

2.6.2 DOE a 2 variabili

Come verrà mostrato nel paragrafo 3.4.1, si elimina la variabile biomassa/solvente in quanto poco influente sull'estrazione. Il DOE considera quindi come fattori che influenzano l'estrazione di carotenoidi: T [°C] e t [min]. I domini sperimentali delle variabili sono i medesimi utilizzati per il DOE a 3 variabili, quindi:

- T = 25 - 65 °C;
- t = 10 – 50 min.

Mentre il rapporto biomassa/solvente è mantenuto fisso e pari a 1:10.

I livelli di variazione individuati sono sempre tre (-1, 0, 1) come è possibile notare in **Tabella 2.5**.

Tabella 2.5 Livelli di variazione dei fattori utilizzati per il DOE a 2 variabili

	Indice di variazione	Valore di variazione
Temperatura	-1	25 °C
	0	45 °C
	1	65 °C
Tempo	-1	10 min
	0	30 min
	1	50 min

Il design CCF adottato è rappresentato in **Figura 2.16**.

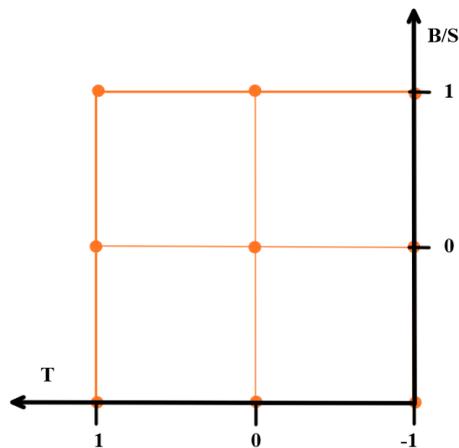


Figura 2.16 Rappresentazione grafica del design CCF utilizzato per il DOE a 2 variabili

Essendo 2 le variabili considerate dal DOE allora $k = 2$, invece come in precedenza si fa il triplicato del centro del design CCF e in questo caso si aggiungono anche le duplicazioni dei vertici e del centro del quadrato così da migliorare l'efficienza del modello, quindi, $N = 3 + 5 = 8$. È necessario condurre in totale 16 esperimenti come da formula (2.12), riportati in **Tabella 2.6**.

Tabella 2.6 Esperimenti progettati dal DOE a 2 variabili tramite l'applicazione del modello CCF e definizione delle condizioni operative per ognuno di essi

Exp. No.	T [°C]	t [min]	T [°C]	t [min]
1	1	1	65	50
2	1	-1	65	10
3	1	0	65	30
4	-1	1	25	50
5	-1	0	25	30
6	-1	-1	25	10
7	0	1	45	50
8	0	-1	45	10
9	0	0	45	30
10	0	0	45	30
11	0	0	45	30
12	1	1	65	50
13	1	-1	65	10
14	-1	1	25	50
15	-1	-1	25	10
16	0	0	45	30

2.7 Estrazione nelle condizioni migliori del DOE

Per confrontare la capacità estrattiva dei DES rispetto ai solventi convenzionali, si conduce anche un'estrazione con solvente organico. In teoria i solventi organici sono i miglior solventi disponibili poiché permeano facilmente nella matrice ed estraggono con facilità le molecole di interesse garantendo la massima resa possibile.

In questo studio, le estrazioni con solventi organici sono fatte utilizzando acetone ed etere di petrolio. Gli esperimenti sono fatti nelle condizioni ottimali individuate dal DOE, riportate in **Tabella 3.19**, seguendo il protocollo estrattivo riportato al paragrafo 2.5.

2.7.1 Estrazione con acetone

L'acetone, noto anche come propanone, è un composto chimico appartenente ai chetoni, formula molecolare $(CH_3)_2CO$ e struttura mostrata in **Figura 2.17**, nome IUPAC propan-2-one. È un liquido incolore con un odore caratteristico e ha una temperatura di ebollizione di 56,2 °C. È prodotto per via petrolchimica dalla deidrogenazione dell'alcool isopropilico. Infine, è infiammabile e solubile in acqua. È un prodotto molto utilizzato a livello industriale come solvente nell'industria delle vernici, delle lacche e dell'acetato di cellulosa, in maniera più limitata per l'estrazione degli olii essenziali. [66]

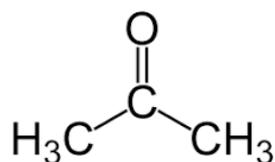


Figura 2.17 Struttura dell'acetone

2.7.2 Estrazione con etere di petrolio

L'etere di petrolio, noto anche come propanone, è una miscela di alcani, alcheni, cicloalcani e composti aromatici. I costituenti più abbondanti sono il pentano, formula molecolare C_5H_{12} , e l'esano, formula molecolare C_6H_{14} . Ha una temperatura di ebollizione intorno ai 40 °C. È un liquido incolore ma pericoloso in quanto è altamente infiammabile e nocivo, per cui è necessario utilizzare opportuni DPI (Dispositivi di Protezione Individuale). È ottenuto dalla distillazione frazionata del petrolio. È impiegato principalmente come solvente nelle sintesi organiche. [67]

2.8 Cinetica di estrazione

Per lo studio cinetico si analizza l'evoluzione temporale della concentrazione di carotenoidi nell'estratto. Si conducono le estrazioni necessarie nelle condizioni ottimali di temperatura e tempo individuate dal DOE e riportate in **Tabella 3.19**. La cinetica è stata studiata per un'estrazione della durata totale pari a 5 ore durante le quali si analizza il contenuto di carotenoidi nell'estratto a diversi tempi intermedi.

Per valutare la cinetica del processo estrattivo, si prepara il campione e si segue il protocollo estrattivo riportato al paragrafo 2.5, in questo caso però i campioni sono stati centrifugati soltanto per 5 minuti e non per i 15 previsti. Il bagnetto termico utilizzato per l'analisi della cinetica è mantenuto a 65°C. Si analizza l'estratto ottenuto trascorsi: 1, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240 e 300 minuti di estrazione. Raccolti tutti i risultati si risale alla curva cinetica sperimentale diagrammando la variazione del contenuto di carotenoidi nel tempo.

Esistono dei modelli matematici capaci di rappresentare in maniera teorica le cinetiche e stimare i risultati in funzione del tempo. Per l'estrazione di molecole bioattive da matrici vegetali di solito si utilizza il Modello di Peleg, per rappresentare i dati sperimentali ottenuti.

Il modello, inventato da M. Peleg da cui prende il nome, è stato pubblicato nel 1988 per descrivere l'assorbimento di umidità da parte dei cibi secchi. È descritto da una curva iperbolica definita dall'equazione (2.14): [68]

$$M(t) = M_0 + \frac{t}{k_1 + k_2 \cdot t} \quad (2.14)$$

dove: $M(t)$ = contenuto di umidità dopo un tempo t
 M_0 = contenuto iniziale di umidità
 k_1 e k_2 = costanti caratteristiche del sistema in esame
 t = tempo di esposizione all'umidità in ore

Questo modello è applicabile anche all'estrazione solido-liquido per descriverne la cinetica, previa opportune modifiche. L'equazione (2.14) può essere riscritta sostituendo all'umidità il quantitativo di carotenoidi estratti e ottenendo la (2.15):

$$C(t) = C_0 + \frac{t}{k_1 + k_2 \cdot t} \quad (2.15)$$

dove: $C(t)$ = contenuto in $\mu\text{g}/\text{g}$ peso secco di carotenoidi nell'estratto dopo un tempo di estrazione pari a t

C_0 = contenuto iniziale in $\mu\text{g}/\text{g}$ peso secco di carotenoidi nell'estratto,

k_1 = costante di velocità di Peleg espressa in $\text{min} \cdot \mu\text{g}/\text{g}$ peso secco

k_2 = costante di capacità di Peleg espressa in $\mu\text{g}/\text{g}$ peso secco

t = tempo di estrazione in minuti

Nel caso di interesse la concentrazione iniziale di carotenoidi C_0 è nulla, pertanto, la relazione (2.15) assume la forma espressa dalla (2.15 b):

$$C(t) = \frac{t}{k_1 + k_2 \cdot t} \quad (2.15 \text{ b})$$

La costante di velocità di Peleg k_1 è correlata alla velocità di estrazione iniziale B_0 che descrive l'efficienza del processo, le cui unità di misura sono $\left[\frac{\text{g peso secco}}{\mu\text{g} \cdot \text{min}}\right]$. È definita dalla relazione (2.16):

$$B_0 = \frac{1}{k_1} \quad (2.16)$$

La costante di capacità di Peleg k_2 , invece, si riferisce alla concentrazione di equilibrio C_e alla quale tende la curva quando il tempo di estrazione tende ad infinito. Corrisponde alla massima resa estraibile in quanto sono raggiunte le condizioni di saturazione. La sua espressione è presentata nella (2.17):

$$C(t)|_{t \rightarrow \infty} = C_e = \frac{1}{k_2} \quad (2.17)$$

Il Modello di Peleg fornisce un significato fisico ai dati sperimentali raccolti così da ottenere un'equazione cinetica di estrazione teorica. Per definirla si devono ricavare le costanti teoriche che descrivono il sistema in esame, è possibile farlo linearizzando l'equazione (2.18) nella seguente forma:

$$\frac{t}{C(t)} = k_1 + k_2 \cdot t \quad (2.18)$$

Si diagrammano i dati sperimentali riportando in ascissa il tempo di estrazione e in ordinata la corrispondente concentrazione di carotenoidi nell'estratto, poi si fa un'interpolazione lineare dei punti ottenendo una retta la cui intercetta corrisponde alla costante k_1 mentre la pendenza rappresenta k_2 . Note le costanti caratteristiche è possibile definire la curva cinetica di estrazione teorica con l'equazione (2.15 b). [69]

2.9 Caratterizzazione dell'estratto

Essendo l'estratto molto ricco in carotenoidi è possibile quantificarne i principali grazie all'analisi HPLC.

La cromatografia liquida ad alte prestazioni, nota come HPLC, è una tecnica analitica che permette di identificare e quantificare le sostanze in soluzione. L'HPLC è costituita da una o più pompe che inviano la fase mobile, un autocampionatore che manda il campione di analisi nella colonna ed infine un rilevatore spettrofotometrico collegato ad un software che consente di acquisire i dati. Alla base dell'HPLC ci sono due soluzioni differenti: la prima è la fase stazionaria che riempie la colonna cromatografica, mentre la seconda è la fase mobile che scorre attraverso il percorso di flusso del sistema. La parte più importante è la colonna cromatografica nella quale si ha la separazione delle sostanze contenute nel campione a seconda della diversa affinità di esse con la fase stazionaria o mobile. Infatti, maggiore è l'affinità di una specifica sostanza con la fase stazionaria, maggiore sarà il tempo che essa impiega ad attraversare completamente la colonna. Al contrario, più debole è l'interazione con la fase stazionaria maggiore è l'affinità con la fase mobile quindi la sostanza eluisce rapidamente. La diversa affinità delle fasi con il campione ne facilita la caratterizzazione. Il tempo trascorso dalla sostanza in colonna corrisponde al proprio tempo di ritenzione. Se il sistema HPLC funziona correttamente, il tempo di ritenzione nella colonna è unico per ogni sostanza contenuta nella miscela. Infine, il rilevatore misura continuamente la fase mobile che attraversa la cella di rilevazione, quando una sostanza eluisce dalla colonna si verifica una deviazione del segnale sottoforma di picco gaussiano, essa è analizzata in un cromatogramma dal software di acquisizione dati. I dati sono poi memorizzati su un file che riporta il segnale, espresso come area del picco gaussiano, e il tempo di ritenzione di una corsa cromatografica. [70]

Per la caratterizzazione dell'estratto si usa una HPLC SHIMADZU modello LC40DXR con colonna cromatografica KINETEX CORE-SHELL C18 avente diametro pari a 5 μm e dimensioni 150 x 4.6 mm. La fase mobile è composta da acetonitrile e acetone in rapporto 40:60, la portata inviata in colonna corrisponde a 1 ml/min. L'autocampionatore invece, invia 10 μml di campione in ogni corsa cromatografica. Per quanto riguarda la temperatura di lavoro, in colonna si impongono 30 °C mentre gli autocampionatori si trovano a 4 °C. Infine, il rilevatore valuta il picco cromatografico a una lunghezza d'onda pari a 450 nm.

I composti analizzati sono stati scelti in base ai più frequenti tra quelli individuati nel pomodoro come mostrato da diversi studi in letteratura, in particolare, si valuta il contenuto di β -carotene e licopene. Per la quantificazione dei singoli composti, prima dell'analisi dei campioni, si inviano in colonna degli standard ad alta purezza che diluiti in diversi rapporti permettono di ottenere una retta di taratura e individuare il tempo di ritenzione caratteristico.

Il solvente utilizzato per l'estrazione è un NaDES per il quale in commercio non esistono degli standard, è necessario, quindi, fare la retta di taratura per valutare il contenuto delle sostanze analizzate. Di seguito si riporta come sono stati fatti gli standard con il NaDES. La concentrazione massima di composto considerata nella retta di taratura è 0,1 mg/ml, per cui in un matraccio si pesano 0,5 mg di composto a cui si aggiungono 5 ml di NaDES. Si impone che la retta di taratura abbia un range di concentrazioni da 0,05 a 0,1 mg/ml, quindi, per ottenere le concentrazioni inferiori si diluisce quella massima con ulteriore NaDES.

I campioni utilizzati per l'analisi, invece, sono stati preparati a partire dal surnatante ricavato dalle estrazioni condotte nelle condizioni ottimali individuate dal DOE seguendo il protocollo estrattivo riportato al paragrafo 2.5.

Prima dell'analisi HPLC, sia gli standard che i campioni sono diluiti in metanolo con una diluizione 1:2.

Per quantificare il composto nel campione si usa la formula (2.14), questa è applicata a ciascun composto analizzato facendo riferimento alla rispettiva retta di taratura.

$$\text{Concentrazione Composto } \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right] = \frac{(A_{\text{sample}} - A_{\text{intercept}}) \cdot V_{\text{sample}}}{S_{\text{std}} \cdot w_{\text{sample}}} \quad (2.14)$$

dove: A_{sample} = area del picco del campione misurata dall'HPLC
 $A_{\text{intercept}}$ = intercetta della retta di taratura
 V_{sample} = volume in ml di solvente usato per l'estrazione
 S_{std} = pendenza della retta di taratura
 w_{sample} = massa in grammi del campione di estrazione

3 Risultati

Tutte le analisi sono state eseguite in triplicato così da validare i dati, calcolare la media e soprattutto valutare la deviazione standard (SD).

3.1 Caratterizzazione matrice

In **Tabella 3.1** sono riportati i risultati relativi alla caratterizzazione della matrice, ottenuti con i metodi descritti al paragrafo 2.2.

Tabella 3.1 Caratterizzazione matrice

	%	± SD
Umidità	89,63	1,05
Proteine	9,49	0,33
Lipidi	0,84	0,04
Ceneri	5,58	0,07
Carboidrati	84,09	0,28

I valori ottenuti sono abbastanza in linea con i dati reperiti in letteratura in termini di composizione percentuale, come si nota in **Tabella 3.2**. Soltanto il risultato ottenuto per i lipidi si discosta notevolmente da quelli reperibili in letteratura a causa della varietà del pomodoro utilizzato. Infatti, è importante tener conto che la caratterizzazione della matrice è funzione delle caratteristiche del pomodoro quali varietà, grado di maturazione, periodo di raccolto e successiva conservazione.

Tabella 3.2 Caratterizzazione matrice, dati di letteratura

	%	Riferimento
Umidità	6,57	Darwish <i>et al.</i> (2019) [71]
	-	Elbadrawy <i>et al.</i> (2016) [72]
Proteine	11,67	Darwish <i>et al.</i> (2019) [71]
	10,50	Elbadrawy <i>et al.</i> (2016) [72]
Lipidi	5,05	Darwish <i>et al.</i> (2019) [71]
	4,04	Elbadrawy <i>et al.</i> (2016) [72]
Ceneri	4,48	Darwish <i>et al.</i> (2019) [71]
	5,90	Elbadrawy <i>et al.</i> (2016) [72]
Carboidrati	78,80	Darwish <i>et al.</i> (2019) [71]
	78,56	Elbadrawy <i>et al.</i> (2016) [72]

L'elevato tenore di umidità degli scarti di pomodoro li rende instabili in quanto l'attività dell'acqua risulta elevata e favorisce la proliferazione di microrganismi come batteri che degradano facilmente la matrice, per questo motivo è consigliata la valorizzazione dello scarto essiccato. La concentrazione di cenere è troppo bassa per la produzione di fertilizzante naturale. L'elevata percentuale di carboidrati e la discreta presenza di proteine ne giustificano il loro riutilizzo in cucina. Infine, la concentrazione dei lipidi è minima ma, ciò nonostante, è consigliata la valorizzazione in quanto contiene antiossidanti.

3.1.1 Molecole bioattive

Per la quantificazione dei polifenoli si seguono le indicazioni riportate al paragrafo 2.2.6. Per calcolare la concentrazione di polifenoli nel campione è necessaria la retta di taratura, in **Tabella 3.3** sono riportate le caratteristiche degli standard utilizzati per ottenere la retta di taratura.

Tabella 3.3 Campioni di standard a diverse concentrazioni

Standard	Volume M [ml]	Volume totale [ml]	Concentrazione [$\mu\text{g}/\text{ml}$]
A	0,1	10	11,33
B	0,2	10	22,66
C	0,3	10	33,99
D	0,4	10	45,32
E	0,5	10	56,65

Dopo aver preparato gli standard si misura l'assorbanza allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 765 nm, riportata in **Tabella 3.4**.

Tabella 3.4 Assorbanze misurate degli standard

Standard	Concentrazione [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Assorbanza
A	11,33	0,136
B	22,66	0,262
C	33,99	0,377
D	45,32	0,495
E	56,65	0,615

Si diagrammano i risultati riportando sull'asse delle ascisse la concentrazione dello standard e sulle ordinate la rispettiva assorbanza misurata. Poi si fa l'interpolazione lineare dei dati imponendo il passaggio per l'origine, si ottiene così la retta di taratura dei polifenoli mostrata in **Figura 3.1**.

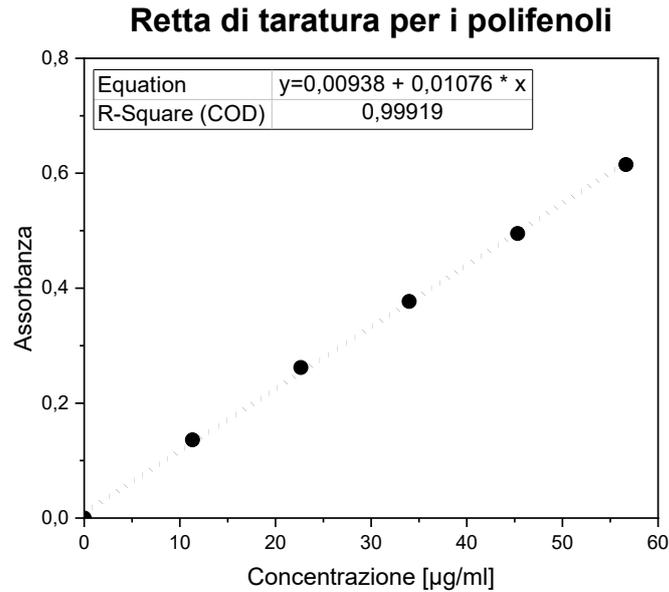


Figura 3.1 Retta di taratura usata per la quantificazione dei polifenoli

Il valore di R^2 trovato dalla retta di taratura è praticamente unitario quindi l'interpolazione dei dati sperimentali con la retta è ottima. Si osserva che all'aumentare della concentrazione l'assorbanza cresce, così come il colore blu degli standard mostrato in **Figura 2.6** è sempre più accentuato. Per calcolare la concentrazione dei polifenoli nel campione si usa l'equazione (2.7) dove:

$$D_{intercept} = 0,00938$$

$$S_{std} = 0,01076$$

Dunque, l'equazione avrà la seguente formula (3.1):

$$\text{Concentrazione Polifenoli} \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \right] = \frac{(D_{sample} - 0,00938) \cdot V_{sample} \cdot d}{0,01076 \cdot w_{sample}} \quad (3.1)$$

Si analizzano soltanto i campioni con diluizione 1:10 in quanto l'assorbanza misurata è compresa tra l'origine e quella dello standard A, risulta quindi inutile analizzare i campioni più diluiti, aventi diluizione 1:100 e 1:1000, perché l'assorbanza sarebbe ancora più piccola.

In **Tabella 3.5** si riporta il contenuto di polifenoli e carotenoidi nella matrice, ricavati con i metodi descritti ai paragrafi 2.2.6 e 2.2.7.

Tabella 3.5 Contenuto di polifenoli e carotenoidi

	$\mu\text{g}/\text{g}$ peso secco	\pm SD
Polifenoli	2288,49	229,66
Carotenoidi	91,78	0,13

I valori ottenuti sono abbastanza in linea con i dati reperiti in letteratura in termini di contenuto su peso secco, come è possibile notare in **Tabella 3.6**. In particolare si osserva l'articolo Jamaledine *et al.* (2023) è quello che più si avvicina ai risultati di questo studio.

Tabella 3.6 Contenuto di polifenoli e carotenoidi, dati di letteratura

	$\mu\text{g/g}$ peso secco	Riferimento
Polifenoli	322,6	Robles-Ramírez <i>et al.</i> (2016) [73]
	1915,5	Jamaledine <i>et al.</i> (2023) [39]
Carotenoidi	13,39	Robles-Ramírez <i>et al.</i> (2016) [73]
	96,4	Jamaledine <i>et al.</i> (2023) [39]

3.2 Deep Eutectic Solvent

3.2.1 Sintesi

I composti utilizzati per sintetizzare i DES, come riportato nel paragrafo 2.3, si trovano allo stato solido o liquido a seconda che il loro punto di fusione sia inferiore o superiore alla temperatura ambiente. Il particolare di questi composti eutettici è che, nonostante entrambi i componenti singolarmente si trovino allo stato solido, quando si uniscono per la sintesi raggiungono la temperatura eutettica, corrispondente al punto di fusione della miscela originata e inferiore alle temperature di fusione dei singoli componenti (vedi **Figura 3.2**).

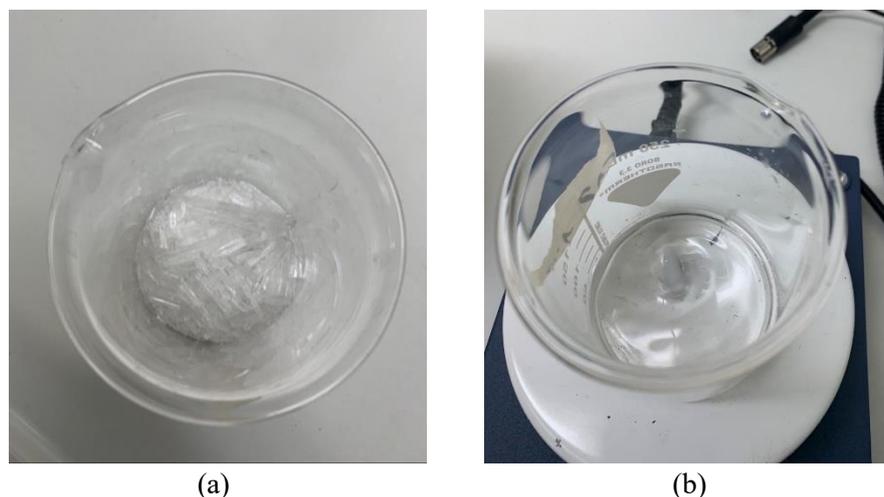


Figura 3.2 DES: (a) prima della sintesi, (b) dopo la sintesi

Grazie allo scambio di elettroni tra i due componenti si formano legami ad idrogeno che inducono il cambiamento delle strutture molecolari al fine di ottenere un'unica molecola, ovvero il DES.

I DES sintetizzati sono poi riposti in piccoli barattoli di vetro ed etichettati riportando la composizione e il rapporto molare. In **Tabella 3.7** si riportano le caratteristiche e l'aspetto dei DES sintetizzati mostrati in **Figura 3.3**. Sperimentalmente però si osserva che i DES sintetizzati a partire da acidi grassi a lunga catena, lasciati a temperatura ambiente, tendono a cristallizzare e dopo qualche ora sono completamente solidi, ciò indica che la loro temperatura di fusione è compresa tra quella ambiente e i 50 °C raggiunti dalla piastra durante la sintesi.

Tabella 3.7 Caratteristiche DES sintetizzati

	HDB	HDA	Rapporto molare	Aspetto
DES 1		Acido Butirrico	1:1, 1:2, 2:1	Liquido trasparente
DES 2		Acido Esanoico	1:1, 1:2, 2:1	Liquido trasparente
DES 3	Mentolo	Acido Caprilico	1:1, 1:2, 2:1	Liquido trasparente
DES 4		Acido Laurico	1:1, 1:2, 2:1	Solido bianco
DES 5		Acido Palmitico	1:1, 1:2, 2:1	Solido bianco



Figura 3.3 DES sintetizzati, con rapporto molare 1:1, da sinistra rispettivamente DES 1, DES 2, DES 3, DES 4 e DES 5

L'aspetto dei DES sintetizzati coincide con quello ottenuto dall'articolo "Evaluation of the antimicrobial performance of menthol and menthol-based deep eutectic solvents as potential future antibiotic" di Azmi et al. [74] Inoltre, l'articolo spiega come il DES 4 e il DES 5 sono solidi probabilmente perché la quantità di mentolo non è sufficiente a creare i legami ad idrogeno con l'acido laurico e palmitico. Infatti, a causa dell'elevata concentrazione di HDB rispetto ad HDA la miscela resta eterogenea e nonostante sia riscaldata e miscelata ad alta temperatura per lungo tempo non appena è raffreddata torna allo stato solido.

Dopo qualche giorno dalla sintesi, si è osservato che il DES 4 con rapporto molare 2:1 appare liquido, probabilmente a causa dell'aumento della temperatura dell'ambiente in cui sono conservati.

Per la caratterizzazione dei DES di seguito riportata e per le estrazioni dai cascami di pomodoro si usano soltanto i solventi che si trovano allo stato liquido, ovvero DES 1, DES 2 e DES 3.

3.2.2 Densità

Le misure di volume nel cilindro graduato non sono perfettamente identiche tra loro poiché è necessario osservare che il menisco inferiore coincida con la linea dei 2 ml. Non utilizzando un densimetro le misure non sono precise anche a causa del fatto che i DES sono leggermente viscosi. In **Tabella 3.8** sono riportate le densità seguendo le indicazioni del paragrafo 2.3.2.

Tabella 3.8 Densità dei DES liquidi

	Rapporto molare	g/cm^3	$\pm SD$
DES 1	1:1	0,861	0,053
	1:2	0,883	0,032
	2:1	0,856	0,051
DES 2	1:1	0,885	0,023
	1:2	0,868	0,054
	2:1	0,860	0,054
DES 3	1:1	0,872	0,043
	1:2	0,865	0,056
	2:1	0,877	0,027

Si osserva come esse siano inferiori a quella dell'acqua, pari a $0,997 g/cm^3$. In letteratura si trovano soltanto le densità per il DES 3 come riportato in **Tabella 3.9**, per il quale i dati ottenuti sperimentalmente sono simili a quelli trovati dagli altri articoli.

Tabella 3.9 Densità DES liquidi, dati di letteratura

	Rapporto molare	Condizioni di misura	g/cm^3	Riferimento
DES 3	1:1	20°C e 1 atm	0,905	Bergua <i>et al.</i> (2022) [75]
	1:2		0,907	
	2:1		0,903	
	1:1	25°C e 1 atm	0,901	Yutian Ma <i>et al.</i> (2023) [76]
	1:2		0,903	
	2:1		0,899	

3.2.3 Viscosità

L'analisi della viscosità è stata condotta seguendo le indicazioni del paragrafo 2.3.3. Le prove sono state fatte in duplicato, grazie ai dati ottenuti si calcola la media e la deviazione standard. Infine, si diagrammano i risultati riportando in ascissa la velocità di rotazione del rotore e in ordinata la viscosità del DES. La viscosità del DES 1, nei diversi rapporti molari, è riportata in **Figura 3.4**, in **Figura 3.5** è mostrata quella del DES 2 ed in **Figura 3.6** si ha quella del DES 3.

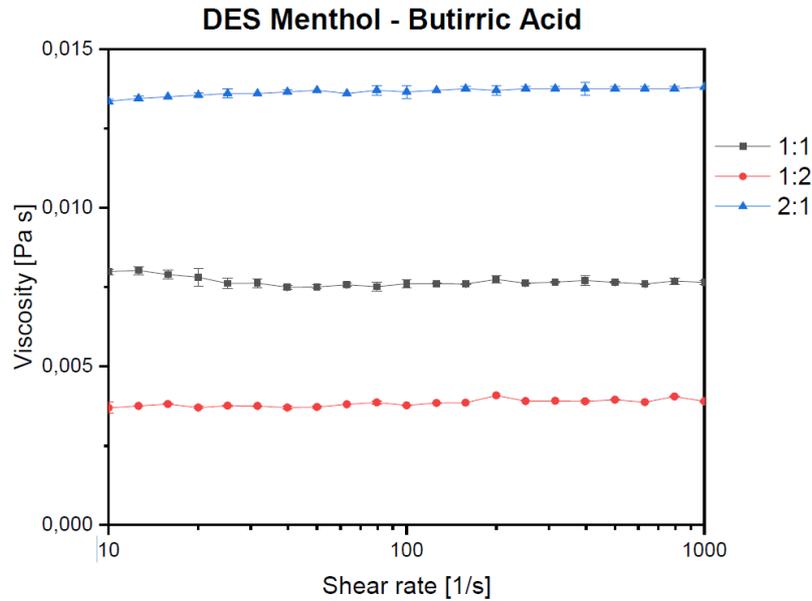


Figura 3.4 Viscosità DES 1

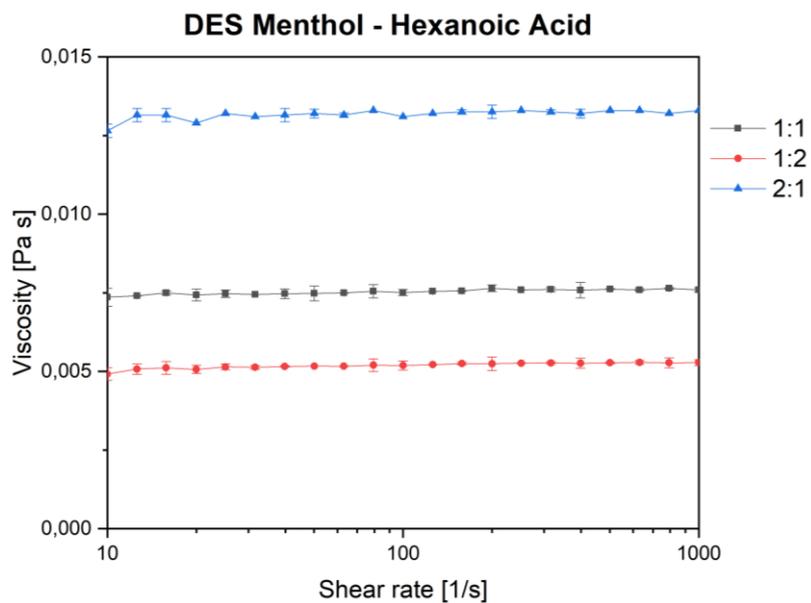


Figura 3.5 Viscosità DES 2

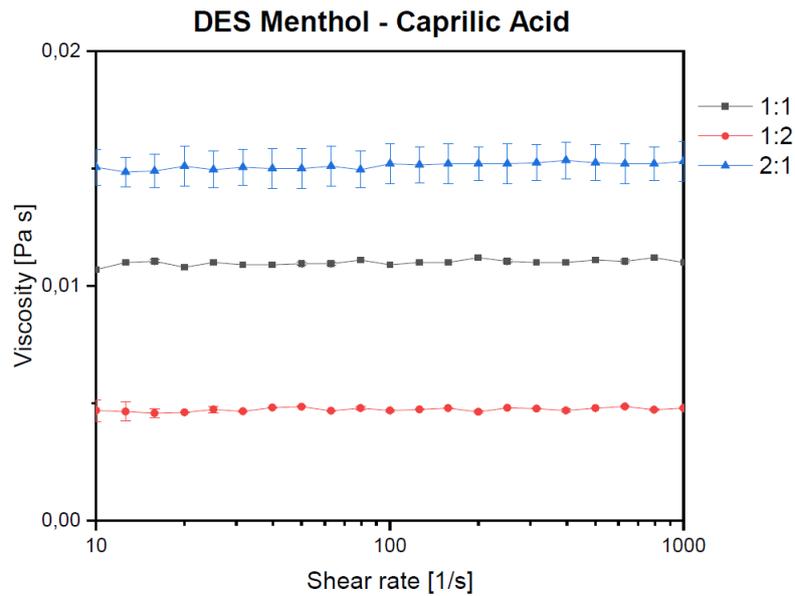


Figura 3.6 Viscosità DES 3

Per tutti i DES analizzati vale che maggiore è la quantità di mentolo presente nel DES più alta è la sua viscosità. Si osserva il comportamento opposto al variare del quantitativo di acido grasso, infatti, a parità di mentolo all'aumentare del contenuto di acido grasso diminuisce la viscosità del DES sintetizzato. Inoltre, si nota come il rapporto molare caratterizzato da minore viscosità è quello 1:2, caratteristica comune a tutti i DES analizzati.

In **Figura 3.7** si riportano in un unico grafico i risultati di tutti i DES analizzati in tutti i loro rapporti molari così da osservare con maggiore facilità la loro differente viscosità.

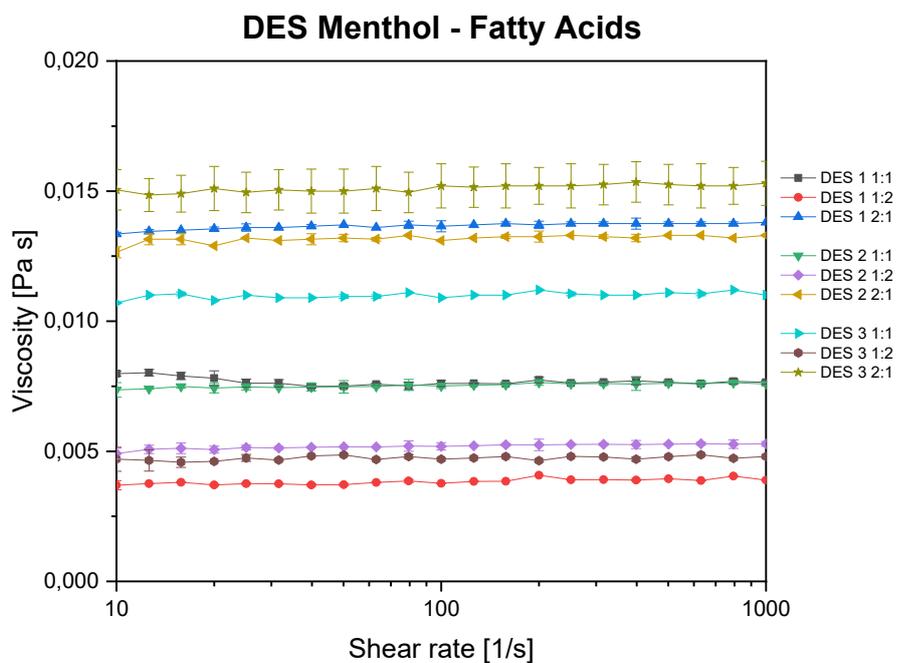


Figura 3.7 Viscosità dei DES

Si nota che la deviazione standard ottenuta è minima per la maggior parte dei dati. Si apprende che la composizione del DES influisce notevolmente sulla viscosità della miscela. La differenza principale è la catena carboniosa dell'acido grasso utilizzato, più essa è lunga più grande è il suo peso, quindi, è necessario applicare una maggiore forza per osservare una medesima deformazione, di conseguenza la viscosità aumenta.

In **Tabella 3.10** si riportano i risultati delle viscosità misurate.

Tabella 3.10 Viscosità dei DES liquidi

	HDB	HDA	Rapporto molare	<i>mPa s</i>	\pm SD
DES 1	Mentolo	Acido Butirrico	1:1	7,66	9,19E-05
			1:2	3,84	1,73E-05
			2:1	13,67	7,42E-05
DES 2	Mentolo	Acido Esanoico	1:1	7,54	8,41E-05
			1:2	5,20	9,19E-05
			2:1	13,20	6,72E-05
DES 3	Mentolo	Acido Caprilico	1:1	11,01	1,77E-05
			1:2	4,74	6,12E-05
			2:1	13,94	2,12 E-03

Il DES con minor viscosità risulta essere quello costituito da mentolo e acido butirrico con rapporto molare 1:2. Le viscosità sono notevolmente superiori a quella dell'acqua pari a 1 mPa s a causa dei legami ad idrogeno che si sono formati tra HDA e HDB. [29] In letteratura, come per la densità, si trovano soltanto le viscosità per il DES 3 riportate in **Tabella 3.11**, soltanto per il rapporto molare 1:1 le viscosità coincidono con quelle misurate mentre le altre sono più alte.

Tabella 3.11 Viscosità DES liquidi, dati di letteratura

	Rapporto molare	<i>Pa s</i>	Riferimento
DES 3	1:1	12,05	
	1:2	8,81	Bergua et al. (2022) [75]
	2:1	17,60	

3.2.4 Spettro IR

Gli spettri IR sono ottenuti come descritto nel paragrafo 2.3.4. Dapprima si analizzano i singoli composti costituenti il DES e poi si valuta lo spettro di esso nei diversi rapporti molari. È difficile ricavare la struttura molecolare dei DES sintetizzati. Si valutano, dunque, i picchi presenti nello spettro IR dei DES e se sono condivisi da uno o entrambi i composti di origine.

In **Figura 3.8** si riportano gli spettri del mentolo, dell'acido butirrico e del DES 1 sintetizzato a partire da essi nei diversi rapporti molari. Partendo dalla destra dello spettro si osserva che intorno a 500 i DES presentano dei piccoli picchi caratteristici del mentolo. Intorno a 1000, invece, si ha un doppietto che non è presente nell'acido butirrico ma è tipico del mentolo. Tra 1000 e 2750 lo spettro dei DES è molto più simile all'acido butirrico, inoltre, condividono lo stesso picco evidente a 1750. Poco prima dei 3000 i DES riportano numerosi picchi di piccole dimensioni presenti sia nel mentolo che nell'acido butirrico ma l'aspetto è più vicino a quelli dell'acido. Infine, a 3250 il mentolo esibisce un enorme picco che però non si ritrova nei DES sintetizzati. I picchi dei DES, seppur condividano le lunghezze d'onda con i costituenti, sono molto diversi nei valori di trasmittanza misurata.

Queste stesse osservazioni sono applicate anche per il DES 2 e il DES 3, i cui spettri sono riportati rispettivamente in **Figura 3.9** e in **Figura 3.10**, insieme alle rispettive molecole di base. Gli acidi butirrico, esanoico e caprilico esibiscono spettri infrarossi molto simili tra di loro, i picchi osservati si trovano alle stesse lunghezze d'onda e si differenziano principalmente per le dimensioni in termini di trasmittanza.

In generale, i DES nei diversi rapporti molari mostrano spettri molto simili tra loro, infatti, differiscono per piccole caratteristiche.

Soprapponendo gli spettri IR si nota che il DES 1 e il DES 3 hanno spettri quasi coincidenti con i rispettivi acidi grassi utilizzati per la sintesi, il DES 2 invece si differenzia da entrambe le molecole in quanto mentolo ed acido esanoico mostrano spettri a infrarossi quasi combacianti.

DES Menthol - Butirric Acid

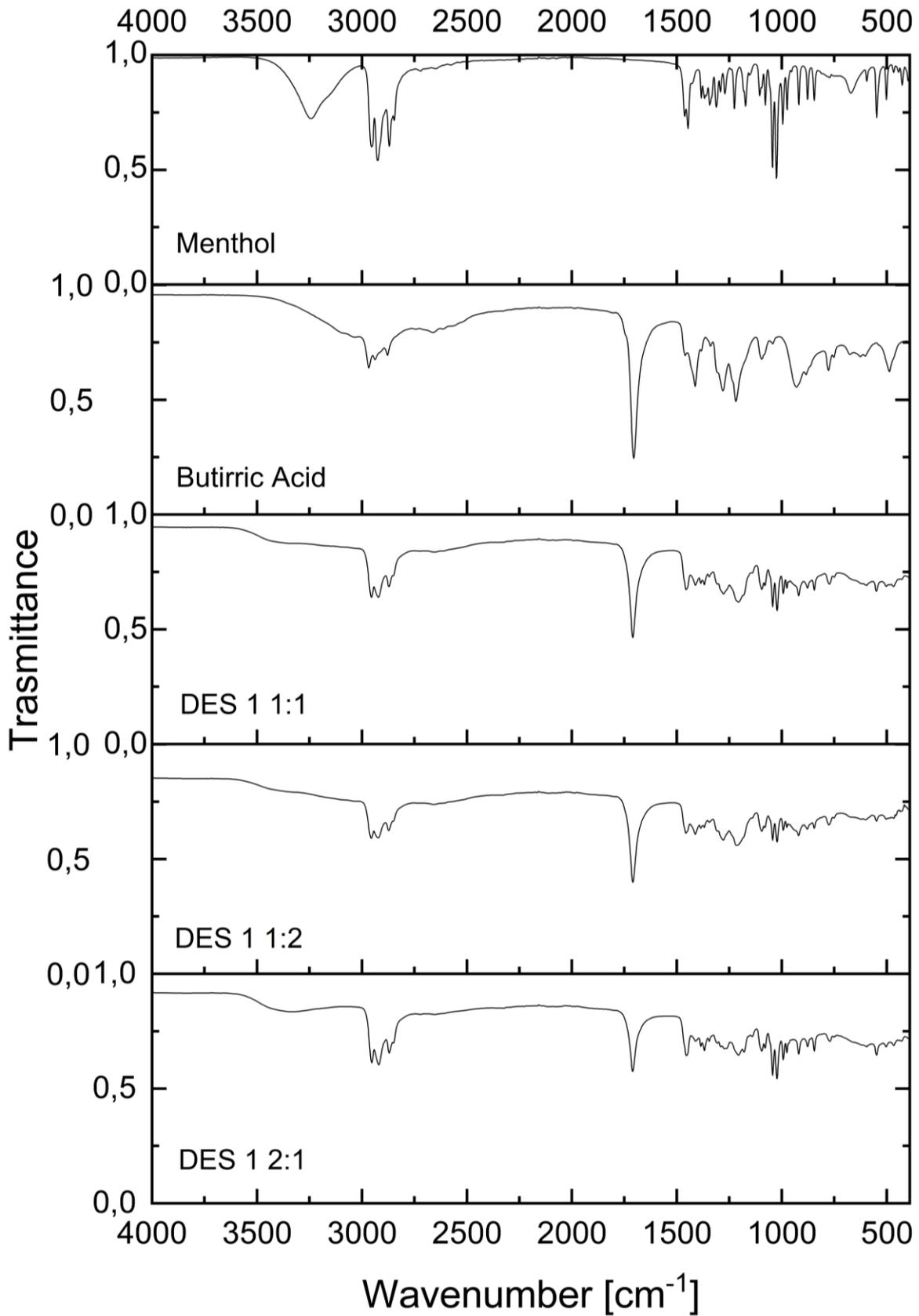


Figura 3.8 Spettro IR DES 1

DES Menthol - Hexanoic Acid

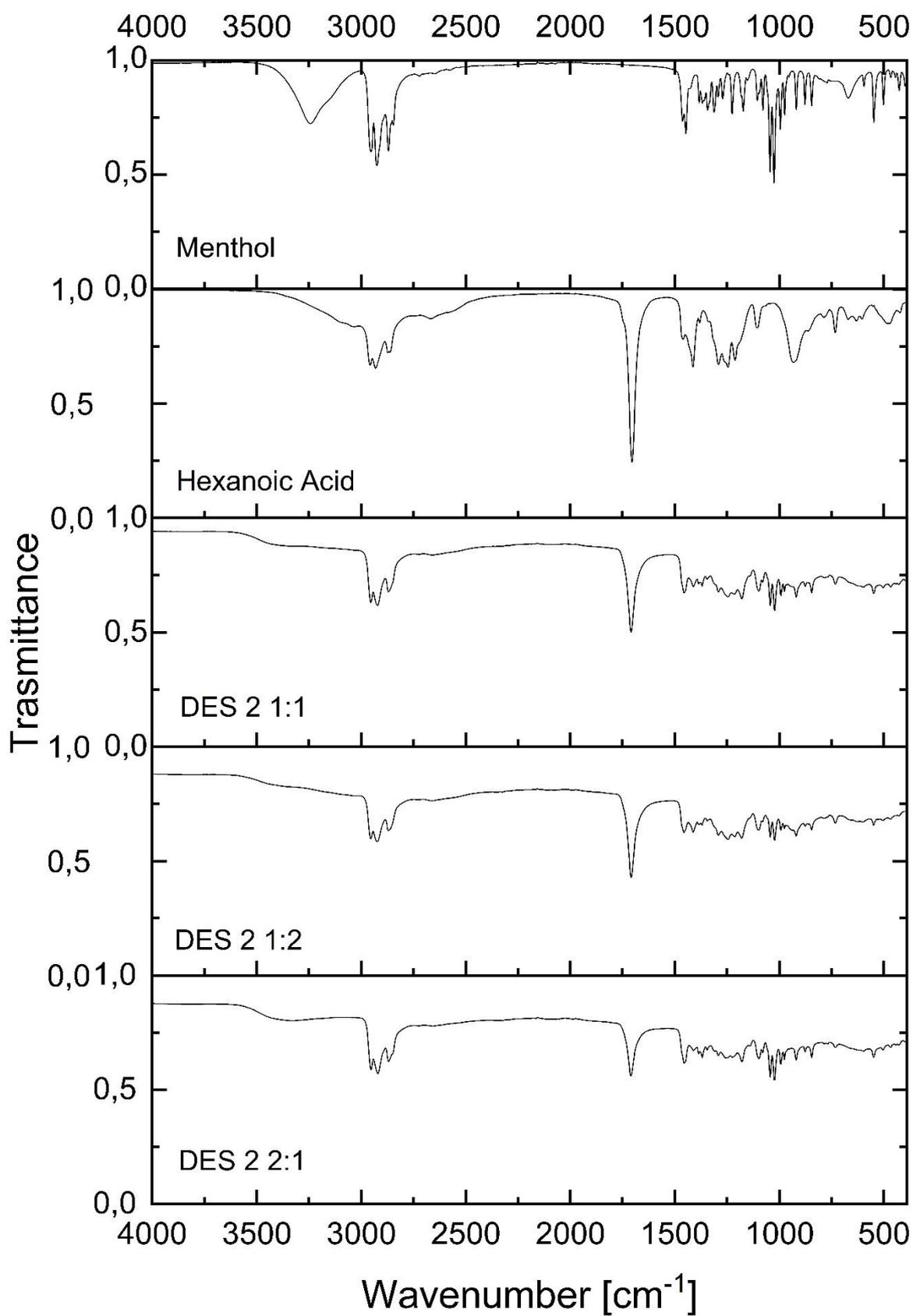


Figura 3.9 Spettro IR DES 2

DES Menthol - Caprilic Acid

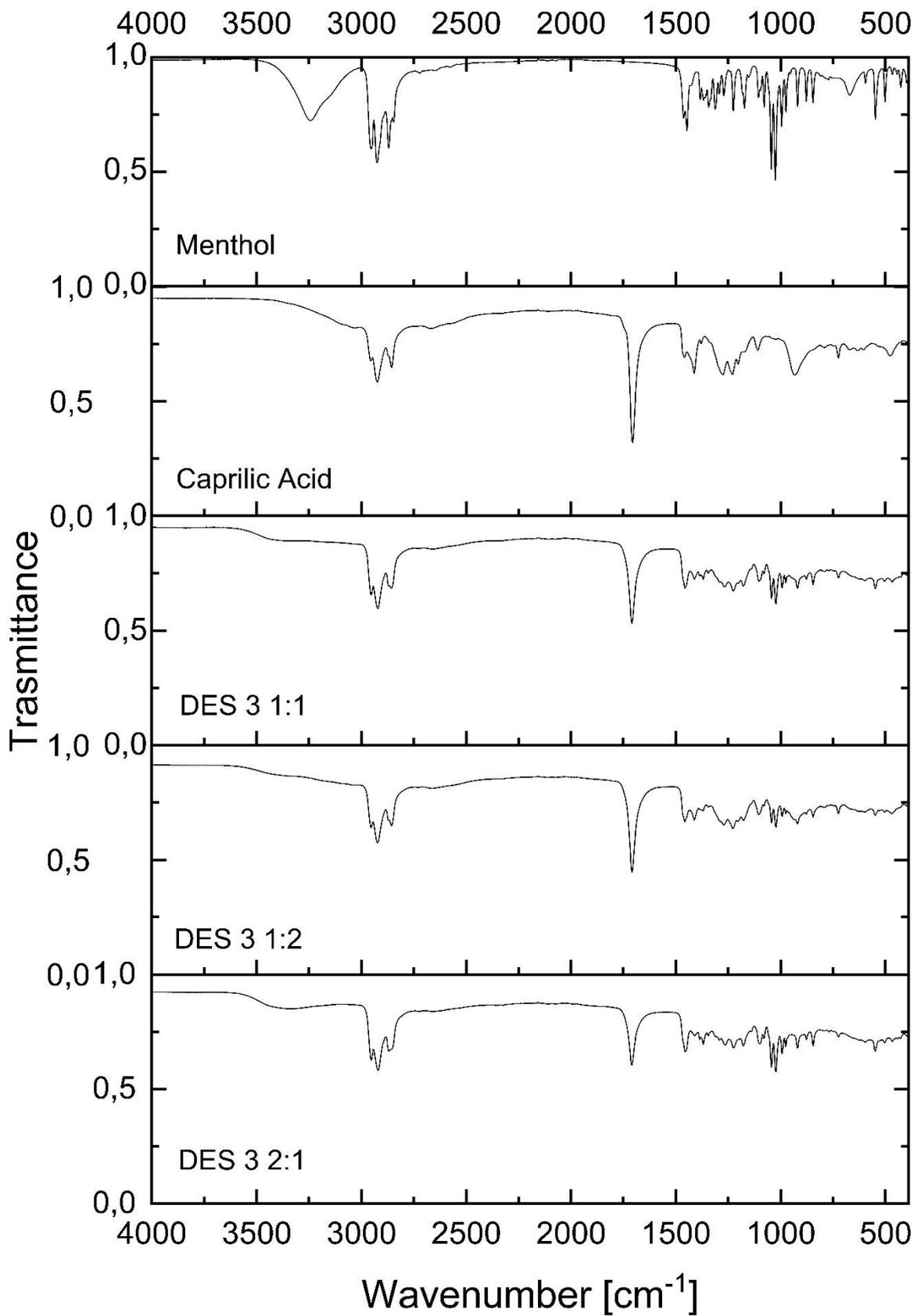


Figura 3.10 Spettro IR DES 3

3.3 Screening DES

Si segue il protocollo estrattivo riportato al paragrafo 2.4.1 usando come solventi i DES sintetizzati. Grazie ai risultati ottenuti è possibile fare uno screening dei DES per individuare quale sia il solvente migliore in grado di estrarre la maggior quantità di carotenoidi dalla matrice. Terminata l'estrazione nell'incubatore e analizzati i campioni allo spettrofotometro, si applica la formula (2.8), in **Tabella 3.12** sono riportati i risultati ottenuti.

Tabella 3.12 Carotenoidi estratti con i DES

	Rapporto molare	$\mu\text{g/g}$ peso secco	\pm SD
DES 1	1:1	128,83	1,64
	1:2	147,71	2,12
	2:1	72,35	0,09
DES 2	1:1	112,24	5,59
	1:2	118,65	0,61
	2:1	83,11	4,74
DES 5	1:1	92,54	2,99
	1:2	127,95	8,82
	2:1	114,43	5,88

Il solvente più efficiente che ha dato resa migliore risulta essere il DES 1 con rapporto molare 1:2. Per convalidare i risultati si conduce il Test ANOVA e in seguito quello TUKEY.

Si fa prima il test Anova, in un file Excel si riportano i dati relativi alle estrazioni per poi essere caricato nel software per la valutazione. In **Tabella 3.13** si riportano i dati utilizzati per il test Anova.

Tabella 3.13 Dati utilizzati per il test ANOVA

	DES 1			DES 2			DES 3		
	1:1	1:2	2:1	1:1	1:2	2:1	1:1	1:2	2:1
	129,99	146,21	72,42	94,22	119,09	79,76	90,42	134,19	118,58
	127,68	149,21	72,38	116,19	118,22	86,46	94,65	121,71	110,27
			72,26						
Fattore	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
Media	128,83	147,71	72,35	105,21	118,65	83,11	92,54	127,95	114,43
Dev. St.	1,64	2,12	0,09	15,54	0,61	4,74	2,99	8,82	5,88

A ciascun DES analizzato si assegna un fattore che permette di distinguerlo dagli altri. Per il test si è imposto un valore di α pari a 0,05.

$$F - value = 33,97$$

$$p - value = 0,0000028837$$

$$R - sq = 96,45\%$$

Dai risultati di ANOVA si nota la presenza di dati significativamente differenti tra loro, motivo per il quale si fa il test Tukey per riconoscere quali essi siano. Per il test si è imposto un valore di α pari a 0,05. In **Tabella 3.14** si riportano i risultati del test TUKEY.

Tabella 3.14 Risultati del test TUKEY

Fattore	Media	Gruppo				
C2	147,71	A				
C1	128,83	A	B			
C8	127,95	A	B			
C5	118,65		B			
C9	114,43		B	C		
C4	105,20		B	C	D	
C7	92,54			C	D	E
C6	83,11				D	E
C3	72,35					E

I fattori che non condividono il gruppo sono significativamente differenti dagli altri. Riportando in un grafico a barre il contenuto della **Tabella 3.14** si ottiene la **Figura 3.11**.

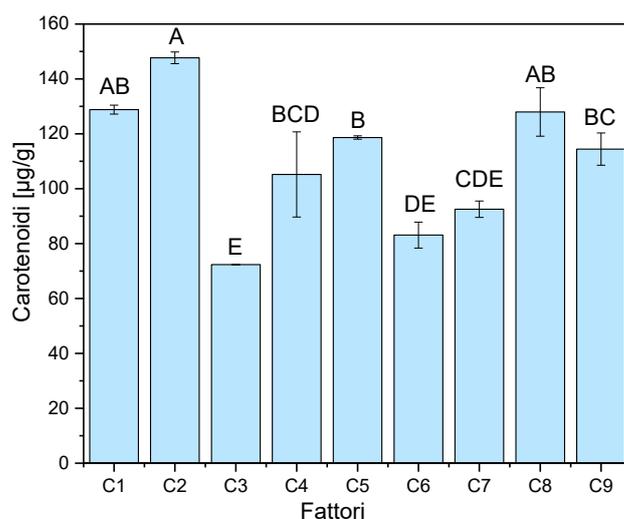


Figura 3.11 Risultati test ANOVA e test TUKEY

Dalla **Figura 3.11** si nota come gli unici fattori che si differenziano sono C2 e C3. In particolare, C2 riporta un risultato in termini di carotenoidi estratti maggiore.

I test eseguiti hanno confermato che i dati della **Tabella 3.13** possono ritenersi validi. Quindi il DES migliore risulta essere il DES 1, composto da Mentolo e Acido Butirrico con rapporto molare 1:2. In linea teorica, il solvente con viscosità più bassa ha maggior capacità di penetrare all'interno della matrice della biomassa e quindi è in grado di estrarre più carotenoidi. Infatti, il DES 1 con rapporto molare 1:2 è quello avente viscosità più bassa.

È difficile fare un confronto con la letteratura in quanto si trovano pochissimi articoli che utilizzano i DES da noi scelti. In particolare, non si trova nessun articolo che tratta il DES mentolo-acido butirrico che in questo lavoro è risultato essere il migliore e dunque è impossibile confermare l'elevato potere estrattivo di esso.

3.4 Design Of Experiment (DOE)

I risultati ottenuti degli esperimenti previsti dal DOE sono riportati in un file Excel in cui nelle prime colonne si trovano i dati delle variabili predittive e nell'ultima colonna invece i valori della corrispondente risposta del sistema. Sul software CAT si carica il file contenente i dati e si genera la matrice sperimentale. Si procede poi con il modello predittivo MLR (Multiple Linear Regression) del sistema basato sulle variabili indipendenti, si indicano al modello quali colonne contengono le variabili predittive e quale invece la risposta. Prima della valutazione del modello, è possibile modificare le interazioni tra le variabili da considerare ed infine si impone che la varianza sperimentale sia basata sui residui. Ottenuto il modello si studia, attraverso opportuni grafici, l'accuratezza e la qualità del modello. Infine, si identificano le condizioni migliori di estrazione tramite i grafici della superficie di risposta RSM.

3.4.1 DOE a 3 variabili

In **Tabella 3.15** sono riportate le rese estrattive, in termini di contenuto di carotenoidi, degli esperimenti imposti dal DOE a 3 variabili. Le corrispondenti condizioni operative sono riportate in **Tabella 2.4**.

Tabella 3.15 Risultati degli esperimenti previsti dal DOE a 3 variabili

Exp. No.	T [°C]	t [min]	B/S [g/ml]	µg/g peso secco
1	-1	-1	-1	69,60
2	1	-1	-1	191,71
3	-1	1	-1	128,15
4	1	1	-1	192,31
5	-1	-1	1	64,24
6	1	-1	1	181,81
7	-1	1	1	111,40
8	1	1	1	313,90
9	-1	0	0	88,49
10	1	0	0	344,30
11	0	-1	0	114,35
12	0	1	0	116,97
13	0	0	-1	138,54
14	0	0	1	151,90
15	0	0	0	153,71
16	0	0	0	130,38
17	0	0	0	135,12

Da una prima analisi dei dati si nota come le rese migliori sono registrate nell'8° e nel 10° esperimento, entrambi accomunati dal massimo valore di temperatura. Ci si aspetta quindi che il parametro T sia tra quelli che più influenza la resa estrattiva. Per quanto riguarda la variabile predittiva t, si osserva come questa sia particolarmente rilevante sulla resa quando la T ha valori minimi come negli esperimenti 1 e 3, invece man mano che la T aumenta tende ad essere sempre meno rilevante. Il comportamento opposto si osserva invece per la variabile B/S, infatti, alle alte T si nota che minore è il valore di B/S più alta è la resa estrattiva ottenuta come riportato nel 4° e nell'8° esperimento ma per T basse la differenza non è così significativa.

In un disegno sperimentale, tutte le variabili che descrivono il sistema (T, t, B/S) sono variare contemporaneamente analizzando così l'effetto singolo di ciascuna variabile e al contempo anche le interazioni tra più variabili. Per l'interpretazione dei risultati ottenuti dal DOE si usa il modello MLR. Il modello si focalizza sulla determinazione della relazione matematica tra la variabile di risposta, nel caso considerato il contenuto di carotenoidi, e più predittori (T, t, B/S). Il modello scelto considera tutte le possibili interazioni tra le variabili, come si osserva in **Figura 3.12**.

	Tempe	tempo	B.S..
Tempe	1	1	1
tempo		1	1
B.S..			1

Figura 3.12 Interazioni considerate per il modello del DOE a 3 variabili

Il modello che meglio approssima i dati sperimentali è il seguente:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 \quad (3.2)$$

dove: β_0 = intercetta del modello

x_1 = valore in °C della temperatura di estrazione

x_2 = durata espressa in minuti dell'estrazione

x_3 = rapporto biomassa/solvente in g/ml

In **Tabella 3.16** sono riportati i coefficienti della funzione espressa in (3.2).

Tabella 3.16 Coefficienti del modello ottenuto per il DOE a 3 variabili

	Coefficienti	Dev. St.	Coefficienti Interazione	p-value
β_0	141,65	12,36	29,23	0
β_1	69,68	9,14	21,60	0
β_2	24,10	9,14	21,60	0,03
β_3	10,30	9,14	21,60	0,30
β_{11}	40,63	17,65	41,74	0,05
β_{22}	-27,42	17,65	41,74	0,16
β_{33}	2,14	17,65	41,74	0,91
β_{12}	3,37	10,21	24,15	0,75
β_{13}	16,73	10,21	24,15	0,15
β_{23}	15,01	10,21	24,15	0,19

Il modello, dopo la sostituzione dei coefficienti nella sua equazione (3.2), assume la seguente forma (3.2 b):

$$y = 141,65 + 69,68 x_1 + 24,1 x_2 + 10,3 x_3 + 40,63 x_1^2 - 27,42 x_2^2 + 2,14 x_3^2 + 3,37 x_1 x_2 + 16,73 x_1 x_3 + 15,01 x_2 x_3 \quad (3.2 b)$$

La varianza sperimentale dà un'informazione sulla confidenza delle ripetizioni, ovvero indica quanto esse sono diverse tra loro. Per ottenere un modello quanto più accurato possibile, il valore deve avvicinarsi al 100%. In questo caso, essendo pari a 81% non è sufficientemente

alto per garantire una buona accuratezza. Il software fornisce anche la percentuale di accuratezza, detta varianza del modello, con la quale la funzione espressa in (3.2) riesce a descrivere la variabilità dei dati coinvolti. L'accuratezza del modello trovato è del -13%, addirittura ha un valore negativo quindi il modello non va bene ma si continua ad analizzare ciò che è stato ottenuto.

Si osserva il grafico dei coefficienti del modello per comprendere quali variabili e interazioni binarie sono rilevanti e l'entità di influenza sulla risposta del sistema considerato. In particolare, se la deviazione standard dei coefficienti, rappresentata dalla linea verde, raggiunge valori negativi allora la variabile corrispondente non è molto rilevante, al contrario, più questa è positiva più risulta influente e infatti il software la indica con un "*". Si osservano quanti più asterischi maggiore è l'importanza della variabile.

In **Figura 3.13** si osserva come la temperatura è la variabile più importante per la resa di estrazione dei carotenoidi e in minor misura anche il tempo, invece, il rapporto B/S non influisce sulla risposta così come anche le interazioni tra le variabili.

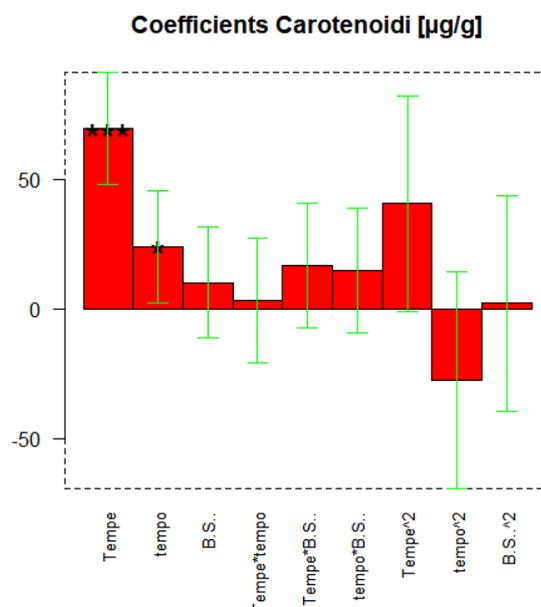


Figura 3.13 Grafico dei coefficienti della funzione (3.2), ottenuto mediante CAT

Si analizza poi la dispersione dei residui rispetto al modello prescelto. I residui corrispondono alle differenze tra i valori osservati sperimentalmente e i valori stimati con l'equazione di regressione (3.2), rappresentano quindi la parte di errore di previsione del modello di regressione. Affinché il modello riesca ad avere un buon potere predittivo, l'errore deve essere una variazione imprevedibile nella variabile di risposta, di conseguenza dipende dalla distribuzione dei residui nel grafico in questione. I residui che si trovano nella parte superiore del grafico risultano essere sovrastimati, mentre quelli che si trovano al di sotto della linea tratteggiata in verde sono sottostimati.

In **Figura 3.14** si nota una alla linea orizzontale tratteggiata in corrispondenza dei residui con media zero. Infatti, i residui del modello MLR hanno per definizione media nulla. L'omogeneità della varianza dei residui è testimoniata dal fatto che i punti si trovano distribuiti in modo simile

sia nella parte destra che in quella sinistra del grafico. La linearità è testimoniata dal fatto che i punti si distribuiscono in modo del tutto casuale intorno alla linea verde.

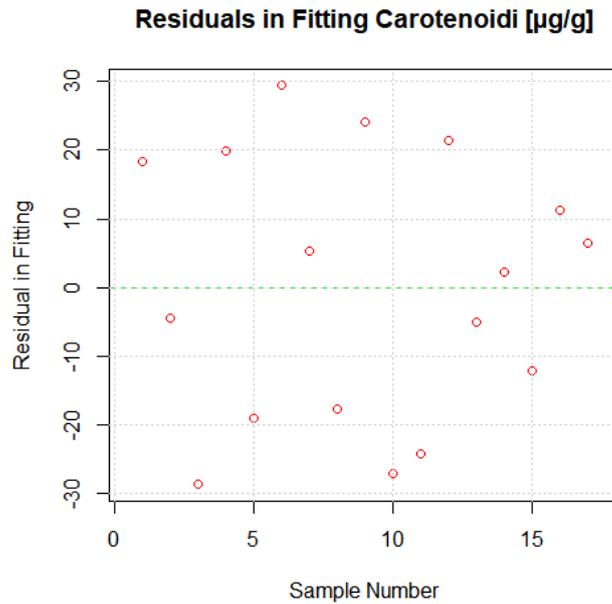


Figura 3.14 Grafico dei residui rispetto al modello di regressione MLR, ottenuto mediante CAT

Si studia, infine, dove si dispongono i valori ottenuti sperimentalmente nei 17 esperimenti previsti dal DOE rispetto ai valori fittati dal modello MLR. I valori sperimentali sono quelli riportati in **Tabella 3.15**. In particolare, più i dati sperimentali si avvicinano alla linea del modello più alta è la sua accuratezza. I risultati sperimentali sono indicati con il numero rosso mentre i dati stimati dal modello MLR sono rappresentati dalla linea verde. In **Figura 3.15** si nota che gli esperimenti aventi numero 5, 1, 9, 6 e 10 sono lontani dalla retta.

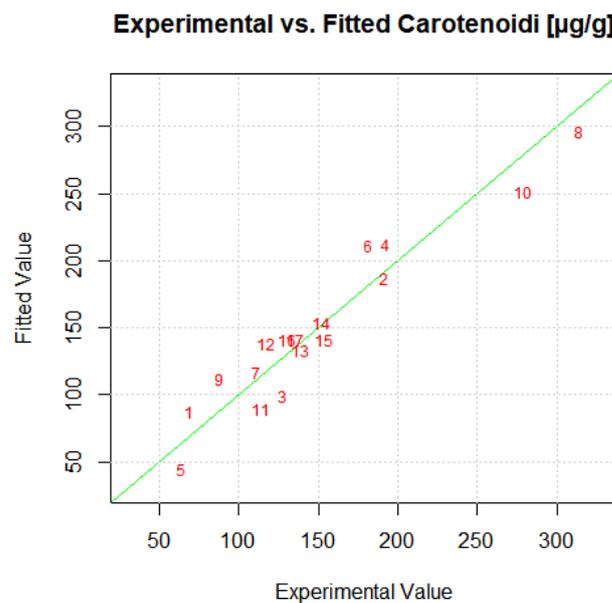


Figura 3.15 Grafico dei valori sperimentali vs valori fittati dal modello, ottenuto mediante CAT

Il grafico soprastante è confrontato con la Cross Validation (CV). La CV fornisce informazioni importanti riguardo la stabilità del modello di regressione e riguardo la sua generalizzabilità al di là dei dati forniti (mediante il DOE). A questo proposito, il metodo CV suddivide i dati, in maniera totalmente casuale, in due set: i dati di training utili a sviluppare il modello e i dati di convalida utili a valutare la capacità predittiva del modello. Per valutare la coerenza del modello, la CV ricava una funzione scartando un singolo valore alla volta dal set di training e con l'equazione trovata si prevede la risposta del sistema nelle condizioni eliminate al fine di confrontarla con il valore sperimentale. Il software riporta anche l'errore quadratico medio del CV (RMSECV) pari a 70,82, si tratta di un errore molto alto indice dell'imprecisione nella previsione dei dati.

In particolare, si confrontano la **Figura 3.15** con la **Figura 3.16** per verificare che non ci siano ulteriori allontanamenti dalla retta del modello indici di cattiva precisione nella previsione del sistema. Confrontando le due figure si osserva che gli esperimenti 5, 3, 1, 8, 6 e 4 si sono discostati particolarmente dalla linea retta quindi il modello risulta poco preciso.

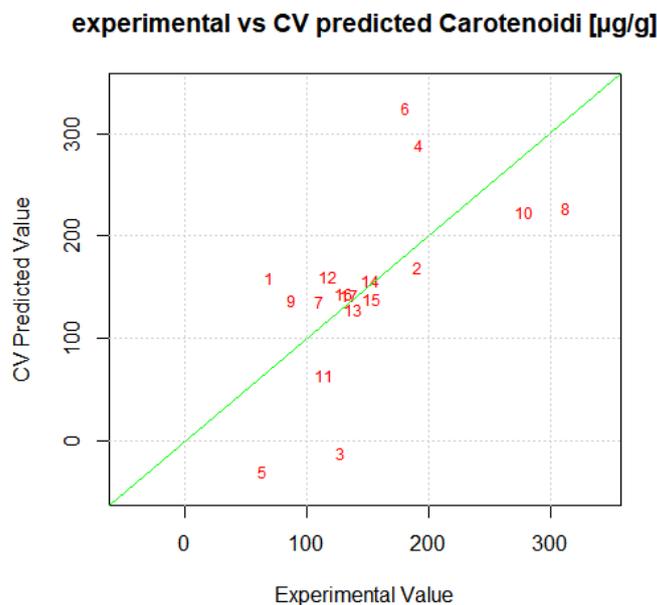


Figura 3.16 Grafico dei valori sperimentali vs valori predetti dalla CV, ottenuto mediante CAT

Osservando nel complesso i risultati del DOE considerando tre diverse variabili influenti sull'estrazione dei carotenoidi dalla biomassa, si deduce che il modello ottenuto è poco accurato poiché i risultati sperimentali si allontanano notevolmente dalla sua previsione. Per migliorarne l'accuratezza sono stati rifatti gli esperimenti che più si allontanano dalla retta ma i risultati restano molto simili ai precedenti. Un'altra possibilità prevede di scartare le interazioni tra le variabili poco rilevanti sulla risposta, si osserva che eliminando l'interazione del rapporto B/S con sé stesso la previsione del modello tende ad essere più accurata ma il rapporto B/S continua a non essere rilevante sulla risposta. Per cui, in accordo con la **Figura 3.13** si fa un nuovo DOE, questa volta considerando soltanto le due variabili più rilevanti così da ottenere un modello migliore del precedente.

3.4.2 DOE a 2 variabili

In **Tabella 3.17** sono riportate le rese estrattive, in termini di contenuto di carotenoidi, degli esperimenti imposti dal DOE a 2 variabili. Le corrispondenti condizioni operative sono riportate in **Tabella 2.5**.

Tabella 3.17 Risultati degli esperimenti previsti dal DOE a 2 variabili

Exp. No.	T [°C]	t [min]	µg/g peso secco
1	1	1	206,80
2	1	-1	162,86
3	1	0	193,52
4	-1	1	138,48
5	-1	0	114,38
6	-1	-1	69,60
7	0	1	177,49
8	0	-1	143,99
9	0	0	140,90
10	0	0	143,32
11	0	0	152,94
12	1	1	194,60
13	1	-1	153,38
14	-1	1	128,15
15	-1	-1	63,33
16	0	0	129,29

Da una prima analisi dei risultati è possibile affermare che le rese di carotenoidi migliori si registrano nel 1° esperimento, caratterizzato dai massimi valori di temperatura e tempo di estrazione. Si osserva un andamento positivo per tutte le variabili predittive: la variazione dei fattori dal livello -1 a quello +1 è sempre legata ad un incremento della risposta del sistema. Basti notare la differenza dei risultati ottenuti nel 1° e nel 6° esperimento, condotti con temperatura e tempo rispettivamente ai valori massimi e minimi. Infatti, la resa estrattiva registrata nell'esperimento numero 6 risulta visibilmente inferiore a quella del 1°, dimostrando quanto detto precedentemente.

3.4.1 Elaborazione modello del DOE a 2 variabili

Come mostrato in precedenza, per l'interpretazione dei risultati ottenuti dal DOE si usa il modello MLR che si focalizza sulla determinazione della relazione matematica tra la variabile di risposta, il contenuto di carotenoidi, e più predittori (T, t). Il modello scelto considera tutte le possibili interazioni tra le variabili, come si osserva in **Figura 3.17**.

	Tempe	tempo
Tempe	1	1
tempo		1

Figura 3.17 Interazioni considerate per il modello del DOE a 2 variabili

Il modello usato per approssimare i dati sperimentali è il seguente:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2 \quad (3.3)$$

dove: β_0 = intercetta del modello
 x_1 = valore in °C della temperatura di estrazione
 x_2 = durata espressa in minuti dell'estrazione

In **Tabella 3.18** si riportano i coefficienti della funzione espressa in (3.3).

Tabella 3.18 Coefficienti del modello del DOE a 2 variabili

	Coefficienti	Dev. St.	Coefficienti Interazione	p-value
β_0	147,69	5,48	12,21	0
β_1	39,72	3,83	8,54	0
β_2	25,24	3,83	8,54	0
β_{11}	-5,89	7,08	15,77	0,42
β_{22}	0,89	7,08	15,77	0,90
β_{12}	-6,07	4,28	9,55	0,19

Dopo la sostituzione dei coefficienti nell'equazione del modello (3.3), assume la seguente forma (3.3 b):

$$y = 147,69 + 39,72 x_1 + 25,24 x_2 - 5,89 x_1^2 + 0,89 x_2^2 - 6,07 x_1 x_2 \quad (3.3 b)$$

La varianza sperimentale è pari a 90% quindi l'incertezza del risultato sperimentale in specifiche condizioni operative è ridotta, ovvero c'è replicabilità. Per quanto riguarda la varianza del modello, anche questa è dell'85%, indice del fatto che il modello è in grado di prevedere in maniera accurata la risposta del sistema alle diverse condizioni operative.

Si procede osservando i grafici del modello predittivo MLR. Nuovamente si parte analizzando i coefficienti del modello. Come si nota in **Figura 3.18**, nel DOE a due variabili sia la temperatura che il tempo di estrazione risultano rilevanti sulla concentrazione di carotenoidi estratta. Le interazioni tra le variabili invece non influiscono sulla risposta.

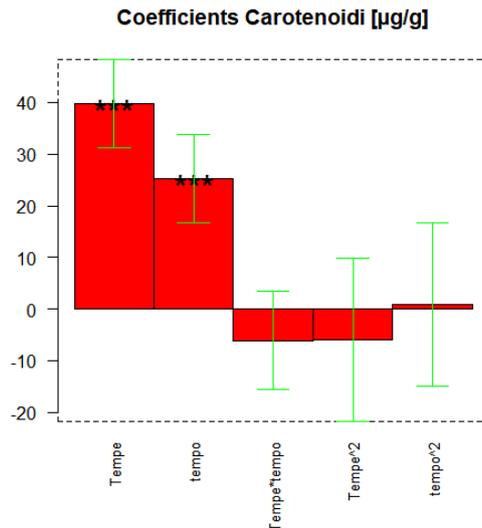


Figura 3.18 Grafico dei coefficienti della funzione (3.3), ottenuto mediante CAT

Si analizza anche la dispersione dei residui rispetto al modello prescelto. I residui corrispondono alle differenze tra i valori osservati sperimentalmente e i valori stimati con l'equazione di regressione (3.2). La retta di regressione rappresenta una semplificazione della realtà e riesce a cogliere la variabilità dei dati solo per il 90,83%. La parte di variabilità che il modello non riesce a spiegare costituisce il residuo della regressione. In **Figura 3.19** si osserva come i residui siano ben dispersi rispetto alla linea dei residui con media zero, indice di omogeneità e linearità. In tal modo non è possibile prevedere il valore del residuo, di conseguenza viene confermato il buon potere predittivo del modello scelto.

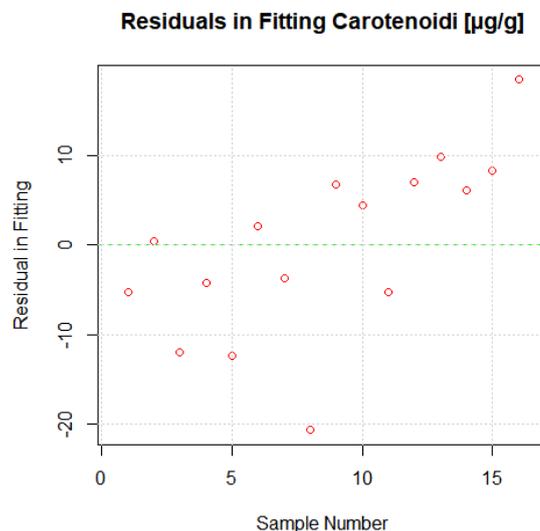


Figura 3.19 Grafico dei residui rispetto al modello di regressione MLR, ottenuto mediante CAT

Infine, si valuta la disposizione dei valori sperimentali dei 16 esperimenti previsti dal DOE rispetto ai valori fittati dal modello MLR. In **Figura 3.20** si osserva come tutti gli esperimenti condotti, indicati con il numero rosso, si trovano molto vicini alla stima dell'equazione di regressione rappresentata dalla linea verde, confermando l'accuratezza del modello.

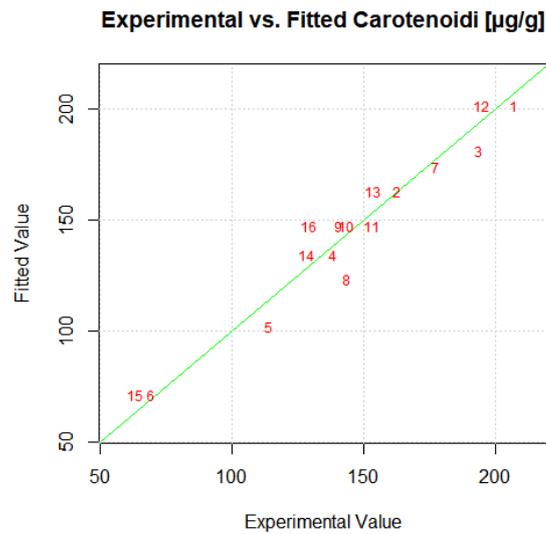


Figura 3.20 Grafico dei valori sperimentali vs valori fittati dal modello, ottenuto mediante CAT

La stabilità del modello di regressione è valutata con la Cross Validation (CV). Si confrontano la **Figura 3.20** con la **Figura 3.21**, la CV non riporta eccessivi allontanamenti dei valori sperimentali dalla retta di regressione. Il software riporta anche l'errore quadratico medio del CV (RMSECV) pari a 15,44, piuttosto basso che conferma la buona accuratezza.

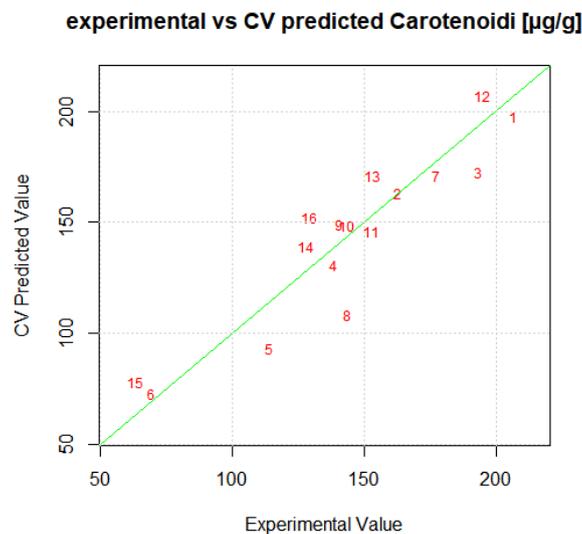


Figura 3.21 Grafico dei valori sperimentali vs valori predetti dalla CV, ottenuto mediante CAT

In **Figura 3.22** vengono mostrati i grafici dei residui, rispettivamente, dei valori sperimentali e dei numeri degli esperimenti, relativamente al modello predetto con CV. La dispersione dei residui è più o meno casuale indice che la linearità è rispettata, si tratta di un'ulteriore conferma della corretta predizione del modello.

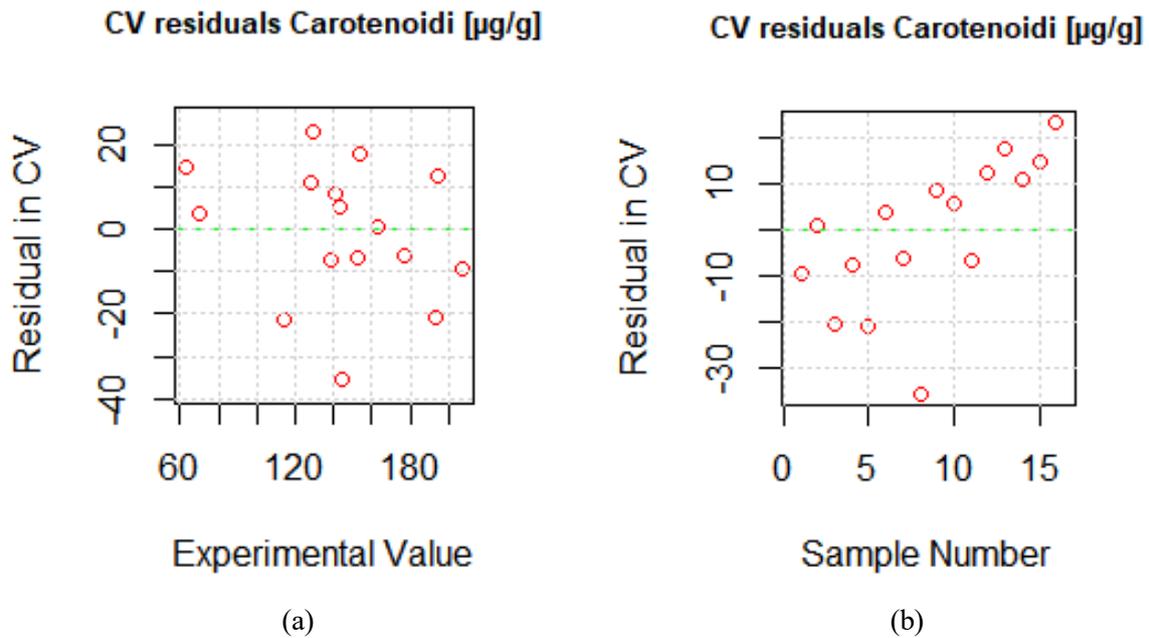


Figura 3.22 Grafico rispetto al modello predetto con CV: (a) dei residui dei valori sperimentali, (b) del numero degli esperimenti, ottenuto mediante CAT

3.4.2 Superfici di risposta del DOE a 2 variabili

La metodologia della superficie di risposta (RSM) descrive il comportamento di un set di dati con l'obiettivo di effettuare delle previsioni statistiche. In particolare, la RSM è usata per approfondire l'influenza di ciascuna variabile predittiva sulla risposta del sistema. Lo scopo è quello di individuare graficamente i valori delle variabili che contemporaneamente sono in grado di realizzare la migliore prestazione del processo estrattivo.

Ricapitolando, i 2 predittori (T, t) e i 3 livelli di variazione (-1, 0, 1) hanno suggerito di adottare un design CCF, come si evince in **Figura 2.16**. Sulla base dei risultati ottenuti dal DOE, si è adattata una funzione matematica che descrive la relazione che intercorre tra i predittori e la risposta del sistema. Solo in seguito alla convalida del modello predittivo MLR, tramite lo studio della sua idoneità e accuratezza nel fare previsioni in relazione ai dati sperimentali ottenuti, è possibile sfruttare il metodo RSM. I grafici generati dal modello sono in grado di indicare le condizioni ottimali di estrazione.

Il leverage, detto anche effetto leva, aiuta a identificare i punti sperimentali che hanno un effetto maggiore sulla regressione. Infatti, noto il valore di leverage, si ricava la precisione della stima fatta dal modello per una specifica risposta del sistema con la formula (3.4).

$$\text{varianza della stima} = \text{leverage} \cdot \text{varianza sperimentale} \quad (3.4)$$

Il leverage è associato a specifiche condizioni di temperatura e tempo ma dipende anche dal numero degli esperimenti che si andranno a fare. Più alto è maggiore sarà la deviazione standard associata alla stima del modello, quindi, la stima sarà meno accurata.

In **Figura 3.23** si rappresenta il leverage in due modi differenti: nella figura (a) si riporta la relativa mappa topografica dove le linee continue rappresentano l'insieme dei punti per i quali

esso ha valore costante e pari a quello associato all'isocurva, mentre nella figura (b) si riporta come superficie composta da diverse bande colorate, ciascuna delle quali corrisponde a specifici valori di leverage.

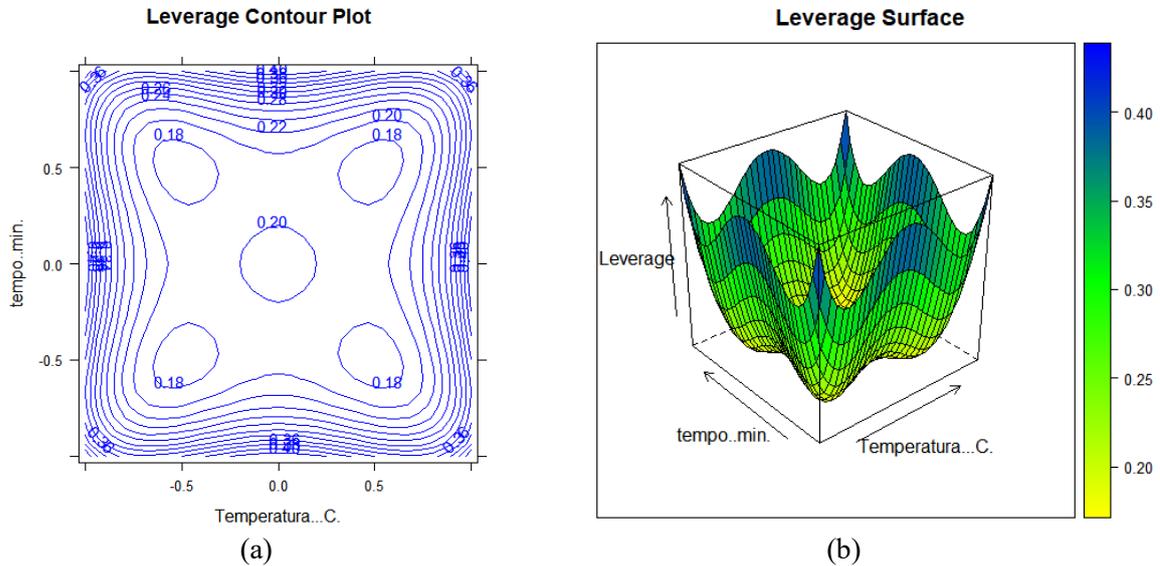


Figura 3.23 Leverage degli effetti di interazione tra T e t sul contenuto di carotenoidi: (a) Contour plot, (b) Grafico 3D, ottenuto mediante CAT

L'intervallo di confidenza, riportato in **Figura 3.24**, è la probabilità che la vera risposta del sistema cada nell'intervallo di confidenza individuato dal modello. Dipende dal numero di variabili predittive considerate e quindi dal numero di gradi di libertà.

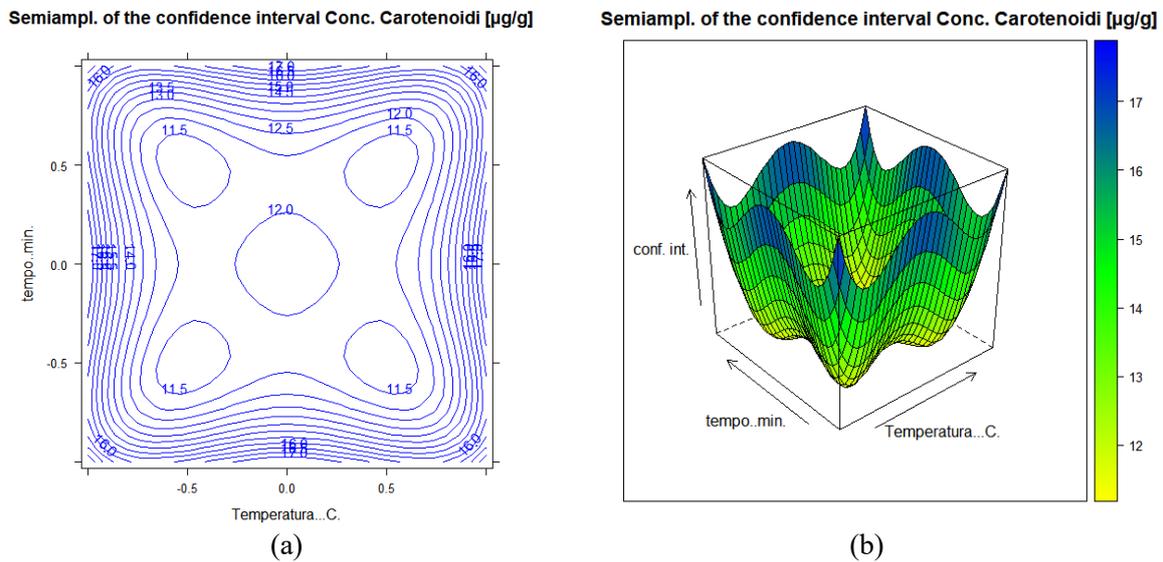


Figura 3.24 Intervallo di confidenza degli effetti di interazione tra T e t sul contenuto di carotenoidi: (a) Semiamplitude plot, (b) Grafico 3D, ottenuto mediante CAT

Il risultato finale del modello è una superficie in cui ciascun colore rappresenta un differente contenuto di carotenoidi nel sistema. La risposta della variabile x_1 dipende dal livello della

variabile x_2 e viceversa. È possibile fare il grafico del contour, in **Figura 3.25**, che riporta i risultati in una mappa topografia con curve iso-carotenoidi.

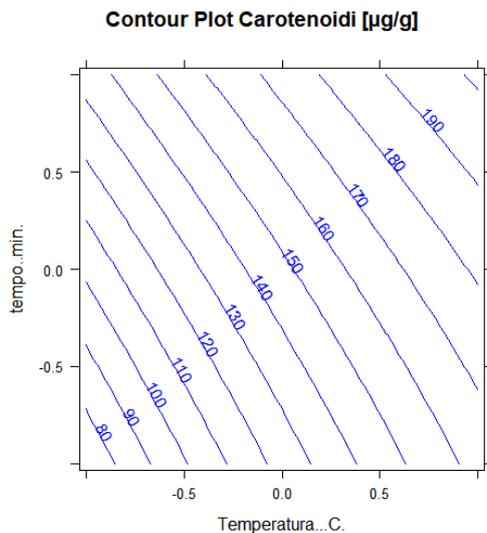


Figura 3.25 Contour plot degli effetti di interazione tra T e t sul contenuto di carotenoidi, ottenuto mediante CAT

La stessa risposta si illustra nel grafico 3D-RSM, in **Figura 3.26**, che evidenzia la risposta del sistema al variare della temperatura e del tempo di estrazione. Si nota che sia la temperatura che il tempo sono rilevanti sull'estrazione.

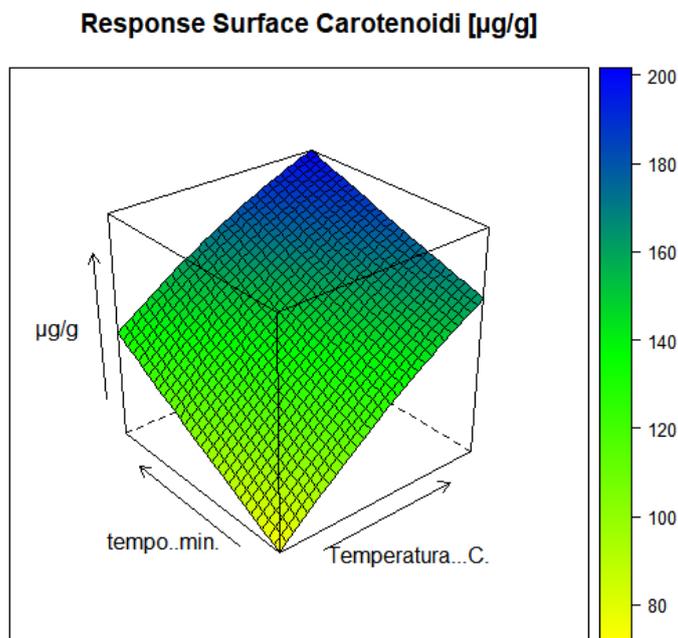


Figura 3.26 Grafico 3D-RSM degli effetti di interazione tra T e t sul contenuto di carotenoidi, ottenuto mediante CAT

Dalla **Figura 3.26** si possono individuare le condizioni operative ottimali corrispondenti al punto in cui la response surface raggiunge il suo punto massimo. Il massimo di carotenoidi,

espresso in $\mu\text{g/g}$, si colloca in prossimità dei valori estremi del diagramma, corrispondenti rispettivamente a 65°C e 50 min. La scelta del rapporto biomassa/solvente, come detto in precedenza, non è rilevante sull'estrazione. Non è possibile fare un confronto con la letteratura, si possono però fare delle considerazioni teoriche sull'estrazione da matrice. L'estrazione è di solito favorita:

- Ad alte temperature in quanto migliorano l'efficienza del contatto tra la biomassa e il solvente;
- Per un lungo tempo di estrazione in modo che il solvente abbia a disposizione tutto il tempo necessario per raggiungere la matrice della biomassa, qualora la resa ottimale fosse raggiunta in tempi brevi significherebbe che il composto target risulta facilmente solubile nel solvente;
- Con un basso rapporto biomassa/solvente perché in proporzione c'è una maggiore differenza di concentrazione iniziale che favorisce e aumenta la velocità del trasferimento di massa dei carotenoidi nel solvente, al contrario se ci fosse più biomassa l'estrazione sarebbe sfavorita in quanto il solvente raggiunge rapidamente la condizione di saturazione con i carotenoidi estratti rallentando di conseguenza la velocità di diffusione. [15]

Nel caso specifico dei DES l'estrazione riporta rese maggiori per elevate temperature in quanto il solvente è molto viscoso e in tali condizioni la viscosità si riduce aumentando la capacità del DES di penetrare nella matrice vegetale. È importante però fissare delle temperature limite per evitare l'eventuale degradazione dei composti di interesse, nel caso studiato i carotenoidi ne risultano suscettibili.

In **Tabella 3.19** vengono riassunte le condizioni ottimali ricavate dall'attività sperimentale, utili a massimizzare il quantitativo di polifenoli totali recuperati dal processo estrattivo. Queste condizioni sono applicate per condurre le analisi sperimentali successive.

Tabella 3.19 Condizioni operative ottimali del processo estrattivo

CONDIZIONI OPERATIVE OTTIMALI		
Temperatura	Tempo	B/S
65 °C	50 min	1:10

3.4.1 Predizione del DOE a 2 variabili

Seppur si abbiano sufficienti dati a sostegno della buona accuratezza del modello ottenuto, si conduce un'ulteriore prova a sostegno. La predizione prevede che si faccia un triplicato nelle condizioni in cui è stata ottenuta la miglior risposta del sistema riportate in **Tabella 3.19**. Ottenuti i risultati della predizione, questi sono trascritti in un file Excel riportante le condizioni e la risposta del sistema e poi caricati sul software CAT.

Come è stato spiegato in precedenza, il software ottiene un modello che prevede i risultati del sistema a diverse condizioni operative. Quindi, note le condizioni di estrazione della predizione, il modello calcola quanto dovrebbe essere la risposta. In particolare, fornisce un risultato preciso di essa associato a una deviazione standard. Affinché il modello risulti validato, è

fondamentale che i risultati sperimentali della predizione si trovino nel range indicato dal modello.

In **Tabella 3.20** si riporta la previsione del modello e i risultati sperimentali della predizione.

Tabella 3.20 Predizione del DOE a 2 variabili

	$\mu\text{g/g}$ peso secco
Previsione modello	$201,58 \pm 17,89$
Predizione sperimentale	194,60
	206,27
	208,78

Si osserva che i valori sperimentali della predizione si avvicinano notevolmente alla stima fatta dal modello di regressione MLR in quelle specifiche condizioni di estrazione, come mostrato anche in **Figura 3.27 (a)**. Infatti, il modello prevede che il contenuto di carotenoidi, per quelle specifiche condizioni operative, si trovi in un range di valori caratterizzato dai limiti inferiore pari a $183,69 \mu\text{g/g}$ e superiore di $219,47 \mu\text{g/g}$.

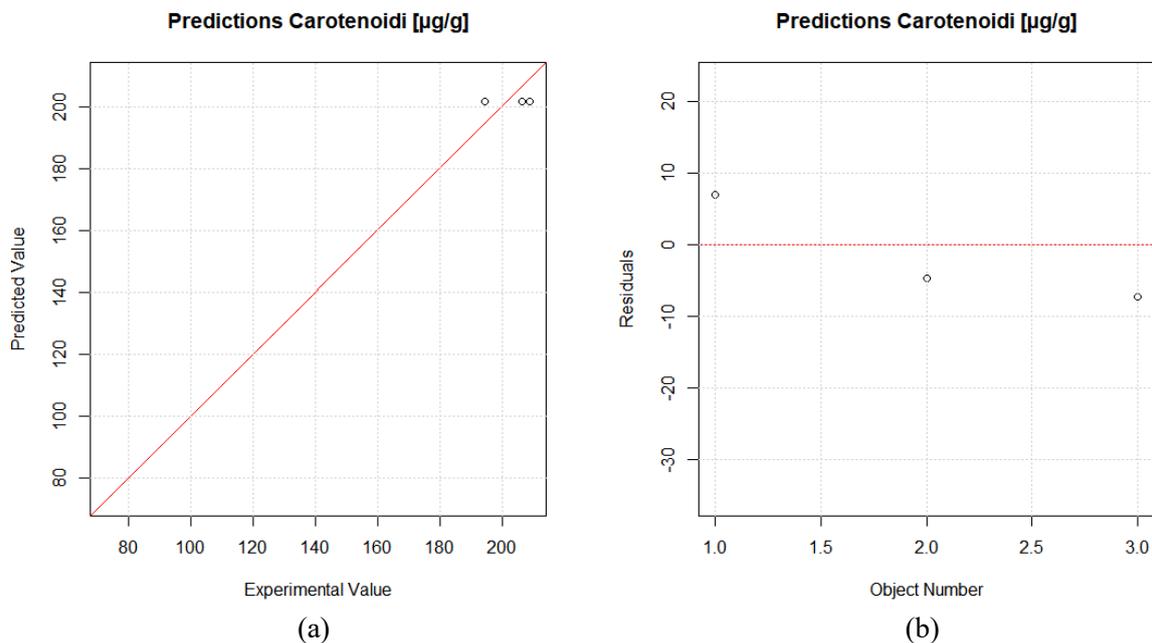


Figura 3.27 Grafico rispetto al modello di regressione MLR: (a) dei valori di predizione, (b) dei residui dei valori di predizione, ottenuto mediante CAT

Osservando poi il grafico dei residui in **Figura 3.27 (b)**, si può affermare che i valori sperimentali di predizione rientrano nel range di variabilità previsto dal modello MLR pari a $\pm 17,89 \mu\text{g/g}$.

Guardando nel complesso i risultati del DOE e la predizione sopra riportati, è possibile affermare che il modello ottenuto con il DOE a 2 variabili è in grado di prevedere in maniera

ottimale la risposta del sistema al variare delle condizioni di estrazione. Si procede quindi con lo studio delle superfici di risposta.

3.5 Estrazione nelle condizioni migliori del DOE

Si confrontano i risultati delle estrazioni di carotenoidi dagli scarti di pomodoro nelle migliori condizioni individuate dal DOE, riportate in **Tabella 3.19**, utilizzando diversi solventi, come spiegato nel paragrafo 2.7. In particolare, si paragonano le capacità estrattive del migliore DES con quelle dei solventi organici, conosciuti come i migliori solventi in quanto di solito garantiscono rese estrattive massime. Come solventi organici si scelgono l'acetone e l'etere di petrolio. In **Tabella 3.21** si riportano i risultati delle estrazioni condotte.

Tabella 3.21 Confronto DES – solventi organici

	$\mu\text{g/g}$ peso secco	\pm SD
DES 1 rapporto molare 1:2	204,11	6,43
Acetone	112,79	0,06
Etere di petrolio	73,05	6,58

Confrontando le rese dei due solventi organici utilizzati si nota che l'acetone riesce ad estrarre molti più carotenoidi dell'etere di petrolio. Ciò ricondurrebbe ad una maggiore affinità dei carotenoidi con l'acetone e a una sua diffusione più efficace nella matrice.

Valutando invece le capacità estrattive dei DES si osserva che, nelle medesime condizioni operative, i solventi organici sono in grado di estrarre soltanto una piccola frazione di carotenoidi. Infatti, la resa di estrazione dell'etere di petrolio è del 36,8% mentre quella dell'acetone è pari a 56,8% confrontate a quella ottenuta con il DES. È sorprendente che i Deep Eutectic Solvent siano non solo solventi sostenibili, sicuri e a basso costo, ma anche capaci di garantire rese più elevate dei solventi abitualmente utilizzati. Questa singolare particolarità è stata osservata anche in letteratura, infatti, si riporta che in numerosi casi di estrazione i DES di origine naturale abbiamo riscontrato rese superiori a quelle ottenute con i solventi organici convenzionali. [77]

3.6 Cinetica di estrazione

Lo studio cinetico è condotto nelle condizioni ottimali di estrazione individuate dal DOE e riportate in **Tabella 3.19**. Lo scopo è valutare la variazione del contenuto di carotenoidi nell'estratto in funzione del tempo di estrazione. Si conducono tante estrazioni quanti sono i tempi di analisi secondo le indicazioni del paragrafo 2.8. In **Tabella 3.22** sono riportati i risultati ottenuti in termini di carotenoidi.

Tabella 3.22 Risultati studio di cinetica di estrazione

Tempo	$\mu\text{g/g}$ peso secco	\pm SD
1	41,32	27,84
10	97,89	19,02
20	117,36	50,98
40	120,47	14,54
60	163,54	38,08
90	190,70	28,21
120	262,08	6,42
180	313,42	52,22
240	310,81	105,70
300	300,82	12,97

Come previsto si nota che all'aumentare della durata di estrazione, il DES riesce ad estrarre un maggior contenuto di carotenoidi dalla matrice. Questo è osservabile anche ad occhio prestando attenzione al colore assunto dal surnatante, infatti, all'aumentare del tempo di estrazione esso mostra un colore dal giallo al rosso acceso segno di un maggior contenuto di carotenoidi, come riportato in **Figura 3.29**.



Figura 3.28 Campioni utilizzati per lo studio cinetico di estrazione

In **Figura 3.30** sono diagrammati i risultati sperimentali ottenuti con le relative deviazioni standard, dall'unione dei punti si ottiene una curva crescente che raggiunge una condizione di saturazione, ovvero la risposta del sistema tende a stabilizzarsi passato un certo tempo. Il contenuto di carotenoidi diventa costante dopo 3 ore di estrazione. Inoltre, è possibile anche constatare che dopo 5 ore di estrazione il contenuto di carotenoidi inizia lentamente a scendere probabilmente a causa dell'innescarsi dei fenomeni degenerativi che interessano i carotenoidi quando si raggiungono elevate temperature per lungo tempo.

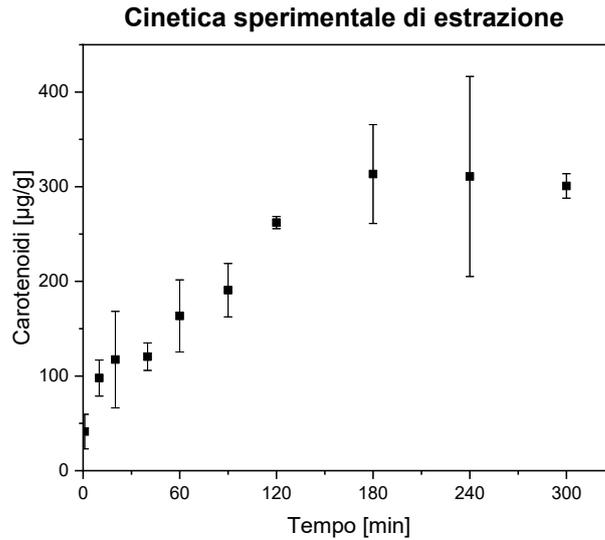


Figura 3.29 Curva cinetica di estrazione sperimentale

3.6.1 Modello di Peleg

Noti i dati sperimentali si cerca di rappresentarli con il modello di Peleg, un modello matematico che fornisce una curva cinetica teorica in grado di prevedere i risultati del sistema in funzione del tempo di estrazione.

Il modello di Peleg è espresso dall'equazione (2.15 b), in particolare, il contenuto di carotenoidi nel tempo è funzione delle costanti di Peleg: la costante di velocità k_1 e la costante di capacità k_2 . Queste devono essere ricavate dall'interpolazione lineare dei dati sperimentali riportata in **Figura 3.31**.

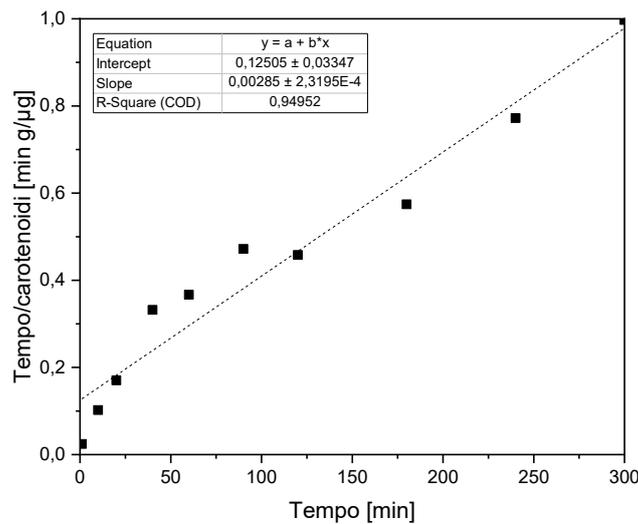


Figura 3.30 Linearizzazione dei dati sperimentali di cinetica per la determinazione delle costanti di Peleg

La costante di velocità di Peleg k_1 è l'intercetta della retta interpolante i dati sperimentali mentre la costante di capacità di Peleg k_2 corrisponde alla pendenza di essa, esse sono definite in **Tabella 3.23**.

Tabella 3.23 Costanti del modello di Peleg

Costanti di Peleg	
$k_1 \left[\frac{\mu g \cdot min}{g \text{ peso secco}} \right]$	$k_2 \left[\frac{\mu g}{g \text{ peso secco}} \right]$
0,1251	0,0029

Nota le costanti di Peleg è possibile ricavare dalla relazione (2.16) la velocità di estrazione iniziale $B_0=8,00 \text{ g}/(\mu\text{g min})$ e dalla funzione (2.17) la concentrazione di equilibrio dei carotenoidi $C_e= 350,88 \mu\text{g/g}$.

Sostituendo poi le costanti di Peleg nell'equazione (2.15 b), si ottiene il modello di Peleg dell'estrazione in esame espresso dalla relazione (3.5):

$$C(t) = \frac{t}{0,1251+0,0029 \cdot t} \quad (3.5)$$

Infine, è possibile diagrammare la concentrazione di carotenoidi nell'estratto in funzione del tempo, confrontando la curva cinetica teoria ottenuta a partire dal modello di Peleg con i dati sperimentali come mostrato in **Figura 3.32**.

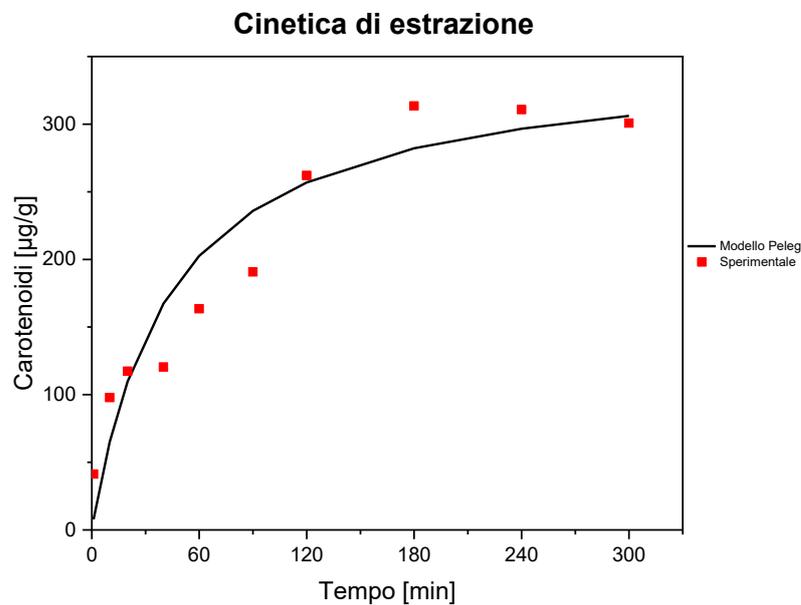


Figura 3.31 Modello di Peleg vs cinetica sperimentale

Osservando la **Figura 3.34** si nota come il modello di Peleg sia in grado di rappresentare bene i dati sperimentali, seppur alcuni di essi si distanziano abbastanza dalla curva teorica.

3.7 Caratterizzazione dell'estratto

Per quantificare i composti analizzati all'HPLC sono necessari i relativi standard in cui il composto è disciolto nel solvente utilizzato per l'estrazione, ma poiché il solvente utilizzato è un DES, risultano impossibili da reperire in commercio. È quindi necessario produrre gli standard del licopene e del β -carotene e analizzarli per ricavare la retta di taratura dei singoli composti. Per fare gli standard si segue la procedura indicata al paragrafo 2.9.1.

3.7.1 Retta di taratura del β -carotene per l'HPLC

Per calcolare la concentrazione del β -carotene nel campione è necessaria la retta di taratura, in **Tabella 3.24** sono riportate le caratteristiche degli standard utilizzati.

Si analizzano all'HPLC gli standard preparati così da ricavare l'area del picco corrispondente e valutare il tempo di ritenzione. La lettura dei picchi è fatta alla lunghezza d'onda di 450 nm.

Tabella 3.24 Standard usati per la retta di taratura del β -carotene

Standard	Concentrazione [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Area del picco
A	0,124	4921909
B	0,062	2022293
C	0,0124	242482
D	0,0062	144354
E	0,00062	15240

Il tempo di ritenzione in colonna del β -carotene disciolto nel DES è pari a 3,2 minuti.

I risultati ottenuti sono diagrammati riportando sull'asse delle ascisse la concentrazione dello standard e sulle ordinate l'area del picco osservato, si fa poi l'interpolazione lineare dei dati imponendo il passaggio per l'origine come mostrato in **Figura 3.33**. Sono esclusi gli standard A e B in quanto si discostano dalla linea di tendenza ottenuta.

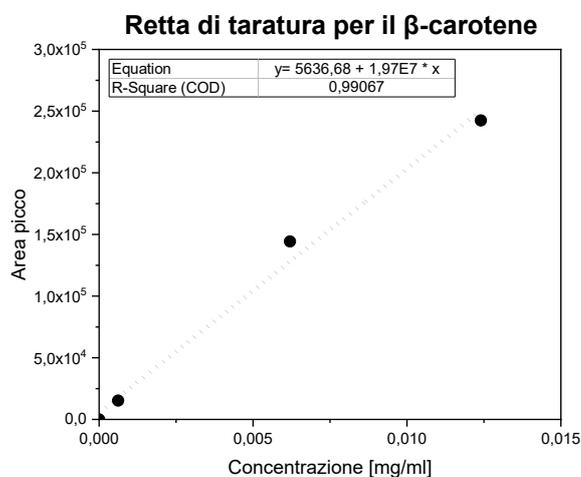


Figura 3.32 Retta di taratura per la quantificazione del contenuto di β -carotene

R-Square (R^2) è una misura utilizzata in statistica che rappresenta la varianza per una variabile dipendente che viene influenzata da una o più variabili indipendenti in un modello di regressione. Il valore di R^2 della retta di taratura considerata è praticamente unitario quindi l'interpolazione dei dati sperimentali con la retta è ottima. Si osserva che all'aumentare della concentrazione l'area del picco cresce. Infine, si usa l'equazione (2.14) per calcolare il contenuto di β -carotene nel campione dove:

$$A_{intercept} = 5636,68$$

$$S_{std} = 1,97 \cdot 10^7$$

Il β -carotene è quantificato con l'equazione (3.6):

$$\text{Concentrazione } \beta - \text{ carotene } \left[\frac{\mu g}{g} \right] = \frac{(A_{sample} - 5636,68) \cdot V_{sample}}{1,97 \cdot 10^7 \cdot w_{sample}} \quad (3.6)$$

3.7.2 Retta di taratura del licopene per l'HPLC

Per calcolare la concentrazione del licopene nel campione è necessaria la retta di taratura, in **Tabella 3.26** sono riportate le caratteristiche degli standard utilizzati.

Dopo aver preparato gli standard, questi si analizzano all'HPLC per misurare l'area del picco corrispondente e valutare il tempo di ritenzione. La lettura dei picchi è fatta alla lunghezza d'onda di 450 nm.

Tabella 3.25 Standard usati per la retta di taratura del licopene

Standard	Concentrazione $\left[\frac{\mu g}{ml} \right]$	Area del picco
A	0,142	2500971
B	0,071	2082143
C	0,0142	338933
D	0,0071	103774
E	0,00071	8231

Il tempo di ritenzione in colonna del licopene disciolto nel DES è pari a 2,4 minuti.

I risultati ottenuti sono poi riportati in un grafico in cui si ha sull'asse delle ascisse la concentrazione dello standard e sulle ordinate la rispettiva area del picco osservato, si trova la retta interpolante i dati sperimentali e passante per l'origine riportata in **Figura 3.34**. In questo caso, sono esclusi gli standard A e D in quanto non rispettano la linea di tendenza.

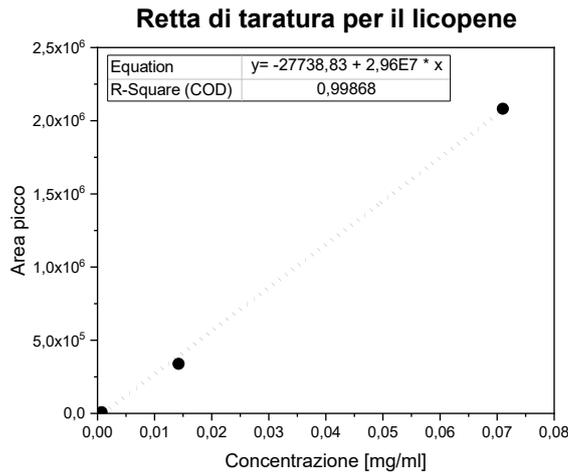


Figura 3.33 Retta di taratura per la quantificazione del contenuto di licopene

Il valore di R^2 trovato dalla retta di taratura è praticamente unitario quindi l'interpolazione dei dati sperimentali con la retta è ottima. Si osserva che all'aumentare della concentrazione l'area del picco cresce, stesso comportamento del β -carotene. Per calcolare il contenuto di licopene nel campione si usa l'equazione (2.14) dove:

$$A_{intercept} = -27738,83$$

$$S_{std} = 2,96 \cdot 10^7$$

Grazie alla formula (3.7) si quantifica il licopene:

$$\text{Concentrazione licopene} \left[\frac{\mu g}{g} \right] = \frac{(A_{sample} + 27738,83) \cdot V_{sample}}{2,96 \cdot 10^7 \cdot w_{sample}} \quad (3.7)$$

3.7.3 Analisi HPLC

Anche in questo caso è stato fatto il triplicato così da poter valutare la deviazione standard dei risultati, inoltre, ciascun campione è stato analizzato all'HPLC tre volte per limitare l'incertezza dei risultati.

Si riportano in **Tabella 3.26** i tempi di ritenzione in colonna dei composti analizzati:

Tabella 3.26 Tempi di ritenzione dei composti analizzati

Tempo di ritenzione [min]	
β -carotene	3,2
Licopene	2,4

Applicando rispettivamente le formule (3.6) e (3.7) si ricava il contenuto di β -carotene e di licopene nell'estratto ottenuto nelle condizioni ottimali di estrazione individuate dal DOE, i risultati sono riportati in **Tabella 3.27**.

Tabella 3.27 Contenuto di licopene e β -carotene

	$\mu\text{g/g}$ peso secco	\pm SD
β-carotene	23,65	4,87
Licopene	52,38	12,05

Non è possibile confrontare i risultati ottenuti con la letteratura poichè il processo estrattivo e le tecniche di analisi sono troppo diverse tra loro. In generale il contenuto di licopene è sempre superiore a quello del β -carotene.

4 Analisi e sviluppi futuri

4.1 Determinazione potere antiossidante dei carotenoidi

Per valutare l'attività antiossidante si usa il saggio DPPH sviluppato da Blois nel 1958. È un metodo rapido, semplice, economico e diffuso per misurare la capacità dei composti di agire come antiradicali liberi o donatori di idrogeno e per analizzare l'attività antiossidante di alimenti, sistemi biologici complessi, campioni solidi o liquidi.

Il saggio si basa sull'utilizzo del DPPH, termine che indica il composto organico 2,2-difenil-1-picrilidrazil, un radicale azotato in forma solida. Si tratta di un radicale libero stabile grazie alla delocalizzazione dell'elettrone libero sulla molecola, evitando la dimerizzazione tipica della maggior parte dei radicali liberi. Il DPPH appare di colore viola, la cui intensità aumenta a causa della delocalizzazione. Il radicale si trova sempre in soluzione con l'etanolo. Si tratta di un test chimico che prevede di far reagire il campione da analizzare con una soluzione di DPPH, se nel campione sono presenti composti antiossidanti essi trasferiscono un atomo di idrogeno al radicale con conseguente passaggio del radicale alla sua forma ridotta DPPH-H. La colorazione della soluzione etanolica di DPPH passerà dal viola al giallo-incolore quando il radicale ha esplicato la propria azione scavenger (catturante) di radicali. Maggiore è l'effetto decolorante più alta è la carica antiossidante. [78]

Si prepara la soluzione 0,1 mM di DPPH in etanolo e si misura l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 517 nm con lo spettrofotometro. Per ciascun campione si miscelano 3 ml della soluzione etanolica di DPPH con 300 mg di estratto e 7 ml di etanolo. Il campione è poi conservato al buio per 30 minuti a temperatura ambiente. Infine, è analizzato allo spettrofotometro per valutarne l'assorbanza. [38]

Per valutare l'attività antiossidante si applica la formula (4.1):

$$\text{Attività antiossidante (\%)} = \frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}} \cdot 100 \quad (4.1)$$

dove: $A_{control}$ = assorbanza iniziale della soluzione DPPH
 A_{sample} = assorbanza del campione

4.2 Separazione DES

I solventi utilizzati per le estrazioni sono dei DES, ovvero liquidi eutettici sostenibili. Come tali riportano le stesse caratteristiche dei liquidi ionici che risultano essere i più comuni solventi "switchable", ovvero solventi commutabili in grado di cambiare forma e proprietà a seconda degli stimoli esterni quali temperatura, pH o pressione. I cambiamenti nelle loro proprietà fisiche e chimiche sono reversibili. I solventi commutabili possono essere classificati in due categorie principali: liquidi ionici reversibili (RIL) e solventi a polarità commutabile (SPS). In particolare, gli SPS sono solventi che possono cambiare il proprio stato da polare a non polare, o viceversa, in risposta a uno stimolo, l'inversione di polarità può essere utilizzata per estrarre o dissolvere selettivamente diversi tipi di molecole. Grazie al potenziale degli acidi grassi, i DES utilizzati in questo studio sono in grado di agire come solventi switchable per separare i carotenoidi dell'estratto. [79]

Si illustra di seguito alcune tecniche che consentono di separare i carotenoidi ottenuti dal solvente di estrazione a partire dal surnatante. Si fa l'estrazione rispettando le indicazioni del protocollo estrattivo illustrato al paragrafo 2.5 e terminata si preleva il surnatante. Ad esso si aggiungono 2 ml di acqua distillata per ottenere due fasi distinte a causa delle diverse polarità, infatti, l'acqua è ovviamente polare al contrario del surnatante che contenendo il DES risulta apolare. Si aggiunge in eccesso al surnatante una soluzione di ammoniaca al 25% (w/v) con un rapporto molare pari a 1:13, l'ammoniaca aumenta il pH innescando il cambiamento di polarità dell'estratto di DES. È importante mescolare la soluzione fino ad ottenere un'unica fase idrofilica avente singola polarità. Si conserva poi la soluzione al buio per 72 ore a temperatura ambiente, in questo periodo di tempo si verifica la precipitazione dei carotenoidi dovuta alla loro insolubilità nelle soluzioni polari. Trascorso il tempo necessario, si centrifuga a 7000 rpm per 15 minuti per separare con facilità la porzione liquida da quella solida costituita dai carotenoidi. [32]

In alternativa, è possibile usare l'idrossido di ammonio al posto dell'ammoniaca. Si aggiunge all'estratto una soluzione di idrossido di ammonio al 25% con un rapporto molare 1:4 (NaDES:NH₄OH). L'idrossido di ammonio reagisce con gli acidi grassi costituenti il DES inducendone il cambio di polarità e ottenendo una sola fase idrofilica. La soluzione è immediatamente immersa in un bagno di ghiaccio per 2 minuti e poi è conservata al buio per 48 ore. Infine, si centrifuga la soluzione ottenuta così da far precipitare i carotenoidi e separarli dalla fase liquida tramite decantazione o filtrazione. [42]

Il solvente rimasto, che ha invertito la propria polarità, può ritornare a quella originaria e comportarsi come idrofobo, essendo, come detto prima, un processo reversibile. Oppure può essere utilizzato come tale per estrarre molecole idrofile dalla matrice di estrazione. Il processo inverso può essere innescato: gorgogliando CO₂, in quanto causa la dissociazione del complesso di coppie ioniche che si sono formate oppure agendo sulla temperatura. Infine, il solvente recuperato può essere riutilizzato per altre estrazioni di molecole idrofobiche, quali i carotenoidi, dagli scarti di pomodoro o applicazioni similari su altre matrici. [42]

Qualora l'obiettivo l'ottenimento del licopene puro sarebbe necessaria la sua separazione dagli altri carotenoidi estratti. Ciò è possibile con la cromatografia liquida come l'HPLC che separa le molecole grazie ai diversi tempi di ritenzione.

5 Conclusioni

La seguente attività sperimentale si è basata sull'estrazione di carotenoidi da sottoprodotti ottenuti dalla lavorazione del pomodoro. Questi definiti nel loro insieme "cascami" sono costituiti da bucce, semi e frutti scartati. In particolare, si è valutato il contenuto nutrizionale della biomassa utilizzata. L'attenzione del lavoro si è poi concentrata su soluzioni alternative agli abituali solventi organici utilizzati. Rivestono grande interesse i Deep Eutectic Solvent (DES), solventi sostenibili che permettono di rispettare i criteri di sostenibilità ambientale, energetica ed economica. Rispetto ai tradizionali solventi organici, i DES risultano non tossici e completamente biodisponibili e biodegradabili. I DES utilizzati durante questa attività hanno origine naturale in quanto sono sintetizzati da composti di origine naturale quali mentolo e diversi acidi grassi, per tale motivo si definiscono Natural Deep Eutectic Solvent. Dapprima sono analizzate le proprietà dei DES, in seguito si è ricercato quale DES tra quelli sintetizzati ha maggior capacità estrattiva. Il miglior solvente di estrazione è risultato essere la miscela mentolo – acido butirrico nel rapporto molare 1:2. Si sono poi valutati i parametri operativi che consentono di isolare il più grande quantitativo di carotenoidi. L'individuazione delle condizioni ottimali quali temperatura, tempo e rapporto biomassa/solvente è avvenuta tramite l'impiego di un disegno sperimentale. Il Design Of Experiment (DOE) è risultato essere uno strumento affidabile e completo, esso presenta molteplici vantaggi, tra cui la possibilità di studiare l'influenza sulla resa di più fattori contemporaneamente e stimare le loro interazioni, oltre che ottenere una grande quantità di informazioni da un numero ridotto di esperimenti. L'elaborazione dei risultati sperimentali è stata affidata al software Chemiometric Agile Tool (CAT) che, tramite l'impiego del modello Multiple Linear Regression (MLR), ha consentito di ricavare l'espressione matematica che lega la risposta del sistema alla terna di parametri analizzati. Questo modello è risultato accurato nel descrivere il caso studio in esame. Poiché il rapporto biomassa/solvente si è dimostrato poco influente sulla resa, si è ripetuto il DOE studiando la dipendenza della risposta del sistema soltanto da temperatura e tempo. Infine, l'applicazione della Response Surface Method (RSM) ha rivelato i valori dei parametri di interesse che massimizzano la resa estrattiva dei carotenoidi.

I risultati, come preannunciato poco prima, hanno indicato che la temperatura e tempo sono i fattori che più influenzano il contenuto di carotenoidi. A tal proposito i valori ottimali di estrazione individuati dal DOE sono 65 °C e 50 minuti. Il rapporto biomassa/solvente si è fissato a 1:10. In tali condizioni, il DES è in grado di estrarre $204,11 \mu\text{g/g} \pm 6,43$ su peso secco di carotenoidi. La caratterizzazione iniziale della matrice e dell'estratto ottenuto in seguito ha evidenziato livelli importanti di composti bioattivi. Nel pomodoro le sostanze di maggior interesse sono i carotenoidi, la loro attenzione ha origine da studi che dimostrano il loro effetto benefico sulla salute umana. Infatti, hanno importanti capacità coloranti e antiossidanti utili a rallentare l'evoluzione delle malattie cancerogene o cardiovascolari. In termini di potere antiossidante eccelle il licopene, un carotenoide presente in grandi quantità nel pomodoro che riporta numerose applicazioni. A tal proposito, mediante l'analisi HPLC, è stato valutato il contenuto di licopene nell'estratto, il cui risultato si è dimostrato essere il doppio del β -carotene, nel dettaglio sono stati individuati $23,65 \mu\text{g/g} \pm 4,87$ di β -carotene e $52,38 \mu\text{g/g} \pm 12,05$ di licopene. Il grande contenuto di licopene e le sue eccellenti proprietà antiossidanti favoriscono il riutilizzo di questo scarto prodotto in grande quantità per prodotti cosmetici, farmaceutici e nutraceutici. Inoltre, la facile reperibilità e il basso costo dei cascami di pomodoro favorisce il recupero dei carotenoidi da essi. Guardando alla sostenibilità nella scelta del solvente di

estrazione, la miscela mentolo-acido butirrico si è dimostrato essere più efficiente rispetto ai soliti solventi organici, infatti, il DES ha estratto $204,11 \mu\text{g/g} \pm 6,43$ di carotenoidi mentre nelle medesime condizioni operative l'acetone ha ottenuto $112,79 \mu\text{g/g} \pm 0,06$ e l'etere di petrolio soltanto $73,05 \mu\text{g/g} \pm 6,58$. Di conseguenza, i DES risultano essere la miglior scelta per questo tipo di estrazioni garantendo la sostenibilità, la biodegradabilità ed elevate rese. L'utilizzo dei DES permette di evitare la purificazione dell'estratto riducendo notevolmente i costi del processo. L'estratto contenente il DES ha origine naturale e per questo può essere utilizzato come tale nelle applicazioni successive. Nei prodotti cosmetici e nutraceutici l'estratto è utilizzato tal quale, per quanto riguarda invece l'utilizzo in campo farmaceutico è necessario investigare più a fondo per comprendere se la separazione del DES dai carotenoidi è obbligatoria. Attualmente i carotenoidi presenti sul mercato hanno costi elevati, il loro recupero in larga scala dai cascami di pomodoro consente di ridurre il prezzo aumentando l'offerta e allo stesso tempo di diminuire la quantità di rifiuti industriali garantendo numerosi benefici. La sostenibilità in questo caso ha dimostrato avere soltanto vantaggi ma sarebbe necessario fare uno studio più dettagliato sullo scale-up. La prospettiva futura di questo studio sperimentale si potrebbe concentrare sulla progettazione impiantistica con le relative rese industriali e consumi specifici e sull'analisi economica delle diverse applicazioni industriali dei carotenoidi. La vera sfida è quella di essere scrupolosi riguardo le scelte impiantistiche al fine di realizzare un impianto efficiente che, al contempo, abbia un basso impatto ambientale. Nonostante non sono stati condotti studi inerenti alla parte progettuale, si possono fare delle ipotesi riguardo la suddivisione delle sezioni dell'impianto. Si può pensare di dividere le operazioni in 4 settori: pretrattamento, sintesi del DES, estrazione, eventuale recupero dell'estratto ed applicazione dei carotenoidi. Nella sezione di pretrattamento vengono svolte le operazioni di separazione di eventuali impurità e di essiccazione dei cascami. Nella sezione di sintesi del DES si miscelano i costituenti nel rapporto desiderato per ottenere in grandi quantità di solvente di estrazione, questa risulta però una fase discontinua. Nella sezione di estrazione si punta ad osservare fedelmente quanto effettuato nelle prove sperimentali. Ad esempio, potrebbero essere previste apparecchiature in serie: estrattore, centrifuga, separatore delle due fasi. Ove necessario, nella sezione di recupero dell'estratto si allontana il solvente che è recuperato a valle, al fine di isolare l'estratto e destinarlo all'essiccazione finale. Nella sezione di applicazione dei carotenoidi questi sono utilizzati come materia prima per ottenere altri prodotti, se necessario con un cromatografo liquido si separano le singole sostanze. La progettazione dipende fortemente dall'obiettivo che si vuole raggiungere, cambiano infatti le apparecchiature e i controlli richiesti.

6 Riferimenti bibliografici

- [1] EUFIC, 2001, Le origini del pomodoro. <https://www.eufic.org/it/vita-sana/articolo/le-origini-del-pomodoro> ultima vista il 25/08/2023
- [2] Musei del cibo, La storia del pomodoro. <https://pomodoro.museidelcibo.it/informazioni-e-contatti/audioguida/storia-del-pomodoro/> ultima vista il 25/08/2023
- [3] AgroNotizie, a cura di L. Quadri, 2023, Tecnologie e meccanizzazione: i segreti del pomodoro da industria. <https://agronotizie.imagelinenetwork.com/agrimeccanica/2023/03/22/tecnologie-e-meccanizzazione-i-segreti-del-pomodoro-da-industria/78280#:~:text=La%20produzione%20si%20localizza%20principalmente,3%2C7%20miliardi%20di%20euro> ultima vista il 06/09/2023
- [4] FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, Crops and livestock products. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> ultima vista il 30/08/2023
- [5] Terra Orti, Prodotti Ortofrutticoli- Pomodoro da industria. <https://www.terraorti.it/portfolio-articoli/pomodoro-da-industria/#:~:text=Il%20pomodoro%20destinato%20alla%20trasformazione,facilit%C3%A0%20del%20distacco%20del%20frutto%2C> ultima vista il 06/09/2023
- [6] FOOD, 2023, Pomodoro da industria, produzione in Italia. <https://www.foodweb.it/2023/05/pomodoro-da-industria-produzione-in-aumento-in-italia/#:~:text=In%20Italia%2C%20terzo%20produttore%20al,5%2C5%20milioni%20di%202022> ultima vista il 30/08/2023
- [7] Fruit Journal, a cura di V. Fumarola, 2023, Pomodoro da industria: l'unione fa la forza. <https://www.fruitjournal.com/pomodoro-da-industria-lunione-fa-la-forza/> ultima vista il 30/08/2023
- [8] FOOD, 2023, Al via la campagna di trasformazione del pomodoro 2023. <https://www.foodweb.it/2023/08/al-via-la-campagna-di-trasformazione-del-pomodoro-2023/> ultima vista il 30/08/2023
- [9] ALSIA, a cura di L. Sportiello, 2022, Strategie di valorizzazione dei sottoprodotti dell'industria di trasformazione del pomodoro. *Agri foglio* **108**. <https://www.alsia.it/opencms/opencms/pdfink/en/d691a49a-8966-11ea-a0d6-97d1852e3443/Strategie-di-valorizzazione-dei-sottoprodotti-dellindustria-di-trasformazione-del-pomodoro.pdf>
- [10] URP (Unità Relazioni con il Pubblico) - CNR (Consiglio Nazionale delle Ricerche), a cura di ISPA (Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari) - Cantore V. I., Aumento del contenuto di licopene nel pomodoro da industria. https://www.urp.cnr.it/dedicato/ded_ambiente/pprodotta.php?prodotto=43 ultima vista il 30/08/2023
- [11] Chimichiamo, 2016, Carotenoidi: xantofille, caroteni. <https://www.chimichiamo.org/biochimica/carotenoidi/> ultima vista il 01/09/2023

- [12] Menaggia G. & Roncalli W., 2021, I carotenoidi. *L'industria agroalimentare seconda edizione* **1**, p. 57. https://online.scuola.zanichelli.it/industriagroalimentare2ed-files/approfondimenti/capitolo03/leggere-ebook/C3p57_Carotenoidi.pdf
- [13] The Wom Healthy, a cura di D. R. Gindro, 2023, Licopene:dove si trova oltre al pomodoro? A cosa serve? Benefici?. <https://healthy.thewom.it/integratori/licopene/> ultima vista il 01/09/2023
- [14] Chimichiamo, 2013, Licopene: proprietà, benefici. <https://www.chimicamo.org/biochimica/licopene/> ultima vista il 01/09/2023
- [15] Silva Y. P., Ferreira T. A., & Jiao G., 2019, Sustainable approach for lycopene extraction from tomato processing by-product using hydrophobic eutectic solvents. *Journal of Food Science and Technology* **56**(3), pp. 1649–1654. [DOI: 10.1007/s13197-019-03618-8]
- [16] Lazzarini C., Casadei E., Valli E., Tura M. & Ragni L., 2022, Sustainable Drying and Green Deep Eutectic Extraction of Carotenoids from Tomato Pomace. *Foods* **11**, p. 405. [DOI: 10.3390/foods11030405]
- [17] Sigma-Aldrich, SMB00706 Lycopene. <https://www.sigmaaldrich.com/IT/it/product/sigma/smb00706> ultima vista il 22/09/2023
- [18] CPS analitica for Chemistry, 2019, Estrazione e determinazione del licopene nelle bucce del pomodoro. http://www.cpsanalitica.com/download/soluzioni_cps/estrazione_determinazione_licopene_buccepomodoro.pdf
- [19] The Won Healthy, 2022, Carotene e betacarotene: integratori per l'abbronzatura. Funzionano? <https://healthy.thewom.it/integratori/carotene/#acosaserveleproprietdelbetacarotene> ultima vista il 01/09/2023
- [20] Chimichiamo, 2021, β -carotene: proprietà, preparazione, fabbisogno. <https://www.chimicamo.org/biochimica/%CE%B2-carotene/#preparazione> ultima vista il 01/09/2023
- [21] BIOACTIVE-NET, a cura di E. Casas, M. Faraldi & M. Bildstein, 2008, Guida pratica sui composti bioattivi ottenibili dai sottoprodotti della trasformazione del pomodoro. https://www.tecnoali.com/Prog%20area/Booklets/Booklet%20TOMATO_italian_2.pdf
- [22] Commissione europea, 1995, Direttiva 95/45/CE della Commissione, del 26 luglio 1995, che stabilisce i requisiti di purezza specifici per le sostanze coloranti per uso alimentare. <https://op.europa.eu/it/publication-detail/-/publication/4f4d8000-4753-421e-8fac-b3a223e53621>
- [23] Licofarma, Applicazioni Nutraceutiche del Licopene. <https://www.licofarma.com/applicazioni-nutraceutiche-licopene#:~:text=In%20particolare%2C%20le%20principali%20applicazioni,prostatiti%20e%20ipertrofia%20prostatica%20benigna> ultima vista il 08/09/2023

- [24] EFSA - European Food Safety Authority, 2008, L'EFSA valuta la sicurezza del licopene negli alimenti. <https://www.efsa.europa.eu/it/news/efsa-assesses-safety-lycopene-foods#efsa-page-title> ultima vista il 08/09/2023
- [25] Licofarma, Applicazioni Cosmetiche del Licopene. <https://www.licofarma.com/applicazioni-cosmetiche-licopene> ultima vista il 08/09/2023
- [26] Educhimica, a cura di A. Coviello, 2012, Estrazione Solido Liquido. http://www.educhimica.it/FERMILAB/attachments/047_Estrazione%20solido-liquido.pdf
- [27] CHEMMA - Chemical Green Solutions, 2022, Solventi. <https://chemma.it/prodotti/solventi/> ultima visita il 05/09/2023
- [28] Hansen B. B., Spittle S., Chen B., Poe D., Zhang Y., Klein J. M. & Zawodzinski T. A., 2021, Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chemical Reviews* **121** (3), pp. 1232-1285. [DOI: 10.1021/acs.chemrev.0c00385]
- [29] Hikmawanti N. P., Ramadon D., Jantan I. & Mun'im A., 2021, Natural Deep Eutectic Solvents (NADES): Phytochemical Extraction Performance Enhancer for Pharmaceutical and Nutraceutical Product Development. *Plants* **10** (10), p. 2091. [DOI: 10.3390/plants10102091]
- [30] Smith E. L., Abbott A. P. & Ryder K. S., 2014, Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chemical Reviews* **114** (21), pp. 11060-11082. [DOI: 10.1021/cr300162p]
- [31] Tommasi E., Pirini D., Samorì C., Galletti P., Tagliavini E., Tabasso S. & Cravotto G., 2017, Deep Eutectic Solvents: liquidi ionici "green" di nuova generazione. *La Chimica e l'Industria* **5**, pp. 40-47. [DOI: 10.17374/CI.2017.99.5.40]
- [32] Kyriakoudi A., Tsiouras A. & Mourtzinos I., 2022, Extraction of Lycopene from Tomato Using Hydrophobic Natural Deep Eutectic Solvents Based on Terpenes and Fatty Acids. *Foods* **11** (17), p. 2645. [DOI: 10.3390/foods11172645]
- [33] Koutsoukos S., Tsiaka T., Tzani A., Zoumpoulakis P. & Detsi A., 2019, Choline chloride and tartaric acid, a Natural Deep Eutectic Solvent for the efficient extraction of phenolic and carotenoid compounds. *Journal of Cleaner Production* **241**, p.118384. [DOI: 10.1016/j.jclepro.2019.118384]
- [34] Silva D. T., Smaniotto F. A., Costa I. F., Baranzelli J., Muller A., Somacal S. & Emanuelli T., 2021, Natural deep eutectic solvent (NADES): A strategy to improve the bioavailability of blueberry phenolic compounds in a ready-to-use extract. *Food Chemistry* **364**, p.130370. [DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.130370]
- [35] Nades Design, 2022, Building a better and sustainable future with innovative green solvent technology. <https://nades-design.hr/> ultima visita il 05/09/2023
- [36] Lavecchia R. & Zuorro A., 2008, Enhancement of lycopene extraction from tomato peels by enzymatic treatment. *Chemical Engineering Transactions* **14**, pp. 301-308. <https://www.aidic.it/IBIC2008/webpapers/20Lavecchia.pdf>

- [37] Zuorro A., 2020, Enhanced Lycopene Extraction from Tomato Peels by Optimized Mixed-Polarity Solvent Mixtures. *Molecules* **25** (9), p. 2038.
[DOI: [10.3390/molecules25092038](https://doi.org/10.3390/molecules25092038)]
- [38] Baaka N., Ksibi I. E. & Mhenni M. F., 2016, Optimisation of the recovery of carotenoids from tomato processing wastes: application on textile dyeing and assessment of its antioxidant activity. *Natural Product Research*, pp. 1478-6419.
[DOI: [10.1080/14786419.2016.1226828](https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1226828)]
- [39] Jamaledine A., Urrutigoity M., Bouajila J., Merah O., Evon P. & Caro d. P., 2023, Ecodesigned Formulations with Tomato Pomace Extracts. *Cosmetics* **10** (1), 7.
[DOI: [10.3390/cosmetics10010007](https://doi.org/10.3390/cosmetics10010007)]
- [40] Strati I. F. & Oreopoulou V., 2011, Process optimisation for recovery of carotenoids from tomato waste. *Food Chemistry* **129**, pp. 747–752.
[DOI: [10.1016/j.foodchem.2011.05.015](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.015)]
- [41] Trombino S., Cassano R., Procopio D., Gioia M. L. & Barone E., 2021, Valorization of Tomato Waste as a Source of Carotenoids. *Molecules* **26**, p. 5062.
[DOI: [10.3390/molecules26165062](https://doi.org/10.3390/molecules26165062)]
- [42] Stupar A., Šeregelj V., Ribeiro B. D., Pezo L., Cvetanović A., Mišan A. & Marrucho I., 2021, Recovery of β -carotene from pumpkin using switchable natural deep eutectic solvents. *Ultrasonics Sonochemistry* **76**, p. 105638.
[DOI: [10.1016/j.ultsonch.2021.105638](https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105638)]
- [43] Nazioni Unite, Agenda 2030. <https://unric.org/it/agenda-2030/> ultima visita il 10/09/2023
- [44] UNFPA -United Nations Population Fund Agency, 2023, State of World Population report 2023. <https://aidos.it/wp-content/uploads/2023/04/SWOP2023-ENGLISH-230329web.pdf>
- [45] Gruppo di Chemiometria - Società Chimica Italiana., software CAT (Chemiometric Agile Tool). <https://gruppochemiometria.it/index.php> ultima visita il 10/08/2023
- [46] Baldini M., Fabietti F., Giammarioli S., Onori R., Orefice L. & Stacchini A., 1996, Metodi di analisi utilizzati per il controllo chimico degli alimenti - *Rapporti ISTISAN 96/34*. Istituto Superiore di Sanità.
https://www.iss.it/documents/20126/45616/Rapp_ISTISAN_96_34_def.pdf
- [47] VELD Scientifica, Analisi elementare, il Metodo Dumas. <https://www.velp.com/it-it/metodo-dumas-1.aspx> ultima visita il 24/07/2023
- [48] Mariotti F., Tomé D. & Patureau Mirand P., 2008, Converting Nitrogen into Protein - Beyond 6.25 and Jones' Factors. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, pp. 177-184. [DOI: [10.1080/10408390701279749](https://doi.org/10.1080/10408390701279749)]
- [49] FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2003, Food energy: methods of analysis and conversion factors. Report of a Technical Workshop, Rome, 3-6 December 2002. Chapter 2.3: Analytical methods for carbohydrates in foods. *FAO*

- Food and nutrition Paper 77*. <https://www.fao.org/3/Y5022E/y5022e03.htm#bm3.3>
[ISBN 92-5-105014-7]
- [50] International Organization for Standardization, 2005, ISO 14502-1:2005 Determination of substances characteristic of green and black tea - Part 1: Content of total polyphenols in tea - Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent.
<https://www.iso.org/standard/31356.html>
- [51] Jaeger de Carvalho L. M., Barros Gomes P., Luiz de Oliveira Godoy R., Pacheco S., Fernandes do Monte P. H., Nutti Regini M. & Ramalho Ramos S. R., 2012, Total carotenoid content, α -carotene and β -carotene, of landrace pumpkins (*Cucurbita moschata* Duch): A preliminary study. *Food Research International* **47**, pp. 337-340.
[DOI: 10.1016/j.foodres.2011.07.040]
- [52] Chimica-online, Mentolo - Proprietà e caratteristiche del mentolo. <https://www.chimica-online.it/composti-organici/mentolo.htm#:~:text=Propriet%C3%A0%20e%20caratteristiche%20del%20mentolo&text=Il%20suo%20nome%20IUPAC%20%C3%A8,%C3%88%20un%20composto%20irritante> ultima visita il 28/07/2023
- [53] Chimica-online, Acido butirrico - Proprietà e caratteristiche dell'acido butirrico.
<https://www.chimica-online.it/composti-organici/acido-butirrico.htm> ultima visita il 28/07/2023
- [54] Chimica-online, Acido capronico o acido esanoico - Proprietà e caratteristiche dell'acido capronico (acido esanoico). <https://www.chimica-online.it/composti-organici/acido-capronico.htm> ultima visita il 28/07/2023
- [55] Chimica-online, Acido caprilico - Proprietà dell'acido caprilico (acido ottanoico).
<https://www.chimica-online.it/composti-organici/acido-caprilico.htm> ultima visita il 28/07/2023
- [56] Chimica-online, Acido laurico - Proprietà e caratteristiche dell'acido laurico.
<https://www.chimica-online.it/composti-organici/acido-laurico.htm> ultima visita il 28/07/2023
- [57] Chimica-online, Acido palmitico - Proprietà e caratteristiche dell'acido palmitico.
<https://www.chimica-online.it/composti-organici/acido-palmitico.htm> ultima visita il 28/07/2023
- [58] Verma R. & Banerjee T., 2018, Liquid–Liquid Extraction of Lower Alcohols Using Menthol-Based Hydrophobic Deep Eutectic Solvent: Experiments and COSMO-SAC Predictions. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **57**, pp. 3371-3381.
[DOI: 10.1021/acs.iecr.7b05270]
- [59] Sportiello L., Favati F., Condelli N., Cairano M. D., Caruso M. C., Simonato B. & Galgano F., 2023, Hydrophobic deep eutectic solvents in the food sector: Focus on their use for the extraction of bioactive compounds. *Food Chemistry* **405**, p. 134703.
[DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.134703]

- [60] CNR - Istituto di Scienza, Tecnologia e Sostenibilità per lo Sviluppo dei Materiali Ceramici, a cura di D. Gardini, Reometro rotazionale. <https://www.issmc.cnr.it/ricerca/risorse/laboratorio-di-proprietà-colloidalidinterfaccia/reometro/> ultima visita il 29/07/2023
- [61] CUENEWS – Energy, a cura di M. Casa, 2019, La spettroscopia a raggi infrarossi. <https://energycue.it/spettroscopia-raggi-infrarossi/13389/> ultima visita il 30/07/2023
- [62] Laerd statistics, One-way ANOVA. <https://statistics.laerd.com/statistical-guides/one-way-anova-statistical-guide.php> ultima visita il 30/07/2023
- [63] JMP statistical discovery, ANOVA a una via. https://www.jmp.com/it_it/statistics-knowledge-portal/one-way-anova.html#404f1893-ae56-43ed-b84c-f6c99f313eca ultima visita il 30/07/2023
- [64] Cavazzuti M., 2013, Chapter 2: Design of Experiments. *Optimization Methods: From Theory to Design*, pp. 13-42. [DOI: 10.1007/978-3-642-31187-1_2]
- [65] Prof. Leardi R., 2023, Design of Experiment (DoE): a small first step for an engineer, a huge advantage for a sound research project. Seminario al Politecnico di Torino.
- [66] Chimica-online, Acetone - Proprietà e caratteristiche dell'acetone. <https://www.chimica-online.it/composti-organici/acetone.htm> ultima visita il 22/08/2023
- [67] Chimica-online, Etere di petrolio - Che cos'è l'etere di petrolio?. <https://www.chimica-online.it/materiali/etere-di-petrolio.htm> ultima visita il 22/08/2023
- [68] Peleg M., 1988, An Empirical Model for the Description of Moisture Sorption Curves. *Journal of Food Science* **53** (4), pp. 1216-1217. [DOI: 10.1111/j.1365-2621.1988.tb13565.x]
- [69] Sturzoiu A., Stroescu M., Guzun A. S. & Dobre T., 2011, Empirical Models Applied for Kinetics Extraction of β -carotene from Rosa canina. *Revista de Chimie* **62** (3), pp. 344-348. <https://revistadechimie.ro/Articles.asp?ID=2943>
- [70] Antec Scientific, Che cos'è l'HPLC?. <https://antescientific.com/it/prodotti/tecniche/che-cosè-lhplc/> ultima visita il 17/08/2023
- [71] Darwish S. M., Abd El-Hakim H. I., Abd EL-Rahman M. A. & Megali H. K., 2019, Extraction and Utilization of Tomato Peels Lycopene as Antioxidant and Natural Colorants in Beef Burger. *Journal of Food and Dairy Sciences* **10** (8), pp. 257-264. [DOI: 10.21608/jfds.2019.58140]
- [72] Elbadrawy E. & Sello A., 2016, Evaluation of nutritional value and antioxidant activity of tomato peel extracts. *Arabian Journal of Chemistry* **9**(2), pp. S1010-S1018. [DOI: 10.1016/j.arabjc.2011.11.011]
- [73] Robles-Ramírez d. M., Monterrubio-López R., Mora-Escobedo R. & Beltrán-Orozco d. M., 2016, Evaluation of extracts from potato and tomato wastes as natural antioxidant additives. *ALAN* **66**(1), pp. 066-073. https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222016000100008

- [74] Azmi N. A., Elgharbawy A., Mohd Salleh H. & Hayyan A., 2021, Evaluation of the antimicrobial performance of menthol and menthol-based deep eutectic solvents as potential future antibiotic. Presentata al International Conference on Process Engineering and Advanced Materials 2020 (ICPEAM2020), Held, 13-15 luglio 2021. *E3S Web Conferences* **287**, p. 02010. [DOI: [10.1051/e3sconf/202128702010](https://doi.org/10.1051/e3sconf/202128702010)]
- [75] Bergua F., Castro M., Muñoz-Embid J., Lafuente C. & Artal M., 2022, L-menthol-based eutectic solvents: Characterization and application in the removal of drugs from water. *Journal of Molecular Liquids* **352**, p. 118754. [DOI: [10.1016/j.molliq.2022.118754](https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.118754)]
- [76] Yutian Ma L. M. & Wang X., 2023, High-Pressure Density of DL-Menthol/Octanoic Acid Eutectic Solvents. *Journal of Chemical & Engineering Data* **68** (4), pp. 881-888. [DOI: [10.1021/acs.jced.3c00023](https://doi.org/10.1021/acs.jced.3c00023)]
- [77] Aleksandra Mišan J. N., 2020, The perspectives of natural deep eutectic solvents in agri-food sector. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **60** (15), pp. 2564-2592. [DOI: [10.1080/10408398.2019.1650717](https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1650717)]
- [78] Blois M., 1958, Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* **181** (4617), pp. 1199–1200. [DOI: [10.1038/1811199a0](https://doi.org/10.1038/1811199a0)]
- [79] Scholarly Community Encyclopedia, Switchable Solvents. <https://encyclopedia.pub/entry/41439> ultima visita il 24/08/2023

Indice delle figure

Figura 1.1 Il pomodoro e i cascami prodotti dalla sua lavorazione	2
Figura 1.2 Struttura del licopene	4
Figura 1.3 Struttura del β -carotene	5
Figura 1.4 Diagramma di fase di una miscela eutettica tratta da Hansen <i>et al.</i> (2021) [28]	8
Figura 1.5 Pubblicazioni sui DES dalla prima citazione nel 2004 (ultima rilevazione 2023 del 17/9/23), fonte Google Scholar	10
Figura 1.6 Pubblicazioni sui NaDES dal 2004 (ultima rilevazione 2023 del 17/9/23), fonte Google Scholar	12
Figura 2.1 A sinistra campione di pomodoro fresco, a destra campione dopo l'essiccazione	20
Figura 2.2 Schema delle fasi del metodo Dumas, tratto da VELP Scientifica [47]	20
Figura 2.3 Estrattore utilizzato per l'applicazione del metodo Soxhlet	21
Figura 2.4 Campioni riposti in crogioli di ceramica dopo l'incenerimento	22
Figura 2.5 Schema del funzionamento dello spettrofotometro	24
Figura 2.6 Standard dopo l'aggiunta del reagente di Folin	24
Figura 2.7 (a) Estrazione con pompa da vuoto, (b) Soluzione di acetone e carotenoidi estratti	25
Figura 2.8 Separatore trifasico: (a) dopo l'etere di petrolio, (b) dopo l'acqua distillata	26
Figura 2.9 Struttura del mentolo	27
Figura 2.10 Struttura dell'acido butirrico	28
Figura 2.11 Struttura dell'acido esanoico	28
Figura 2.12 Struttura dell'acido caprilico	28
Figura 2.13 Struttura dell'acido laurico	28
Figura 2.14 Struttura dell'acido palmitico	29
Figura 2.15 Rappresentazione grafica del design CCF utilizzato per il DOE a 3 variabili	35
Figura 2.16 Rappresentazione grafica del design CCF utilizzato per il DOE a 2 variabili	37
Figura 2.17 Struttura dell'acetone	39
Figura 3.1 Retta di taratura usata per la quantificazione dei polifenoli	45
Figura 3.2 DES: (a) prima della sintesi, (b) dopo la sintesi	46
Figura 3.3 DES sintetizzati, con rapporto molare 1:1, da sinistra rispettivamente DES 1, DES 2, DES 3, DES 4 e DES 5	47
Figura 3.4 Viscosità DES 1	49
Figura 3.5 Viscosità DES 2	49
Figura 3.6 Viscosità DES 3	50
Figura 3.7 Viscosità dei DES	50
Figura 3.8 Spettro IR DES 1	53
Figura 3.9 Spettro IR DES 2	54
Figura 3.10 Spettro IR DES 3	55
Figura 3.11 Risultati test ANOVA e test TUKEY	57
Figura 3.12 Interazioni considerate per il modello del DOE a 3 variabili	60
Figura 3.13 Grafico dei coefficienti della funzione (3.2), ottenuto mediante CAT	61

Figura 3.14 Grafico dei residui rispetto al modello di regressione MLR, ottenuto mediante CAT.....	62
Figura 3.15 Grafico dei valori sperimentali vs valori fittati dal modello, ottenuto mediante CAT.....	62
Figura 3.16 Grafico dei valori sperimentali vs valori predetti dalla CV, ottenuto mediante CAT.....	63
Figura 3.17 Interazioni considerate per il modello del DOE a 2 variabili.....	65
Figura 3.18 Grafico dei coefficienti della funzione (3.3), ottenuto mediante CAT.....	66
Figura 3.19 Grafico dei residui rispetto al modello di regressione MLR, ottenuto mediante CAT.....	66
Figura 3.20 Grafico dei valori sperimentali vs valori fittati dal modello, ottenuto mediante CAT.....	67
Figura 3.21 Grafico dei valori sperimentali vs valori predetti dalla CV, ottenuto mediante CAT.....	67
Figura 3.22 Grafico rispetto al modello predetto con CV: (a) dei residui dei valori sperimentali, (b) del numero degli esperimenti, ottenuto mediante CAT.....	68
Figura 3.23 Leverage degli effetti di interazione tra T e t sul contenuto di carotenoidi: (a) Contour plot, (b) Grafico 3D, ottenuto mediante CAT.....	69
Figura 3.24 Intervallo di confidenza degli effetti di interazione tra T e t sul contenuto di carotenoidi: (a) Semiamplitude plot, (b) Grafico 3D, ottenuto mediante CAT.....	69
Figura 3.25 Contour plot degli effetti di interazione tra T e t sul contenuto di carotenoidi, ottenuto mediante CAT.....	70
Figura 3.26 Grafico 3D-RSM degli effetti di interazione tra T e t sul contenuto di carotenoidi, ottenuto mediante CAT.....	70
Figura 3.27 Grafico rispetto al modello di regressione MLR: (a) dei valori di predizione, (b) dei residui dei valori di predizione, ottenuto mediante CAT.....	72
Figura 3.29 Campioni utilizzati per lo studio cinetico di estrazione.....	74
Figura 3.30 Curva cinetica di estrazione sperimentale.....	75
Figura 3.31 Linearizzazione dei dati sperimentali di cinetica per la determinazione delle costanti di Peleg.....	75
Figura 3.32 Modello di Peleg vs cinetica sperimentale.....	76
Figura 3.33 Retta di taratura per la quantificazione del contenuto di β -carotene.....	77
Figura 3.34 Retta di taratura per la quantificazione del contenuto di licopene.....	79

Indice delle tabelle

Tabella 1.1 Stato dell'arte riguardo l'estrazione con solventi organici.....	13
Tabella 1.2 Stato dell'arte riguardo l'estrazione con DES	14
Tabella 2.1 DES sintetizzati.....	27
Tabella 2.2 DES utilizzati per le analisi e le estrazioni	29
Tabella 2.3 Livelli di variazione dei fattori utilizzati per il DOE a 3 variabili.....	35
Tabella 2.4 Esperimenti progettati dal DOE a 3 variabili tramite l'applicazione del modello CCF e definizione delle condizioni operative per ognuno di essi	36
Tabella 2.5 Livelli di variazione dei fattori utilizzati per il DOE a 2 variabili.....	37
Tabella 2.6 Esperimenti progettati dal DOE a 2 variabili tramite l'applicazione del modello CCF e definizione delle condizioni operative per ognuno di essi	38
Tabella 3.1 Caratterizzazione matrice	43
Tabella 3.2 Caratterizzazione matrice, dati di letteratura	43
Tabella 3.3 Campioni di standard a diverse concentrazioni	44
Tabella 3.4 Assorbance misurate degli standard.....	44
Tabella 3.5 Contenuto di polifenoli e carotenoidi.....	45
Tabella 3.6 Contenuto di polifenoli e carotenoidi, dati di letteratura.....	46
Tabella 3.7 Caratteristiche DES sintetizzati	47
Tabella 3.8 Densità dei DES liquidi	48
Tabella 3.9 Densità DES liquidi, dati di letteratura	48
Tabella 3.10 Viscosità dei DES liquidi	51
Tabella 3.11 Viscosità DES liquidi, dati di letteratura.....	51
Tabella 3.12 Carotenoidi estratti con i DES	56
Tabella 3.13 Dati utilizzati per il test ANOVA.....	56
Tabella 3.14 Risultati del test TUKEY.....	57
Tabella 3.15 Risultati degli esperimenti previsti dal DOE a 3 variabili.....	59
Tabella 3.16 Coefficienti del modello ottenuto per il DOE a 3 variabili	60
Tabella 3.17 Risultati degli esperimenti previsti dal DOE a 2 variabili.....	64
Tabella 3.18 Coefficienti del modello del DOE a 2 variabili	65
Tabella 3.19 Condizioni operative ottimali del processo estrattivo	71
Tabella 3.20 Predizione del DOE a 2 variabili	72
Tabella 3.21 Confronto DES – solventi organici	73
Tabella 3.22 Risultati studio di cinetica di estrazione	74
Tabella 3.23 Costanti del modello di Peleg	76
Tabella 3.24 Standard usati per la retta di taratura del β -carotene.....	77
Tabella 3.25 Standard usati per la retta di taratura del licopene	78
Tabella 3.26 Tempi di ritenzione dei composti analizzati	79
Tabella 3.27 Contenuto di licopene e β -carotene.....	80