Politecnico di Torino

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

Corso di Laurea Magistrale di Ingegneria Chimica dei processi Sostenibili

Tesi di Laurea Magistrale

Intensificazione di processo nell'estrazione di componenti ad alto valore aggiunto da biomasse di scarto. Matrice: Raspi d'Uva







Relatori Samir Bensaid Giancarlo Cravotto Giuliano Cavaglià

> Candidato Salvatore Talarico

Luglio 2018

Ai miei genitori

Indice

1	Intr	oduzio	one	1
	1.1	Perché	é i raspi? Perché i polifenoli?	2
	1.2	Un me	ondo più $GREEN$	6
	1.3	Estraz	tione Assistita da Ultrasuioni - UAE	11
	1.4	Scopo	della tesi	16
2	Des	crizior	ne attività sperimentale	18
	2.1	Appar	ecchiature ad ultrasuoni	18
		2.1.1	Cup horn	18
		2.1.2	Horn a Immersione \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots	19
	2.2	Appar	ecchiature convenzionali	20
		2.2.1	Sistema a riflusso	20
	2.3	Carat	terizzazione Matrice	21
	2.4	Criom	acinazione	22
	2.5	Degra	saggio	22
	2.6	Estraz	ioni	22
		2.6.1	Estrazione con <i>cup horn</i>	23
		2.6.2	Estrazione con <i>Horn</i> a immersione	23
		2.6.3	Estrazione convenzionale	23
		2.6.4	Work up post estrazione $\ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots$	23
	2.7	Analis	i	24
		2.7.1	Quantificazione polifenoli totali - TPC	24
		2.7.2	Cinetica di Peleg	26
		2.7.3	IWC – Institute of Wood Chemistry, Riga, Lettonia	30
		2.7.4	Analisi qualitativa GC-MS	33
		2.7.5	Analisi qualitativa LC-MS	33
		2.7.6	Analisi HPLC-DAD	41
3	\mathbf{Rist}	ultati e	e Discussione	45
	3.1	Quant	ificazione TPC	45

	3.2	Quant	ificazione TPC	45
	3.3	Degras	saggio	46
	3.4	Estraz	ione Convenzionale	46
	3.5	Estraz	ione Singola	49
		3.5.1	Cup horn	49
		3.5.2	Horn a immersione \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots \ldots	52
		3.5.3	Effetto Temperatura su $horn$ ad immersione $\ldots \ldots \ldots$	55
		3.5.4	Confronto US vs Convenzionale	57
		3.5.5	Caratterizzazione cinetica estrattiva - modello di Peleg $\ .\ .$	58
	3.6	Estraz	іопе Дорріа	63
	3.7	Analis	i qualitativa GC-MS	64
	3.8	Analis	i qualitative LC-MS	65
	3.9	Analis	i HPLC-DAD	71
	3.10	IWC -	Institute of Wood Chemistry (Rig, Lettonia), prof. Telysheva,	
		G		81
		3.10.1	LC-MS/MS - Identificazione	81
		3.10.2	Quantificazione flavonoidi e proantocianidine	81
		3.10.3	Potere Antiossidante - DPPH/ORAC	83
4	Scal	e-Up I	ndustriale	84
	4.1	Proces	s Description	84
				~ ~
		4.1.1	Panoramica Impianto	85
		4.1.1 4.1.2	Panoramica Impianto Sezione di estrazione	85 86
	4.2	4.1.1 4.1.2 Design	Panoramica Impianto Sezione di estrazione Basis	85 86 89
	4.2	4.1.1 4.1.2 Design 4.2.1	Panoramica Impianto Sezione di estrazione Basis Caratteristiche utilities	85 86 89 89
	4.2	 4.1.1 4.1.2 Design 4.2.1 4.2.2 	Panoramica Impianto Sezione di estrazione Basis Caratteristiche utilities Caratteristiche prodotto	85 86 89 89 89
	4.2 4.3	 4.1.1 4.1.2 Design 4.2.1 4.2.2 Dimen 	Panoramica Impianto	 85 86 89 89 89 89 90
	4.24.3	 4.1.1 4.1.2 Design 4.2.1 4.2.2 Dimen 4.3.1 	Panoramica Impianto Sezione di estrazione Sezione di estrazione Sezione Basis Sezione Caratteristiche utilities Sezione Caratteristiche prodotto Sezione Sionamento Strutture Miscelatori (ST-101, ST-102) Strutture	85 86 89 89 89 90 90
	4.2 4.3	 4.1.1 4.1.2 Design 4.2.1 4.2.2 Dimen 4.3.1 4.3.2 	Panoramica Impianto	85 86 89 89 89 90 90 90
	4.2 4.3	 4.1.1 4.1.2 Design 4.2.1 4.2.2 Dimen 4.3.1 4.3.2 4.3.3 	Panoramica ImpiantoSezione di estrazioneBasisCaratteristiche utilitiesCaratteristiche prodottosionamentoMiscelatori (ST-101, ST-102)Pompe a girante flessibile (P-101, P-106)Presse e KONMIX (CP-101, CP-102, KH-101)	85 86 89 89 89 90 90 90 90
	4.24.3	 4.1.1 4.1.2 Design 4.2.1 4.2.2 Dimen 4.3.1 4.3.2 4.3.3 4.3.4 	Panoramica ImpiantoSezione di estrazioneBasisCaratteristiche utilitiesCaratteristiche prodottoSionamentoMiscelatori (ST-101, ST-102)Pompe a girante flessibile (P-101, P-106)Presse e KONMIX (CP-101, CP-102, KH-101)Estrattore ad ultrasuoni (UR-101, UR-102)	 85 86 89 89 90 90 90 91 92
	4.24.3	 4.1.1 4.1.2 Design 4.2.1 4.2.2 Dimen 4.3.1 4.3.2 4.3.3 4.3.4 4.3.5 	Panoramica ImpiantoSezione di estrazioneBasisCaratteristiche utilitiesCaratteristiche prodottoCaratteristiche prodottoSionamentoMiscelatori (ST-101, ST-102)Pompe a girante flessibile (P-101, P-106)Presse e KONMIX (CP-101, CP-102, KH-101)Estrattore ad ultrasuoni (UR-101, UR-102)Decanter (CS-101, CS-102)	 85 86 89 89 90 90 90 90 91 92 92
	4.24.3	 4.1.1 4.1.2 Design 4.2.1 4.2.2 Dimen 4.3.1 4.3.2 4.3.3 4.3.4 4.3.5 4.3.6 	Panoramica ImpiantoSezione di estrazioneBasisCaratteristiche utilitiesCaratteristiche prodottoCaratteristiche prodottosionamentoMiscelatori (ST-101, ST-102)Pompe a girante flessibile (P-101, P-106)Presse e KONMIX (CP-101, CP-102, KH-101)Presse e KONMIX (CP-101, UR-102)Estrattore ad ultrasuoni (UR-101, UR-102)Filtri a tamburo rotante (RF-101, RF-102)	 85 86 89 89 90 90 90 91 92 93
	4.2	4.1.1 4.1.2 Design 4.2.1 4.2.2 Dimen 4.3.1 4.3.2 4.3.3 4.3.4 4.3.5 4.3.6 4.3.7	Panoramica ImpiantoSezione di estrazioneBasisCaratteristiche utilitiesCaratteristiche prodottocaratteristiche prodottosionamentoMiscelatori (ST-101, ST-102)Pompe a girante flessibile (P-101, P-106)Presse e KONMIX (CP-101, CP-102, KH-101)Estrattore ad ultrasuoni (UR-101, UR-102)Decanter (CS-101, CS-102)Filtri a tamburo rotante (RF-101, RF-102)Serbatoi	 85 86 89 89 90 90 90 91 92 92 93 95
	4.2	4.1.1 4.1.2 Design 4.2.1 4.2.2 Dimen 4.3.1 4.3.2 4.3.3 4.3.4 4.3.5 4.3.6 4.3.7 4.3.8	Panoramica ImpiantoSezione di estrazioneBasisCaratteristiche utilitiesCaratteristiche prodottoCaratteristiche prodottosionamentoMiscelatori (ST-101, ST-102)Pompe a girante flessibile (P-101, P-106)Presse e KONMIX (CP-101, CP-102, KH-101)Estrattore ad ultrasuoni (UR-101, UR-102)Decanter (CS-101, CS-102)Filtri a tamburo rotante (RF-101, RF-102)SerbatoiPompe Centrifughe	 85 86 89 89 90 90 90 91 92 92 93 95 96
	4.24.34.4	4.1.1 4.1.2 Design 4.2.1 4.2.2 Dimen 4.3.1 4.3.2 4.3.3 4.3.4 4.3.5 4.3.6 4.3.7 4.3.8 Sistem	Panoramica Impianto	 85 86 89 89 90 90 90 91 92 92 93 95 96 98

Bi	bliografia	102
A	LC-MS	106
в	LC-MS/MS - Institute of Wood Chemistry (IWC, Lettonia), Prof Telysheva, G.	i. 111
\mathbf{C}	HPLC-DAD	113
	C.1 Assorbanze ottimizzato UAE	113
	C.2 Assorbanze convenzionale	120
D	Process Flow Diagram	125

Capitolo 1

Introduzione

Il vino è da sempre una delle bevande più consumate dal genere umano: *«Nunc est bibendum»* scriveva Orazio nelle sue Odi dovendo celebrare la morte di Cleopatra e ancora oggi, alzare un calice di vino al cielo è simbolo di festa ogniqualvolta c'è da brindare a qualcuno o a qualcosa.

Si intuisce facilmente che la storia del vino sia tanto antica da fondersi con quella dell'umanità stessa [1]. Dalla Preistoria all'epoca moderna il consumo del vino è ricorrente. Gli uomini primitivi introdussero la raccolta stagionale dell'uva mentre il primo processo di vinificazione è riconducibile agli Egizi fino ad arrivare nel mondo ellenico dove, poiché dona a chi ne beve uno stato alterato della percezione, venne collegato a divinità o a riti religiosi. Senza andare ad indagare culti lontani, nel cristianesimo il vino è l'elemento principe poiché raffigura il sangue del Cristo versato per l'umanità. Nel mondo moderno il vino si guadagna di diritto il titolo di più importante bevanda alcolica con una richiesta di 25 miliardi di litri annui [2].

La filiera produttiva del vino parte dalla raccolta stagionale dell'uva seguita operazioni che portano al confezionamento del prodotto finito diversificandolo in base a richieste e caratteristiche. Il problema delle aziende vinicole, sempre più d'impatto, è la produzione parallela di ingenti quantità di scarti di produzione. Le spese per smaltire tutti gli scarti sono elevate e comportano un alto tasso di inquinamento, di conseguenza vi è un crescente interesse nella valorizzazione dei residui al fine di recuperare prodotti di interesse, eliminando o riducendo le spese di smaltimento. Lo scarto che un'industria genera spesso è ancora ricco di componenti sfruttabili e dall'elevato valore aggiunto e con il progredire della ricerca sono sempre di più i suoi possibili reimpieghi. Negli ultimi anni si è andato quindi definendo un vero e proprio settore di ricerca focalizzato sulla valorizzazione dei residui di produzione che sia attraverso la loro estrazione, che con semplice recupero di sottoprodotti. La filiera di produzione del vino genera elevate quantità di scarti sia liquidi che solidi. Per quanto riguarda la fase liquida si parla principalmente di acque reflue; gli impianti ausiliari, di lavaggio e l'uva stessa generano un elevato quantitativo di acqua che non può essere rimandata in testa all'impianto poiché contaminata e, di conseguenza, deve essere opportunatamente trattata. È stato stimato che vengono prodotti da uno a diversi litri di reflui per litro di vino prodotto [3]. Le quantità di residuo solido risultanti dalla filiera produttiva vitivinicola sono altrettanto imponenti, arrivando a 5 tonnellate annue per ogni ettaro coltivato [2].

1.1 Perché i raspi? Perché i polifenoli?

L'uva è il frutto della vite, la cui specie più diffusa è la *Vitis vinifera*. Nello specifico è una infruttescenza: gli acini - termine tecnico e comune con cui si fa riferimento alla bacca della vite - sono riuniti in una struttura definita grappolo. L'epicarpo del chicco è detto buccia, il mesocarpo polpa e, infine, i semi vinaccioli. Il corpo che tiene insieme la struttura è detto graspo (o raspo). In enologia si distingue il succo ottenuto dalla sola polpa, il mosto, dal resto dell'infruttescenza (raspi, bucce e vinaccioli) che formano le cosiddette vinacce [4] e che vanno a costituire gli scarti solidi della filiera. Il 14% in peso di tutto lo scarto solido generato dalla produzione del vino è rappresentato dai raspi [3] i quali sono composti essenzialmente da cellulosa (ca. 30%) e lignina (ca. 18%) [5] e sono anche ricchi in elementi naturali nutritivi come azoto (1.1%) e potassio (4.2%) [7]. Ne deriva che essi posseggono un elevato valore agronomico e ottime possibilità per essere impiegate per il compostaggio [2]. Date le proprietà fisiche ed il calore specifico, i raspi trovano anche impiego nella produzione di pellet e, il loro basso costo, li rende interessanti per la trasformazione in combustibile solido [5].

Ciò che rende inoltre i raspi di *Vitis vinifera* interessanti, è che possono costituire una fonte alternativa per ottenere antiossidanti naturali, molto più sicuri e commercialmente invitanti di quelli sintetici [17]. I polifenoli sono dei metaboliti secondari prodotti nel mondo vegetale e rientrano tra i gruppi di prodotti naturali più numerosi. Essi vengono classificati come segue [6] :

- Acidi fenolici
- Flavonoidi, metaboliti secondari di piante e funghi, chimicamente sono costituiti da uno scheletro di 15 atomi di carbonio raggruppati in due anelli benzenici (A e B) e un anello eterociclico (C) (vedi Figura1.1). Comunemente la struttura a cui si fa riferimento è C₆-C₃-C₆. Lo stato di ossidazione dell'a-



Figura 1.1: Struttura Flavonoidi

nello C e la sua diversa derivatizzazione con gruppi ossidrilici sono utilizzati per classificare i flavonoidi in diverse categorie:

- 1. Flavonoidi
 - Flavani: Flavan-3-oli, Flavan-4-oni, Flavan-3,4-dioli



Flavoni e flavonoli



 Antocianidine e antocianine(Antocianidin-3-glicosidi) derivati dallo ione flavilio, come struttura principale



- 2. Isoflavonoidi
 - Isoflavani



4. Calconi (a) e Diidrocalconi(b)





6. Pterocarpani e 3,4-dideidroderivati



• Altri polifenoli

Il vino stesso ha un contenuto in polifenoli, ma la quantità maggiore rimane nella parte solida della vite (e quindi nello scarto). Data la loro natura antiossidante, queste molecole sono dei potenti scavengers di radicali liberi [22], specie chimiche particolarmente reattive e instabili che, se non neutralizzate risultano dannose per le strutture cellulari. I radicali liberi vengono prodotti da eventi fisiologici determinati da reazioni biochimiche metaboliche, ma possono anche essere generati da fattori esterni. L'organismo di base ha delle strategie di detossificazione, ma quando la concentrazione dei radicali supera la capacità di difesa, diventa fondamentale il ruolo svolto dagli antiossidanti assunti tramite l'alimentazione o supplementi dietetici. I polifenoli, dunque, hanno un ruolo fondamentale nella difesa e nella prevenzione di patologie di interesse sistemico avendo funzione anticancerogena, antiaterogena, antimutagenica e antinfiammatoria [19]. Le specie polifenoliche mostrano inoltre un effetto protettivo del sistema cardiocircolatorio, riducendo i rischi di ipertensione e di malattie cardiovascolari, unitamente ad un'attività antitrombotica che agisce sui meccanismi di assimilazione e riassorbimento del colesterolo. L'inibizione dell'ossidazione del colesterolo a bassa densità (LDL) permette di attenuare lo sviluppo di arterosclerosi [20].

In letteratura sono stati riportati numerosi studi sono stati effettuati sull'identificazione e sulla quantificazione delle specie polifenoliche contenute all'interno dei raspi d'uva. Considerando che ogni tipologia d'uva presenta un suo *fingerprint* di composizione/concentrazione, si sono assunti dei valori medi riportati in Tabella1.1 unitamente alla relativa valutazione commerciale definita in base alla purezza del singolo componente [18].

È facile dunque intuire che ci sia un crescente interesse da parte dell'industria agro-alimentare nell'investire risorse per valorizzare uno scarto e al contempo ottenere un prodotto dall'elevato valore aggiunto. Oggigiorno sono sempre di più sono sempre di più i farmaci o i prodotti cosmetici e nutraceutici che fanno del loro elevato potere antiossidante (e quindi dell'alto contenuto polifenolico) uno dei principali punti di forza.

		mg/g $_{dw}$	€/mg
Procianidine	(Epi)catechina (Epi)catechina gallata	$28 \\ 6,85$	$0,10^{[8]}\ 33,9^{[9]}$
Flavonoli	Quercetin-3-O-Rut ^a Quercetin-3-O-Gluc ^a Canferolo-3-O-Rut Canferolo-3-O-Glc ^a	$\begin{array}{c} 0,074 \\ 1,03 \\ 0,083 \\ 0,025 \end{array}$	$\begin{array}{c} 0,01^{[11]} \\ 71,4^{[10]} \\ 107^{[12]} \\ 1,85^{[13]} \end{array}$
Acidi idrossicinammici	Acido caftarico	0,7	$39,78^{[15]}$
Stilbeni	ϵ -Viniferina	0,19	$207^{[16]}$
Antocianine	Malvidin-3-O-Glc	$0,\!5$	$154,00^{[14]}$

Tabella 1.1: Contenuto e prezzo composti polifenolici

^a Rut:Rutinoside; Gluc:Glucuronide; Glc:Glucoside

1.2 Un mondo più *GREEN*

Nell'ottica di un mondo più pulito e sostenibile, è sempre più diffuso il concetto di *Green Chemistry*.

"The design of new chemical products and processes, (or making improvements in already existing compounds and processes), so as to reduce or eliminate the use and generation of hazardous substances, making them less harmful to human health and environment." [23]

È così che viene definita la *Green Chemestry*, una branca della chimica che ha fatto del ridurre al minimo gli scarti e l'inquinamento un mantra. La sopracitata definizione risale a circa 28 anni fa, quando venne emesso il "Pollution Prevention Act" (1990, USA), mirato a ridurre o minimizzare i rischi legati a reagenti, solventi, prodotti e allo stoccaggio dei prodotti chimici [24]. Questo concetto venne costruito e codificato su 12 principi, mirati a quello che viene definito *source reduction* [24] la cui traduzione letterale risulta essere: *riduzione alla fonte*. Il significato profondamente evocativo esprime la necessità di andare alla fonte e quindi cercare di ridurre non quelli che possono essere i danni, ma i rischi. Viene inclusa qualsiasi pratica che miri a ridurre l'impiego di sostanze rischiose, inquinanti o di qualsiasi scarto rilasciato nell'ambiente, a favore di azioni che assicurino il riutilizzo, il trattamento e lo smaltimento degli stessi.

I 12 principi su cui la *Green Chemistry* si basa, però, non contengono indicazioni sugli impatti ambientali [25]. È proprio in questo ambito che il lavoro di chimici ed ingegneri diventa sinergico. In accordo al concetto di *source reduction*, il com-

pito di un ingegnere chimico è quello di portare delle innovazioni, ridisegnando e sviluppando i processi e gli impianti utilizzati nelle industrie. Nasce così la *Green Engineering* che si basa sull'assicurare una progettazione di impianti che mirino a ridurre al minimo le possibilità di rischio, prendendo in considerazione non solo l'affidabilità dei sistemi di controllo, ma anche la massima sicurezza intrinseca [26]. Le linee guida per lo sviluppo delle condizioni sopracitate, necessarie per coniugare sostenibilità e industria, sono state codificate nei 12 principi della *Green Engineering*, i quali fungono da linee guida in questo complesso sistema integrato. Il modello viene di seguito riportato e commentato. [25, 26, 27] :

1. Inherent rather than circumstatial

Il primo principio si basa sull'attenta scelta e valutazione di input e output del processo. Selezionare quali sostanze chimiche e quali materiali impiegare per avere rischio sempre minore per l'ambiente e per le persone. La scelta influenza anche l'energia necessaria al processo, poiché può essere generata e gestita in diversi modi. La cosa più importante racchiusa in questo principio, tuttavia, è l'intenzione, il desiderio che chi è coinvolto nei processi decisionali/progettistici, deve avere per far sì che si possa ottenere un prodotto o un processo intrinsecamente non rischioso.

2. Prevention instead of treatment

Progettare un processo che sia il più selettivo possibile, capace di produrre solo quello di cui ha bisogno per poter ridurre al minimo gli scarti. In questo modo piuttosto che trattare gli scarti, essi non vengono prodotti.

3. Design for separation

Separazione e purificazione del prodotto sono le operazioni che gravano maggiormente sul bilancio economico ed energetico. Questo terzo principio mira allo sviluppare nuove tecniche che minimizzino il consumo di energia e di materiali impiegati.

4. Maximize mass, energy, space and time efficiency

Questo principio nasce dal fatto che i vari processi spesso impiegano più tempo, spazio, energia e materiale di quanto effettivamente serva. Ciò porta ad una inefficienza del sistema, che invece può essere abbattuta se si pensa con semplicità, ottenendo un processo il più *Green* possibile. Lavorare a temperatura e pressione ambiente, non avere in gioco ingenti volumi e costruire impianti snelli che non implichino grossi movimentazioni di massa.

5. Output-pulled versus input-pushed

Minimizzare le risorse impiegate per ottenere gli output desiderati. Progetta-

re avendo bene a mente cosa si vuole ottenere, quanto si vuole ottenere e con quali tempistiche. Il 5° principio è una lotta contro la "sovrapproduzione"; è necessario un impianto flessibile che possa produrre in base alla domanda.

6. Conserve complexity

La complessità di un prodotto si valuta in termini di energie, tempo e materiali impiegati per la sua produzione. Di fatto, il riciclo di un prodotto altamente complesso porterebbe ad una sua svalutazione, mentre un riutilizzo ne conserverebbe la complessità e quindi il valore. Conviene dunque che un prodotto sì sia complesso, ma il cui riutilizzo tramite disassemblaggio sia semplice. Prodotti modulari che possano essere migliorati o riutilizzati senza necessitare di una sostituzione totale.

7. Durability rather than immortability

Mirare a rendere un componente o un materiale non immortale, ma con una ciclo di vita ben definito. Portare un componente fino all'immortalità provoca danni all'ambiente e all'uomo perché ne conseguono seri problemi per il trattamento e lo smaltimento. Diventa cruciale quindi progettare prodotti con una vita ben definita assicurandone il funzionamento per tutta la durata.

8. Meet need, minimize excess

È auspicabile progettare soluzioni che siano il più possibile flessibili, ma senza ricadere in situazioni da "taglia unica". Progettare in un modo eterno e globale potrebbe essere uno spreco inutile di risorse.

9. Minimize material diversity

E' necessario ridurre la diversificazione di materiali impiegati poiché potrebbe essere un problema a livello di disassemblaggio e riciclo. Strategie progettuali monomateriale possono aiutare.

10. Integrate local material and energy flows

Questo principio invita scienziati e ingegneri chimici a guardare al processo con una visione olistica. Considerate le singole parti di cui esso è composto non come unità indipendenti, bensì come intimamente correlate. È ciò che si definisce processo integrato; un esempio è l'integrazione energetica, che permette di minimizzare gli sprechi riducendo al contempo la quantità di energia da produrre per sostenere il processo, il tutto semplicemente sfruttando al meglio quello che il processo stesso offre.

11. Design for commercial "afterlife"

L'applicazione di questo principio è prevista in caso di un fine ciclo-vita pre-

maturo. Progettare componenti modulari permette di assicurare un *afterlife*, in modo da recuperare componenti e riutilizzarli, abbattendo gli oneri dovuti alla dismissione e alla sostituzione completa di materiali.

12. Renewable rather than depleting

La provenienza degli *inputs* ha un'elevata incidenza sulla sostenibilità del processo. Utilizzare fonti rinnovabili, teoricamente "infinite", preferenzialmente alle fonti esauribili. In questo modo si tenta di instaurare un circolo virtuoso che riduca la generazione di sprechi, consumi e scarti, collegati allo sfruttamento di risorse esauribili.

Questi punti, insieme ai 12 Principi della *Green Chemistry*, offrono delle linee guida da seguire per raggiungere l'ideale di un processo sostenibile ponendo le basi per progettare riducendo costi e sprechi. Se esaudire nel complesso ognuno di questi punti può rivelarsi arduo, è sempre più diffusa l'attiva ricerca di avvicinare i propri standard a questi obiettivi.

L'intero impianto di principi fino a qui citati e approfonditi è stato riassunto in due acronimi, che ne potessero racchiudere la complessità e costituire al contempo un riferimento conciso. I 12 Principi della *Green Chemistry* sono stati riassunti con l'acronimo **PRODUCTIVELY** e quelli della *Green Engeneering* con **IMPROVEMENTS**. Sono stati accorpati in 24 punti riassunti come segue [25].

Pri	nciples of Green Engineering	Principles of Green Chemistry			
I-	Inherently non-hazardous	P-	Prevent wastes		
	and safe				
\mathbf{M} -	Minimize material diversity	R-	Renewable materials		
P-	Prevention instead of	O-	Omit derivatization steps		
	treatment				
R-	Renewable material and	D -	Degradable chemical		
	energy inputs		products		
0-	Output-led design	U -	Use safe synthetic methods		
V-	Very simple	C-	Catalytic reagents		
E-	Efficient use of mass,	T -	Temperature, Pressure		
	energy, space & time		ambient		
\mathbf{M} -	Meet the need	I-	In-Process Monitoring		
\mathbf{E} -	Easy to separate by design	V -	Very few auxiliary		
			substances		
\mathbf{N} -	Networks for exchange of	E -	E-factor, maximize feed in		
	local mass & energy		products		
T-	Test the life cycle of the	L-	Low toxicity of chemical		
	design		products		
\mathbf{S} -	Sustainability throughout	Y-	Yes it's safe		
	product life cycle				

Lo scopo finale è quello di applicare i principi per poter affrontare i miglioramenti (*IMPROVEMENTS*) in modo produttivo (*PRODUCTIVELY*).

Green Extraction

:

Un processo estrattivo, su scala industriale, impiega dei solventi organici che comportano spese inerenti al loro trattamento e successivo smaltimento, il tutto accompagnato dalla produzione di scarti. L'impatto energetico di queste procedure non è da sottovalutare poiché arriva a richiedere fino al 50% dell'energia dell'intero processo [28].

Nell'ottica di quanto detto, si inserisce perfettamente l'idea di cercare di ottimizzare anche il processo di estrazione, cercando di rivoluzionare quello convenzionale con lo scopo di ridurre gli sprechi e renderlo sostenibile. L'applicazione delle linee guida che fondano le basi del concetto di sostenibilità ai processi estrattivi, ha portato alla formulazione, da parte di Chemat, Vian e Cravotto [28], di sei principi per far sì che i processi estrattivi diventassero competitivi nel nostro secolo:

- 1. Innovazione tramite selezione e utilizzo di varie risorse vegetali rinnovabili
- 2. Uso di solventi alternativi, principalmente acqua o agro-solventi
- 3. Ridurre il consumo di energia tramite il suo recupero e l'utilizzo di tecnologie alternative
- 4. Produzione di co-prodotti invece che scarti includendo bio- e agro-raffinerie
- 5. Ridurre le unità operative a favore di un processo sicuro, robusto e controllato
- 6. Ottenere un prodotto non denaturato e biodegradabile senza contaminanti

Al fine di rispettarli e per promuovere la *Green Extraction* alla cui base c'è l'idea di abbattere gli sprechi e i consumi, ridurre le spese ed essere innovativi, sono state proposte tre soluzioni:

- Migliorare e ottimizzare processi che già esistono
- Usare delle apparecchiature non dedicate
- Innovazioni di processi e procedure ma anche la scoperta di solventi alternativi

L'innovazione è il punto cardine per soddisfare tutti i prerequisiti di un'estrazione sostenibile. Inserire delle procedure che sfruttino tecnologie non convenzionali ha il duplice effetto di aumentare l'efficienza del processo riducendone fortemente l'impatto ambientale ed economico.

1.3 Estrazione Assistita da Ultrasuioni - UAE

Il primo chimico a riconoscere gli effetti di onde sonore che attraversano un liquido fu Alfred L. Looms in 1927 [33]. Da allora gli ultrasuoni (US) sono stati inseriti in un numero sempre maggiore di applicazioni. Sono presenti nei campi più comuni come gli ospedali, le fabbriche e persino negli allarmi antifurto delle case [33]. Uno degli utilizzi più diffusi degli US è nell'industria alimentare, in particolare essi hanno un ruolo fondamentale nei processi estrattivi rappresentando la chiave per lo sviluppo di processi green. Gli ultrasuoni hanno una frequenza più alta del range udibile dall'uomo (1-16 kHz) [32]. Quando le onde attraversano un mezzo con una frequenza di 20-100 kHz, hanno un effetto fisico su una matrice immersa/dispersa in esso; a bassa frequenza e alta intensità gli US esercitano solo un'azione meccanica [21]. L'inserimento nell'ambito industriale ha portato diversi



Figura 1.2: UAE - Evoluzione o Rivoluzione

miglioramenti che sono riassunti nella Figura 1.2 tanto da non poter inquadrare in modo preciso se si tratta dire se si tratta di evoluzione o di rivoluzione [29].

Il processo estrattivo assistito da ultrasuoni (UAE) abbatte i tempi di esercizio e aumenta la purezza del prodotto finale, semplificando inoltre l'impianto grazie alla riduzione di solvente utilizzato ed eliminando il post-trattamento delle acque reflue. Questi traguardi sono raggiunti consumando solo parte dell'energia necessaria per un processo estrattivo convenzionale [29]. Un impianto che utilizza gli US segue a pieno il principio delle *Green Engineering* numero 8 poiché non è sviluppato per un solo solvente o matrice, ma è ampiamente flessibile. Per questo motivo sono state progettate ed applicate diverse configurazioni, con diverse geometrie e soluzioni. Nella vasta gamma di modelli prodotti, commercializzati o in sviluppo, tre sono le tipologie di base sfruttate in un protocollo estrattivo Figura 1.4 : il bagno ad ultrasuoni (a), la sonda ad ultrasuoni (o sonotrodo) (b) e il cup-horn(c) [29]. Tutti si basano sull'applicazione di un trasduttore che trasforma il segnale di un generatore in onde meccaniche con cicli di compressione/rarefazione nelle frequenze dell'ultrasuono. Tra le tre tipologie, quelle più performanti appartengono al tipo b poiché l'emissione degli US avviene solo tramite la punta della sonda che ha una superficie specifica minore rispetto agli altri modelli. Affinché le onde degli



Figura 1.3: Fenomeno della Cavitazione



Figura 1.4: Configurazioni UAE

ultrasuoni siano trasportate, esse hanno bisogno di passare attraverso un mezzo, sia esso solido, liquido o gassoso. Nel momento in cui l'onda attraversa il mezzo, essa genera ciclicamente pressione lungo la direzione di propagazione. Le molecole del mezzo sono quindi sottoposte a pressioni positive durante la compressione, che le avvicina, e pressioni negative durante l'espansione, che le allontana. Quando le molecole sono lontane le forze di Van der Waals non riescono a tenerle coese, creando piccole cavità o microbolle [30]: Questo poiché la pressione supera la resistenza a trazione dei legami. LaFigura1.3 [33] mostra come il raggio delle bolle create aumenti quando le molecole del fluido si allontanano sottoposte a pressione negativa (zona chiara) e invece diminuisca quando si avvicinano sotto pressione positiva (zona azzurra). La depressione necessaria perché si formi una cavità all'interno del mezzo dipende da quante impurità il fluido ha nella sua struttura. Un liquido puro ha una resistenza a trazione talmente forte da impedire la cavitazione. Tuttavia, la maggior parte dei liquidi ha delle strutture irregolari, solitamente dovuti ai gas disciolti in essi, tali per cui si riescono a formare delle microbolle anche con bassi



Figura 1.5: Collasso della cavità

valori di rarefazione [32]. La bolla formatasi nel mezzo riesce ad assorbire energia ed aumentare il suo raggio (come mostra la Figura1.3) se continuamente irradiata da onde sonore. Questa crescita procede fino a quando la cavità non riesce più ad assorbire energia: a questo punto non può più sostenersi e implode [33] (Figura1.3) dando così origine al fenomeno della **cavitazione**.

Nel momento in cui la cavità collassa si crea un *hot spot*. La rapida compressione adiabatica della bolla genera all'interno della cavità delle condizioni di temperatura e pressioni estreme. Le condizioni raggiunte non possono essere calcolate o determinate in maniera diretta. Si è stimato che gli hot spots raggiungano una temperatura di circa 5000°C (simile alla superficie del sole) e una pressione di circa 1000 atm (comparabile a quella che si raggiunge nella Fosse delle Marianne) [32]. Le dimensioni della bolla sono però così piccole rispetto al resto del mezzo che il calore prodotto viene immediatamente dissipato: il raffreddamento stimato è dell'ordine di 10 miliardi di gradi al secondo [32]. Il processo dalla formazione al collasso dura circa $400\mu s$ [32]. La cavitazione all'interno di un liquido produce bolle che normalmente mantengono la forma sferica per tutto il processo. Tuttavia, in presenza di solidi nel mezzo (come nel caso di processo estrattivo) la cavità collassa in modo asimmetrico nel momento dell'implosione, generando così un violento jet di liquido. In Figura 1.5(a) è possibile vedere una rappresentazione degli stadi d'implosione della bolla e della produzione del jet. In Figura 1.5(b) è stato possibile registrare il momento del collasso di una cavità grazie ad una fotocamera ad alta velocità [33]. L'applicazione del fenomeno della cavitazione durante il processo estrattivo permette di amplificare l'estrazione di materiale presente all'interno di un sistema. Insieme ad una accelerazione dell'estrazione, le bolle di implosione esercitano sulla matrice un effetto fisico. Come si può notare nella Figura1.6, se la cavità si forma nei pressi del solido, il rapido getto di fluido che si



Figura 1.6: Cavitazione [31]

genera nel momento del collasso permette di rompere la parete cellulare: il suo contenuto viene quindi rilasciato nella soluzione, e l'estrazione viene intensificata [31, 34]. Conseguentemente alla cavitazione si sviluppano diversi fenomeni fisici e nel caso di un sistema liquido-solido, si generano delle macro-turbolenze e delle micro-miscelazioni. È stato riportato che l'UAE non avviene con un meccanismo unico. La rottura della pareti cellulari è il risultato della sinergia di diversi fattori indipendenti tra loro [29]:

- frammentazione : la turbolenza che si genera nel mezzo genera la frammentazione della matrice aumentandone la superficie specifica, ed incrementando la resa;
- erosione : dovuta al collasso delle bolle, facilita l'ingresso del solvente all'interno della matrice;
- **capillarità** : la profondità e la velocità con la quale il solvente si spinge all'interno della matrice dipende dalle varie condizioni di US che vengono applicate;
- destrutturazione : la struttura macroscopica della matrice viene distrutta;
- sonoporazione: gli US creano sulla matrice pori con diametri dipendenti dalla dimensione delle bolle d'implosione, modificandone la permeabilità delle membrane cellulari.

Un'ulteriore nota a favore dell'utilizzo degli US è rappresentata dalla possibilità di intensificare il processo estrattivo anche lavorando a temperatura ambiente (RT), favorendo così, come specificato nel principio No.4, la semplicità dell'impianto e quindi la sua sostenibilità.

UAE - Acqua come solvente

Rispondendo ai dettami della *Green Chemistry* [28], al fine di disegnare un processo più sostenibile, insieme all'utilizzo di una tecnologia che intensifichi il protocollo estrattivo, è necessario soffermarsi sulla scelta del solvente impiegato. È proprio in quest'ottica che si inserisce l'utilizzo dell'acqua di rete all'interno di un processo estrattivo. Così facendo si eliminano tutti i costi inerenti allo stoccaggio e alla reperibilità/acquisto di solventi pericolosi, costosi oppure soggetti a tassazione (ad es. l'etanolo).

L'acqua non è inquinante, e le procedure di purificazione/recupero a fine processo risultano più semplici ed economiche rispetto a tutte quelle operazioni necessarie per altri solventi, eliminando passaggi costosi ed inquinanti.

1.4 Scopo della tesi

Lo scopo principe di questa tesi dunque, prendendo spunto dai lavori di ricerca portati avanti in questo ambito, è cercare di definire e ottimizzare un processo estrattivo US-assistito per ottenere i polifenoli presenti nei raspi d'uva, utilizzando come solvente semplice acqua. I raspi come le bucce e i semi dell'uva, sono la parte con il maggior contenuto polifenolico [22] quindi si può assicurare una resa in polifenoli competitiva a livello commerciale. La finalità di questa tipologia di progetto è quella di inserire nel mondo dell'industria un impianto efficiente, ma a basso impatto ambientale e in grado di minimizzare gli sprechi. Investire in un processo basato sull'uso contemporaneo degli US e di acqua come solvente, fornisce una solida base di partenza per modificare impianti convenzionali che consumano energia e inquinano. All'importanza della sostenibilità si associa un beneficio anche economico. Gli impianti convenzionali che impiegano solventi come l'etanolo sono dispendiosi sia per ciò che concerne la fornitura e lo stoccaggio, che per ciò che riguarda la purificazione. L'impianto a cui ci si rivolge è un impianto che ha costi iniziali minimi, capace di assicurare una produzione pulita, ecosostenibile ed economica. Vendere un prodotto che non necessiti la rimozione di tracce di solventi tossici ed ottenuto con sufficiente grado di purezza a costi contenuti, significa accrescere il guadagno netto.

Il lavoro è stato suddiviso in due parti: una di laboratorio e una progettuale. Nella sezione di studio in laboratorio sono state sfruttate tecniche e strumentazioni dedicate per la caratterizzazione chimica e fisica della matrice e dell'estratto. Sono state effettuate una serie di prove che potessero permettere di raccogliere dati da poter poi utilizzare nella fase progettuale. È stato effettuato uno *screening* accurato dei parametri che più potessero influenzare l'estrazione, quali tempo, temperatura, rapporto matrice/solvente e *step* estrattivi. Le prove sono inoltre servite per la costruzione di una curva cinetica di estrazione per i diversi sistemi considerati. Tramite il modello di Peleg, infine, è stato poi possibile il calcolo del coefficiente di scambio volumetrico k_{La} . Come già detto, una volta raccolti tutti i dati necessari e fissati gli *inputs* e gli *outputs* del sistema, si è passati alla fase progettuale. L'impianto che si vuole progettare è geograficamente inserito nel territorio piemontese. Raccoglie gli scarti di produzione del vino di una serie di aziende vinicole nel raggio di 50km da Asti. L'impianto riproduce in modo quanto più fedele le operazioni svolte in laboratorio. Il corpo centrale è, chiaramente, l'estrattore ad US. Sono state poi dimensionate tutte le apparecchiature di contorno necessarie a definire un processo continuo di estrazione in controcorrente.

Capitolo 2

Descrizione attività sperimentale

2.1 Apparecchiature ad ultrasuoni

L'attività sperimentale svolta presso il dipartimento di Scienze e Tecnologie del Farmaco (DSTF) consta principalmente di esperienze inerenti la green extraction effettuate con strumenti di laboratorio. Nello specifico, i raspi d'uva sono stati trattati con l'estrazione ad ultrasuoni utilizzando le apparecchiature che verranno elencate e spiegate in questo capitolo

2.1.1 Cup horn

Per l'estrazione dei raspi d'uva è stato impiegato un reattore ad ultrasuoni (PEX1, R.E.U.S., Contes, France), illustrato in Figura2.1.a, con dimensioni della camicia interna di 14x10 cm ed una capacità massima di 1 L [35].



Figura 2.1: Cup horn

Alla base della cavità è presente un trasduttore piezoelettrico che modifica il segnale che riceve dal generatore di US in vibrazioni meccaniche, trasmettendole alla sospensione soprastante, come si vede in Figura2.1.b. Il generatore opera ad una frequenza fissa di 25 kHz e con una potenza di 200 W, ed è possibile regolare la durata di sonicazione tramite un timer che può essere impostato tra 1 e 60 minuti. Nel momento in cui gli US investono la soluzione di estrazione, la temperatura tende ad aumentare. Per questo motivo il reattore è dotato di una camicia esterna che permette il passaggio di acqua di servizio per raffreddare il sistema. Per valutare il potere calorimetrico dell'apparecchiatura sono state effettuate delle misure di soluzione processata. Questi dati sono stati indispensabili per definire la potenza effettiva degli ultrasuoni, calcolata secondo l'equazione (3.5) sottostante.

$$P = m \cdot c_{\rm p} \cdot \frac{dT}{dt} \tag{2.1}$$

dove c_p è il calore specifico del solvente ad una data pressione, m la massa del solvente e dT/dt è l'aumento della temperatura su unità di tempo.

2.1.2 *Horn* a Immersione

La seconda apparecchiatura utilizzata per lo screening estrattivo è stato un *horn* ad immersione in titanio (Ti-*horn*), appartenente ai reattori di tipo sonda (Figura1.4 (a)). In generale questo apparecchio è costituito da un trasduttore seguito da un *booster*, utilizzato per aumentare l'ampiezza dell'onda sonora trasmessa, ed infine dall'*horn* vero e proprio, avvitato in un punto specifico definito *null point* o punto a movimento nullo, in modo che le vibrazioni non separino le componenti del sistema(vd.Figura2.2). Il generatore utilizzato lavora in un *range* di potenza compreso tra i 350 e i 500 W ad una frequenza di 21,2 kHz; le esperienze sono state condotte tutte al massimo della potenza disponibile.

A differenza del sistema R.E.U.S. , la cavità in cui la soluzione è contenuta non fa parte dell'apparecchiatura, di conseguenza viene utilizzato in un ditale in Pirex (contenitore cilindrico con fondo semisferico: d=8cm e H=19cm), che viene bloccato tramite una pinza al ritto dove l'*horn* è ancorato. Il raffreddamento del sistema è assicurato tramite un bagno di giacchio in cui viene immerso il contenitore. Il tutto è visibile in Figura2.2. Anche per questo reattore, in modo analogo al R.E.U.S., l'aumento della temperatura durante il processo è stato valutato tramite studio del potere calorimetrico del sistema e la potenza trasmessa è stata calcolata tramite l'equazione (3.5)



Figura 2.2: Ti-*horn*

2.2 Apparecchiature convenzionali

Parallelamente agli esperimenti con le apparecchiature ad ultrasuoni sono state eseguite delle estrazioni con un metodo convenzionale per poter determinare a priori il contenuto polifenolico totale della matrice grazie a procedure riportate in letteratura. I dati ottenuti sono quindi stati presi in considerazione per valutare l'efficacia della cavitazione attraverso il confronto delle rese estrattive in condizioni operative comparabili.

2.2.1 Sistema a riflusso



Figura 2.3: Sistema a riflusso

Sono stati impiegati degli strumenti che potessero rappresentare più fedelmente un reattore perfettamente miscelato (CSTR). Nell'apparato rappresentato nell Figura2.3, la soluzione contenuta la matrice è stata inserita in un pallone in vetro Pyrex da 250 ml con all'interno un'ancoretta magnetica. Il pallone è stato poi immerso in un bagno di olio siliconico (b) posto su una piastra (a) che provvede all'agitazione e al riscaldamento. Tramite una termocoppia collegata, il sistema viene mantenuto alla temperatura desiderata. Il pallone è collegato ad un condensatore a bolle refrigerato ad acqua (a), che assicura la ricaduta del solvente che evapora.

2.3 Caratterizzazione Matrice

La matrice è stata caratterizzata in base alla sua composizione e alla sua granulometria. Con il metodo termo-gravimetrico delle ponderali si è proceduto a valutare il contenuto d'acqua, di frazione organica e inorganica della matrice. Il protocollo prevede due fasi successive di riscaldamento. Nella prima si valuta la perdita d'acqua lasciando il campione a 100°C per 12 ore, nella seconda, a 650°C per 4 ore si elimina la frazione organica. Registrando le perdite in peso ad ogni passaggio si arriva a valutare il residuo rimanente costituito da ceneri inorganiche. Per la procedura è stato impiegato un crogiolo di peso noto ed una muffola Gelman Instrument. Le percentuali sono raccolte nella Tabella 2.1 che mostra anche una caratterizzazione in base alla granulometria della matrice, definendone il diametro medio (d₀). Un campione di 7.5 g è stato fatto passare attraverso un gruppo di setacci (Giuliani) ognuno con una diversa luce di passaggio, in ordine decrescente. Ogni quota parte che passa attraverso il setaccio viene pesata per calcolarne la percentuale. La Figura2.4 mostra i tre tagli: (**a**) >1000 μ m; (**b**) 500 μ m; (**c**) 212 μ m.

Со	MPOSIZI	Granulometria		
Umidità	Ceneri	Organico	Taglio μm	$\begin{array}{c} \text{Percentuale} \\ \% \end{array}$
8.92 %	4,46%	$86,\!62\%$	>1000 1000 500 212	$ \begin{array}{r} 46.7 \\ 40.0 \\ 10.7 \\ 2.7 \end{array} $

Tabella 2.1: Composizione e Graniulometria



Figura 2.4: Granulometria

2.4 Criomacinazione

Allo scopo di ridurre la granulometria della matrice in maniera efficiente e senza correre il rischio di degradarla a causa del surriscaldamento generato da una macinazione meccanica, si è ricorsi alla criomacinazione. La procedura prevede l'immersione del campione in azoto liquido fino ad avvenuto congelamento. In seguito il campione viene inserito in un macinatore da laboratorio (Waring Blender, HGBTWTS360). Sono sufficienti pochi secondi di trattamento per ottenere un fine particolato. La matrice è stata poi setacciata per recuperare i diversi tagli di interesse. Sono state condotte estrazioni a diverse granulometrie, e tutte sono state ottenute tramite questo protocollo di comminuzione.

2.5 Degrasaggio

Dallo studio della letteratura risulta frequente un'operazione di pretrattamento mirata ad allontanare la fase lipidica dai raspi di *Vitis vinifera*. Per questo motivo si è proceduto a preparare della matrice degrassata, da testare in seguito per l'estrazione. Un quantitativo noto di raspi (7,5 g) viene inserito in un pallone in Pirex da 250 mL insieme ad una quantità di n-esano che rispetti il rapporto solido/liquido di 1 a 20. Il pallone, sigillato e protetto dalle radiazioni luminose, viene fissato tramite pinza e ritto su una piastra magnetica per garantire l'agitazione del sistema. Il pretrattamento viene protratto per 12 ore. Al termine la soluzione viene filtrata e il solido, lavato con solvente fresco, viene poi raccolto e lasciato sotto cappa affinché l'esano di cui è imbibito evapori. Il liquido risultante viene fatto evaporare tramite rotovapor (LabTech, EV311H) e se ne quantifica la resa.

2.6 Estrazioni

I parametri utilizzati per iniziare l'attività di laboratorio sono stati scelti dopo un'attenta ricerca in letteratura. È stato deciso di mantenere il rapporto di 1/20 tra matrice vegetale e solvente, poiché da studi ed esperimenti risultava essere una scelta abbastanza frequente e funzionale. Ancora. più importante è stato mantenere una temperatura di estrazione il più possibile prossima a quella ambiente o che comunque non superasse i 45°C affinché non si andasse incontro a degradazione dei componenti antiossidanti che, in quanto termolabili, degradano ad una temperatura di 80°C circa. Si è deciso comunque di adottare quella soglia di temperatura per assicurare un'estrazione a freddo senza dispendio energetico. Di seguito vengono elencate le diverse procedure adoperate.

2.6.1 Estrazione con *cup horn*

In una tipica estrazione 7,5 g di raspi sono aggiunti a 150 ml di acqua potabile. Il tutto viene introdotto nel reattore R.E.U.S., collegato con tubi in silicone all'acqua di rete per la camicia di raffreddamento. Il flusso d'acqua viene adeguato per il mantenimento della temperatura, che viene monitorata ogni 5 min per mezzo di una termocoppia. Si controlla l'efficienza del sistema valutando l'eventuale deposizione di cake di matrice sul trasduttore. La conformazione del reattore permette facilmente di condurre l'estrazione al riparo dalla luce.

2.6.2 Estrazione con *Horn* a immersione

In una tipica estrazione con *Ti-horn*, 7,5 g di raspi sono stati pesati direttamente nel ditale in Pirex utilizzato per il sonotrodo, a cui vengono aggiunti 150 ml di acqua. Il contenitore viene fissato con pinza e ritto all'*horn*, assicurandosi che la punta della sonda venga inserita a circa 1 cm sotto il livello della soluzione, per garantire la migliore efficienza di sonicazione. Il sistema di refrigeramento è provvisto da un bagno di ghiaccio posto sotto il vessel di vetro. La temperatura di esercizio viene costantemente monitorata tramite una termocoppia, mentre l'estrazione viene coperta in modo da avvenire al riparo dalle radiazioni luminose.

2.6.3 Estrazione convenzionale

Nelle estrazioni convenzionali, 7,5 g di raspi sono stati pesati direttamente in un pallone in vetro Pyrex da 250 ml, a cui vengono addizionati un'ancoretta magnetica ed il giusto quantitativo di solvente (150 ml) per rispettare il rapporto solido/liquido definito di 1/20. Il pallone viene collegato ad un condensatore a bolle ed immerso in un bagno d'olio siliconico fino a ricoprire la soluzione in esso contenuta. L'immersione avviene solamente una volta che il bagno raggiunge la temperatura desiderata, raggiunta tramite sistema piastra riscaldante e termocoppia. Sono state condotte estrazioni a diverse temperature: 31,07°C, 31,45°C, 39,53°C, 38,23° (temperature di esercizio per confronto con US) , 80°C, 100°C, 95°C (temperatura di esercizio per estrazioni convenzionali). L'estrazione viene coperta in modo da avvenire al riparo dalle radiazioni luminose

2.6.4 Work up post estrazione

Al termine di ogni estrazione, la soluzione viene filtrata con un sistema sottovuoto composto da beuta codata e filtro sinterizzato la cui dimensioni dei pori è di 40-100 μ m. al quale viene addizionato un ulteriore filtro di carta per prevenire il passaggio di particolato. Il solido viene ulteriormente lavato con il relativo solvente fresco. La frazione liquida viene raccolta, unita e quantificata. Da essa vengono prelevati 80 ml poi sottoposti a centrifugazione (4000 rpm per 30 min) per rimuove-re eventuali residui solidi che falserebbero le rese di estrazione. Il surnatante viene poi trasferito in un pallone in vetro Pyrex da 250 ml e congelato con azoto liquido per la liofilizzazione (Telstar LyoQuest, operante a 0,2 mbar e -60°C). Il solido ottenuto costituisce l'estratto finale, che viene pesato e conservato a 4°C, lontano da fonti luminose. Nel caso l'estrazione in esame preveda l'utilizzo di etanolo (sia concentrato che in miscela idroalcolica), la frazione alcolica viene eliminata prima della liofilizzazione tramite sistema evaporativo sotto vuoto.

2.7 Analisi

2.7.1 Quantificazione polifenoli totali - TPC

Il metodo di *Folin-Ciocalteau* viene impiegato per valutare il contenuto totale di polifenoli (TPC) che ogni prodotto di estrazione possiede. Si prepara la soluzione madre inserendo in un matraccio da 100 mL un quantitativo di estratto (50 mg o 100 mg, può variare in base al tipo di estratto) e poi si porta a volume con acqua deionizzata: la soluzione deve essere limpida e priva di particelle di estratto in sospensione, la solubilizzazione può essere aiutata tramite un rapido passaggio del matraccio in un bagno ad ultrasuoni.

Per la preparazione dei campioni analitici si procede ad addizioni successive all'interno di provette, descritte come segue. Sette concentrazioni crescenti di soluzione madre sono impiegate per l'analisi da 0 a 250 μ L, a cui si addiziona del DMSO (1:1 H₂O) in modo da mantenere il volume finale delle diverse soluzioni invariato a 250 μ L. Successivamente si inseriscono in tutte le provette 4mL di acqua deionizzata, 500 μ L di carbonato di sodio (10% molare con acqua distillata) e 250 μ L di reattivo di *Folin-Ciocalteau* (in rapporto 1:1 con acqua deionizzata). Il tutto è riassunto nella tabella sottostante (2.2)

Le provette vengono agitate per favorire la miscelazione e poi vengono lasciate a reagire per 25 minuti. Il tempo serve affinché i composti fenolici reagiscano con il reattivo di *Folin-Ciocalteau* che porta al viraggio di colorazione nei campioni dal verde al blu, come illustrato in Figura2.5. Il TPC viene determinato usando uno spettrometro UV-vis (Cary 60 UV-VIS, Agilent Technologies), registrando l'assorbanza a 725nm tramite *cuvette* con cammino ottico di 1 cm (vd. Fig2.5).

	CAMPIONI						
	0	1	2	3	4	5	6
Sol.Madre $[\mu L]$	0	25	50	100	150	200	250
DMSO $[\mu L]$	250	225	200	150	100	50	0
$\rm H_2O_{\rm \ dist}\ [mL]$				4			
$Na_2CO_3 \ [\mu L]$				500			
Folin-Ciocalteau $[\mu L]$				250			

Tabella 2.2: Metodo Folin-Ciocalteau



Figura 2.5: Campioni per analisi Folin-Ciocalteau

Il TPC viene espresso in equivalenti di acido gallico, perciò è stata necessaria una retta di taratura sull'acido gallico, costruita secondo il metodo sopra descritto, sostituendo alla soluzione madre di estratto, una soluzione a titolo noto dello standard. Si illustra ora come determinare il TPC finale:

- Si calcolano i μm/mL di equivalenti di acido gallico (GAE) contenuti nella soluzione madre. Detti q ed m rispettivamente la pendenza e l'intercetta con l'asse x della retta di taratura, si sottrae all'assorbanza ottenuta dal campione di sola soluzione madre la q, e si divide il risultato per m.
- Una volta ottenuto il GAE si calcola il fattore di conversione dell'estratto rispetto ai polifenoli totali, dividendo il GAE della soluzione per la concentrazione della soluzione madre (250 μ m/mL).
- Per ottenere il quantitativo di estratto secco finale si opera invece come segue in 2.2:

$$Estratto \ Secco = Secco \ Liofilizzato * \frac{mLtotali}{mLLiofilizzati}$$
(2.2)

Da cui si estrapolano i polifenoli totali nell'estratto

$$Polifenoli \ Totali = Estratto \ Secco * \frac{GAE \ Soluzionemadre}{Concentrazione \ Soluzionemadre}$$
(2.3)

• Si trova quindi il TPC espresso come mg di acido gallico equivalenti su grammi di matrice estratta:

$$TPC = Polifenoli Totali \div Matrice Estratta$$
 (2.4)

2.7.2 Cinetica di Peleg

Peleg nel 1988 [37] determinò un modello che potesse definire la cinetica di assorbimento dell'umidità descritto dall'equazione di una curva iperbolica:

$$M(t) = M_0 + \frac{t}{k_1 + k_2 t} \tag{2.5}$$

dove M(t) è il quantitativo dell'umidità in funzione del tempo, M_0 è la quantità di acqua contenuta nella matrice a tempo 0 e k_1 e k_2 sono le due costanti che descrivono il sistema fisico. Si dimostra facilmente che l'umidità di equilibro, M_E , è data per t $\rightarrow\infty$ definita come segue:

$$M_{\rm E} = M_0 + \frac{1}{k_2} \tag{2.6}$$

Il modello descritto ha un andamento rappresentato in Figura 2.6.



Figura 2.6: Cinetica di Peleg [37]

Qualsiasi modello di assorbimento può essere descritto da quanto esposto sopra,

e nello specifico può anche essere impiegato per descrivere un'estrazione solidoliquido. L'equazione 2.5 può essere riscritta nella forma seguente, sostituendo all'umidità il quantitativo di estratto considerato:

$$y(t) = y_0 + \frac{t}{k_1 + k_2 t} \tag{2.7}$$

dove y(t) rappresenta la resa in TPC al tempo t (mg_{GAE}/g_{db}), espressa come mg di GAE su grammi di matrice secca (db, dry base), y₀ nel caso in questione è zero, essendo nulla la concentrazione iniziale di estratto nel liquido estraente. k₁ è la "rate constant" (min·mg_{GAE}/g_{db}) e k₂ "capacity constant" (g_{db}/mg_{GAE}). Analogamente per t $\rightarrow\infty$ si definisce y_S che in questo casa rappresenta la resa in TPC massima estraibile paragonata alla resa con metodi convenzionali (vd. sez.2.6.3), la saturazione dunque. Nel caso di un'estrazione solido-liquido un altro parametro importante è B₀ ossia *initial extraction rate* definito come 1/k1 che rappresenta la velocità di estrazione iniziale. Il parametro può essere studiato anche a tempi diversi, valutando il B(t) è possibile descrive l'efficienza di estrazione in ogni istante del processo.

Il modello di Peleg, dunque, permette di dare un significato fisico ai dati sperimentali raccolti nelle varie prove, in modo tale da raccogliere i valori sperimentali in una equazione cinetica di estrazione teorica. Per definirla è necessario linearizzare la 2.7 nella forma seguente [37]:

$$\frac{t}{y(t)} = k_1 + k_2 t \tag{2.8}$$



Figura 2.7: Linearizzazzione

ťý(t)

K₁

Coefficiente di trasferimento volumetrico - k_La

Una volta definita la cinetica di estrazione teorica è possibile definire il tempo

t

ottimale di estrazione, ossia il tempo subito prima del gomito della curva. Al tempo ottimale scelto corrisponde un valore di resa grazie alla quale è possibile calcolare il coefficiente di trasferimento $k_{L}a$.

La Figura 2.8 permette di visualizzare come all'interno del mezzo vari, seguendo un gradiente, la concentrazione dei composti fenolici nel solido e come si comporti di conseguenza la resa di estrazione. Ipotizzando una situazione in cui tutti i composti passino dal solido nel liquido, si può notare come la concentrazione nel solido tenda a zero e come la resa tenda al valore massimo $(y(t)\rightarrow y_S)$; contestualmente, la concentrazione nel liquido aumenta a seguito del suo arricchimento.



Figura 2.8: Tasporto di materia e cinetica di Peleg

Di seguito viene riportata la trattazione matematica che gestisce il fenomeno del trasporto di materia affinché si possa ottenere l'equazione per il calcolo del coefficiente di trasferimento $k_{L}a$.

Definiamo a priori il flusso di materia come definito dall'equazione di Fick 2.9

$$J_{\rm Az} = -D_{\rm A} \frac{dC_{\rm A}}{dz} \tag{2.9}$$

È noto che il flusso è costante e che quindi la sua derivata è nulla

$$J_{\rm Az} = cost \tag{2.10}$$

$$\frac{dJ_{\rm Az}}{dz} = 0 \tag{2.11}$$

Allora sostituendo la 2.9 nella 2.11 otteniamo che

$$-D_{\rm A}\frac{d^2C_{\rm A}}{dz^2} = 0 \tag{2.12}$$

e integrando la 2.12

$$-D_{\rm A}\frac{dC_{\rm A}}{dz} = C_1 \tag{2.13}$$

si trova quindi, dal paragone della 2.9 con la 2.13, che $J_A=C_1$. Per trovare C_1 si integra:

$$\int dC_{\rm A} = \int_0^\delta -\frac{C_1}{D_{\rm A}} dz \tag{2.14}$$

$$C_{\rm A} = -\frac{C_1}{D_{\rm A}}z + C_2 \tag{2.15}$$

Per trovare le due costanti C_1 e C_2 vengono imposte le condizioni al contorno z=0 per cui $C_A=C_{AS}$ che è il valore massimo estraibile dal solido, e a $z=\delta$ per cui $C_A=C_{A\delta}$ che rappresenta la concentrazione estratta e trasferita nel mezzo. Effettuate le sostituzioni si ottengono due equazioni che messe a sistema risolvono

per le costanti. Si trova che

$$C_2 = C_{\rm AS} \tag{2.16}$$

$$C_1 = \frac{D_{\rm A}}{\delta} (C_{\rm AS} - C_{\rm A\delta}) \tag{2.17}$$

$$C_1 = k_{\rm L} (C_{\rm AS} - C_{\rm A\delta}) \tag{2.18}$$

$$J_{\rm A} = k_{\rm L} (C_{\rm AS} - C_{\rm A\delta}) \tag{2.19}$$

Si definisce poi che il flusso all'interfaccia $J_{A, z=o}=k_La(C_{AS}-C_{A\delta})$ è uguale alla variazione nel tempo; si definisce quindi la 2.20

$$J_{A,z=o} = k_{L}a(C_{AS} - C_{A\delta}) = \frac{dC_{A}}{dt}$$
(2.20)

e conseguentemente

$$k_{\rm L}a(C_{\rm AS} - C_{\rm A}(t)) = \frac{dC_{\rm A}}{dt}$$

$$\tag{2.21}$$

$$k_{\rm L}adt = \frac{dC_{\rm A}}{(C_{\rm AS} - C_{\rm A}(t))} \tag{2.22}$$

$$\int_{0}^{t} k_{\rm L} a \, dt = \int_{0}^{C_{\rm A}} \frac{1}{(C_{\rm AS} - C_{\rm A}(t))} \, dC_{\rm A} \tag{2.23}$$

Integrando la 2.23 si ottiene che

$$k_{\rm L}at = -\ln(\frac{C_{\rm AS} - C_{\rm A}}{C_{\rm AS}}) \tag{2.24}$$

Dunque per ricavare k_{La} basta esplicitare la 2.24 e si ottiene

$$k_{\rm L}a = -\frac{\ln(\frac{C_{\rm AS} - C_{\rm A}}{C_{\rm AS}})}{t} \tag{2.25}$$

Risulta dal modello matematico che per il calcolo della costante si deve conoscere la concentrazione C_A al tempo t (il tempo ottimale di estrazione) ed il valore della concentrazione di saturazione C_{AS} .

2.7.3 IWC – Institute of Wood Chemistry, Riga, Lettonia

IWC è un'organizzazione statale indipendente *no-profit* supervisionata dal 'Ministero della Pubblica Istruzione e della Scienza della Repubblica di Lettonia'. Il suo scopo è lo sviluppo di tecnologie scientifiche eco-sostenibili e senza sprechi per ottenere prodotti e materiali dal legno o da biomasse derivanti dal legno.

Analisi Qualitativa LC-MS/MS

L'analisi del campione è stata eseguita tramite sistema Acquity UPLC (Waters Corp., Singapore) abbinato a uno strumento MS quadripolo (Q-TOF, Synapt Q-TOF MS, Waters, Milford, MA, USA) con fonte di ionizzazione di tipo elettrospray (ESI). La ionizzazione è stata condotta sia in modalità positiva che negativa. La colonna utilizzata per la separazione è del tipo U-HPLC (2.1mm x 50mm i.d., 1.7 μ m, BEHC18) (Waters Acquity) con una portata di 0.35 mL*min⁻¹. Come eluente viene utilizzato acido formico allo 0,1%, acqua (A) e acetonitrile (B).

Il metodo di iniezione utilizzato è un sistema a solvente a gradiente, le cui percentuali sono riportate Tabella2.3.

I principali parametri operativi per la Q-TOF MS sono stati impostati come segue in Tabella2.4.

Tempo (min)	%(A)			
0-1	95-80~%			
1-5	80-75 $\%$			
5-6	75-25 $\%$			
6-7	25-20 $\%$			
Volume Iniezione: 1 $\mu {\rm L}$				

Tabella 2.3: Determinazione Contenuto Caffeina

Parametro	Valore	Unità di Misura					
Tensione capillare	2,5 (-); $3,5$ (+)	kV					
Tensione del cono	60	V					
Flusso di gas a cono	100	L/h					
Temperatura della sorgente	120	$^{\circ}\mathrm{C}$					
Temperatura di Desolvatazione	400	$^{\circ}$ C					
Portata	600(-);750(+)	m L/h					
Gas di Collisione: Argon							
Gas di Desolvatazione: Azoto							
Modalità di ionizzazione: Positiva e Negativa							
Quantificazione dei Flavonoidi

Il contenuto totale dei flavonoidi è stato determinato secondo la procedura di *Zhou et. al.* **2011** [39], che prevede l'impiego dell'ossicloruro di zirconio. Viene inserito in due provette un quantitativo di 1ml dell'estratto iniziale (0,01% in metanolo).

- In una provetta vengono aggiunti 7 ml di metanolo
- Nell'altra vengono aggiunti 1 ml di ZrOcl₂-8-H₂O al 2% e 6 ml di metanolo

Le soluzioni sono state miscelate nelle due provette e dopo un'ora è stata misurata l'assorbanza a 463 nm con lo spettrofotrometro (Perkin Elmer Lambda 650 UV-VIS) . Il quantitativo totale di flavonoidi viene espresso in equivalenti di rutina $[mg_{rutina}/g_{extract}]$, tramite una retta di taratura.

Quantificazione delle Proantocianidine

Il contenuto totale di proantocianidine è stato determinato tramite il metodo di Hagerman, **1995** [38], il quale prevede di estrarre i campioni con 10 ml di una soluzione acquosa al 70% di acetone contenente 5,26 mM di Na₂S₂O₅ per 20 minuti in un bagno ad ultrasuoni a temperatura ambiente. Dopo, la soluzione viene quindi centrifugata e il surnatante raccolto. I residui vengono sottoposti alla medesima estrazione per altre tre volte e tutte le aliquote di estratti riunite. A 1 ml del campione finale vengono addizionati, all'interno di provette di propilene, 5 ml di una soluzione composta da 95% butan-1-olo e 5% HCl. Le provette vengono riscaldate in un bagno termostatato a 95°C per 1h e, dopo raffreddate, si procede alla lettura dell'assorbanza a 550 nm su uno spettrofotometro. La quantificazione viene fatta usando la proantocianidina B2 come composto di riferimento.

Caratterizzazione delle proprietà antiossidanti

- **DPPH** L'attività antiossidante degli estratti è stata definita tramite la prova del radicale libero DPPH. L'attività di *scavenging* dei radicali liberi viene espressa come IC_{50} ossia come la concentrazione necessaria per l'inibizione del 50% dei radicali liberi.
- ORAC La prova ORAC applicata ad una cinetica determina il potenziale antiossidante nella prevenzione dell'ossidazione della fluorescina. I valori numerici finali di ORAC sono stati calcolati tramite una regressione lineare (i.e. Y=aX+b) mettendo in relazione la concentrazione di Trolox (50-100 μm in PBS) con l'area sottesa dalla curva di decadimento della fluorescina.

La capacità di assorbanza dei radicali viene espressa in equivalenti di Trolox (TE) come mmol per grammi del campione di antiossidante.

2.7.4 Analisi qualitativa GC-MS

Le analisi di GC-MS sono state condotte in un '*GC Agilent* 6890 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA USA)' che è stato munito di un mass detector '*Agilent Network* 5973', usando una colonna HP-5 (colonna capillare lunga 30 m con un diametro interno di 0,25 mm e lo spessore del *film* di 0,25 μ m).

Le condizioni a cui lavora il GC sono le seguenti: *split* di iniezione 1:20; temperatura dell'iniettore 250°C; temperatura del *detector* 280°C. Il gas di supporto è l'elio (1,2 mL/min) e il programma di temperatura è: da 70°C (2 min) a 300 °C con un aumento di 5°C al minuto. I singoli componenti sono stati individuati tramite i cromatogrammi GC/MS dalla libreria 'MS NIST 14'.

2.7.5 Analisi qualitativa LC-MS

Le analisi di LC-MS sono state condotte tramite un sistema 'Column Fluidics Organizer (Waters Corp., Singapore)' abbinato ad un campionatore '2767 Sample Manager (Waters)'. La ionizzazzione è stata condotta sia in modalità positiva che in negativa (mass detector con Δ =100-600). La colonna utilizzata è del tipo Sinergy 4µm Hydro-RP 80 Å (250 x 4,6 mm). Gli eluenti impiegati sono stati acqua allo 0,1% di acido formico di(A) e acetonitrile (B).

Due metodi a gradiente sono stati utilizzati: Acidi fenolici e Catechine. Entrambi lavorano con un volume di iniezione di 20 μ L e con un flusso di 1 mL/min. Di seguito le Tabelle 2.5 e 2.6 riportano i gradienti di ciascun metodo.

Acidi fenolici		ei		Cat	techine	
Tempo min	%(A)	%B	Т	empo min	%(A)	%B
0	100	0		0	92	8
6.50	100	0		3.0	92	8
30.0	50	50		21.0	50	50
36.0	0	100		33.0	0	100
42.0	0	100		45	0	100

Tabella 2.5: Metodo: Acidi Fenolici

Tabella 2.6: Metodo: Catechine

Per poter portare eseguire le analisi tramite LC-MS è stato fondamentale definire una caratterizzazione degli standard in modo da poter poi procedere all'identificazione qualitativa di quei determinati componenti nel campione indagato. Sono quindi stati preparati dei campioni contenenti delle miscele di standard e analizzati con i metodi di cui sopra. Sono poi stati raccolti tutti i parametri utili al loro riconoscimento e illustrati nelle tabelle 2.7 - 2.12



Continua nella prossima pagina

GTC Green Tea Cat mix Metodo: Catechine								
Composto	$R_t ~ UV$ [min]	R_t Massa $[min]$	$[M-H]^+$ uma	Picco				
(Epi)Catechina-3-gallata	22,3	22,74	443	Metodo: Catechine Catho: 22.74 1: Soun E3- 43 100 22.70 20.15 20.19 22.59 22.39 22.41 22.39 22.41 22.39 22.41 22.42 22.39 22.41 22.45 22.39 22.41 22.42 22.39 22.41 22.42 22.39 22.41 22.42 22.39 22.41 22.42 22.42 22.42 22.42 22.39 22.41 22.42 22.4				
Gallocatechina	20,1	20,5	307	Metodo: Catechine Cathlor 9-38 1: Scan ES- 100 9-38 0: Soci 2,51 9-50, 10,20 2,55 9-50, 10,20 2,56 9-50, 10,20 2,56 9-50, 10,20 2,56 9-50, 10,20 2,56 9-50, 10,20 10,20 9-50, 1				
Caffeina	19,03	19,46	195	Metode: Catechine Catifut. 19.46 1: Scan ES- 100 19.41 19.50 19.50 19.51 19.65 19.55				

 $Continua\ dalla\ pagina\ precedente$

 $Si\ conclude\ dalla\ pagina\ precedente$



Tabella 2.7: LC/Massa, ST mix 2



Tabella 2.8: LC/Massa, ST mix 3



Tabella 2.9: LC/Massa, ST mix 4



Tabella 2.10: LC/Massa, ST mix 5 $\,$



Tabella 2.11: LC/Massa, ST mix 6

2.7.6 Analisi HPLC-DAD

Una procedura analoga a quella per l'analisi qualitativa di LC-MS è stata seguita anche per le analisi quantitative di HPLC-DAD. È stato impiegata un 'Waters binary pump 1525' abbinato ad un '2998 photodiode array (PDA) detector'. La colonna utilizzata è del tipo Sinergy 4 μ m Hydro-RP 80 Å (250 x 4,6 mm). Gli eluenti impiegati sono stati acqua allo 0,1% di acido formico (A) e acetonitrile (B). I metodi impiegati sono i medesimi (vd. sec.2.7.5) e si ricordano le Tabelle 2.5 e 2.6 che riportano le percentuali dei gradiente di ciascun metodo. Anche in questo caso, volume di iniezione di 20 μ L con un flusso di 1 mL/min.

Prima di analizzare i campioni, sono stati iniettati nello strumento i diversi standard per poter ottenere tutte le informazioni necessarie al riconoscimento del singolo componente nei campioni di interesse. Le immagini seguenti racchiudono il necessario per la caratterizzazione. Si noti anche la presenza dei parametri della regressione lineare utili poi all'analisi quantitativa.

			Metodo	λ		Regress	essione lineare		
Composto	Formula	MW	UV <u>spectrum</u>	HPLC	(nm) area HPLC	R: [min]	а	b	R2
(-)-Epicatechin >=90%	OH	290.27	1.00-234.7	Acidi Fenolici Catechine	280	26,28 20,99	19.246.401,9 18.168.594,3*	197.966,6 -18.248,6*	0,996 1,000
(-)-Epicatechin (from Green Tea Cat mix Cerilliant 0.1001 mg/ml)	носторон		0.50	Catechine		21,10	15.822.086,1*	3.730,1*	1,000
(+)-Catechin >=99%	OH	290.27	233.5	Catechine	280	16,4			
(+)-Catechin (from Green Tea Cat mix Cerilliant 0.1000 mg/ml	но н		0.00 5 33.3 \$ 46.6	Catechine		16,56	16.097.740,8	566,7	0,999
Caffeine (from Green Tea Cat mix Cerilliant 0.1000 mg/ml)	H ₃ C _N O N CH ₃ N N N N N N N N N N N N N N N N N N N	194.19	0.20 232.4	Catechine	280	20,4	57.002.093,9	55.390,3	0,999
(-)-Gallocatechin (from Green Tea Cat mix Cerilliant 0.1000 mg/ml)	но он он он он	306.27	232.4 0.06 2 0.04 0.02 2 0.04 0.02 2 0.04 0.02 2 0.04 0.02 2 0.04 0.02 0.04 0.02 0.04 0.05 0.04 0.05 0.04 0.05 0.04 0.05 0.04 0.05 0.04 0.05 0.04 0.05 0.04 0.05 0.04 0.05 0.04 0.05 0.04 0.05 0.04 0.05	Catechine	280	7.65	4.693.475,5	- 3.263,9	0,999
(-)-Epigallocatechin 3- gallate >=80%	он он он	458.37	232.4 0.40 0.20	Catechine	280	21.6	33.967.761,0	- 78.132,4	0,998
(-)-Epigallocatechin 3- gallate (from Green Tea Cat mix Cerilliant 0.1000 mg/ml)	но он он он		0.00 250.00 300.00 350.00 400.00 450.00 500.00 550.00 nm	Catechine	280		27.969.516,3	- 81.311,7	1,000
(-)-Gallocatechin 3-gallate (from Green Tea Cat mix Cerilliant 0.1001 mg/ml)	но странон он он он он он он он он	458.37	0.20 275.9 0.00	Catechine	280	23.4	30.435.268,8	- 92.381,2	1,000

Figura 2.9: Standard per HPLC-DAD

(-)-Epicatechin 3-gallate	OH	442.37	0.40 232.4 278.3	Catechine	280	27.4	37.738.725,5	1.550,1	1,000
(from Green Tea Cat mix Cerilliant 0.1000 mg/ml)	он он он		0.20						
	но он		0.004						
(-)-Catechin 3-gallate (from Green Tea Cat mix Cerilliant 0.09998 mg/ml)	OH OH HO OH OH OH OH OH OH	442.37	0.20 0.00 250.00 300.00 350.00 400.00 450.00 550.00 nm	Catechine	280	28.16	38.103.747,3	- 103.741,7	1,000
Chlorogenic acid		354,31	1.50 1.00 0.50 0.00	Acidi Fenolici	340	24.8	54.804.533,4	- 2.738,6	0,999
Caffeic acid	О ОН	180.16	2.00 1.00 0.00	Acidi Fenolici	340	26.5	90.220.998,2	114.048,4	0,999
Ferulic acid	но осн ₃	194.18	2.00 1.00 0.00 250.00 300.00 350.00 400.00 450.00 500.00 550.00 nm	Acidi Fenolici	340	30.02	91.718.218,1	61.329,6	1,000
<i>p</i> -Cumaric acid	но	164.16	233.5 0.00 250.00 300.00 350.00 400.00	Acidi Fenolici	340	29.5	36.055.298,9	159.980,5	0,998
Veratric acid		182.17	2.00 260.8 1.00 250.00 300.00 350.00 400.00 450.00 500.00 550.00 nm	Acidi Fenolici	280	30.7	35.018.911,0	42.935,9	1,000

Figura 2.10: Standard per HPLC-DAD

43



Figura 2.11: Standard per HPLC-DAD

44

Capitolo 3

Risultati e Discussione

3.1 Quantificazione TPC

3.2 Quantificazione TPC

Come descritto nella sezione 2.7.1 la quantificazione dei polifenoli totali è stata ottenuta tramite metodo di *Folin-Ciocalteau*, previa costruzione di una retta di taratura con uno standard di acido gallico. In Tabella 3.1 sono riportati i volumi prelevati dalla soluzione standard a concentrazione nota (0,25 mg/mL) e le relativa assorbanze misurate

TARATURA									
Campione	Prelievo	ABS							
	μL	А							
Bianco	0	0,0708							
1	25	0,0619							
2	50	$0,\!1160$							
3	100	0,2320							
4	150	0,3185							
5	200	0,4203							
6	250	0,5471							

Tabella 3.1: Retta di taratura

Dalla Figura 3.1 si notano il coefficiente angolare della retta e la sua intercetta (m=0,002 e q=0,0332) che permettono di passare da assorbanza a GAE (acido gallico equivalenti) tramite l'equazione 3.1

$$GAE = \frac{ABS - q}{m} \tag{3.1}$$



Figura 3.1: Retta di taratura

Cosi facendo, i valori di assorbanza ottenuti dalle singole prove vengono espressi in GAE per il calcolo di TPC finale (vd. sec2.7.1)

3.3 Degrassaggio

Tramite la procedura descritta nella sezione 2.5 è stata valutata la percentuale lipidica della matrice per valutare potesse costituire una frazione importante di raspi di *Vitis vinifera* e influenzare l'estrazione successiva. La percentuale individuata è risultata attestarsi intorno all'1%, quindi troppo bassa per poter essere considerata rilevante nella caratterizzazione della matrice in esame. Al fine di verificare se nonostante l'esigua quantità di materiale lipofilo, la sua rimozione dai raspi possa andare a modificare le rese estrattive in polifenoli, alcuni campioni precedentemente degrassati sono stati utilizzati per i test riportati nei paragrafi a seguire.

3.4 Estrazione Convenzionale

Le seguenti prove sono state tutte condotte con il sistema a riflusso descritto nella sezione 2.2.1 e seguendo la procedura descritta in 2.6.3 Con le estrazioni convenzionali, dunque, si è voluto definire la quantità massima estraibile, con un dato sistema fisico (temperatura e solvente), ponendola come obiettivo da raggiungere tramite le estrazioni US-assistite le quali, grazie ad un rapido confronto del TPC, sono state poi valutate in termini di efficienza operativa.

Al fine di identificare il sistema più corretto da utilizzare, sono stati investigati diversi solventi, granulometrie della matrice e numero di successivi *step* estrattivi. In primis si è considerato un confronto tra acqua ed etanolo, rispettivamente il solvente utilizzato nei test ad US ed il mezzo estrattivo d'elezione per i polifenoli. Lo screening preliminare è stato effettuato con due stadi estrattivi in modo da assicurare l'esaurimento della matrice, la quale è stata impiegata come ricevuta dal fornitore ($d_0>1000 \ \mu m$), per ridurre al minimo le variabili coinvolte.

Prova No.	Solvente	Step	d_0	Т	\mathbf{t}	Estratto Secco	$\mathrm{TPC}^{\mathrm{a}}$
			$\mu { m m}$	$(^{\circ}C)$	(\min)	(mg/g)	(mg/g)
EXT01-TA-058	H_2O	1°	>1000	100	180	345,31	1,83
EXT01-TA-059	H_2O	2°	>1000	100	180	292,06	$13,\!61$
						Г	Cot: 15,44
EXT01-TA-051	EtOH	1°	>1000	80.0	180	213,76	$30,\!68$
EXT01-TA-052	EtOH	2°	>1000	80.0	180	$36,\!59$	4,83
						Г	lot: 35,51

Tabella 3.2: Estrazioni convenzionali - confronto solvente

^a : il valore di TPC é stato calcolato su base secca di matrice

Come si può notare dalle rese estrattive espresse in polifenoli totali (vd. Tab3.2), l'etanolo risulta avere l'affinità migliore con il prodotto desiderato. L'estrazione a ricadere ha temperature soggette ai diversi punti di ebollizione. È necessario considerare che l'elevato valore richiesto per l'acqua può portare, durante il processo, alla degradazione dei composti fenolici. Questo aspetto è stato successivamente indagato con dei test appositi, che avvengono a temperature ridotte (il tutto sarà discusso nella sezione 3.5.4).

Definito il solvente migliore, si è considerato che lo scarto su cui si lavora è estremamente recalcitrante dal punto di vista fisico (alto contenuto di lignina). Questa caratteristica può limitare fortemente l'efficienza della cavitazione nella comminuzione e nella distruzione delle membrane cellulari. Si è rivelato necessario perciò uno studio che definisse gli effetti della riduzione granulometrica della biomassa di partenza sull'estrazione con etanolo . Con lo scopo di ottenere solamente un andamento relativo, si è proceduto con un singolo step estrattivo che tenesse in considerazione 3 granulometrie differenti: una non macinata (>1000 μ m), e due macinate (500 μ m e 212 μ m). Il procedimento applicato per ottenere le diverse frazioni è riportato nella sez. 2.4

Prova No.	Solvente	d_0	Т	t	Estratto Secco	$\mathrm{TPC}^{\mathrm{a}}$
		$\mu { m m}$	$(^{\circ}C)$	(\min)	(mg/g)	(mg/g)
EXT01-TA-016	EtOH	>1000	80.0	180	$214,\!05$	30,44
EXT01-TA-028	EtOH	500	80.0	180	229,44	$35,\!21$
EXT01-TA-029	EtOH	212	80.0	180	$253,\!37$	$36,\!56$

Tabella 3.3: Estrazioni convenzionali - screening matrice

^a : il valore di TPC é stato calcolato su base secca di matrice

I risultati in Tabella 3.3 dimostrano come la comminuzione sia in grado di incrementare l'estraibilità dei composti polifenolici dalla matrice. Valutando i dati raccolti si è deciso di considerare in parallelo il miglior risultato ottenuto (212 μ m) contemporaneamente allo scarto non pretrattato con macinazione. Questo ci ha permesso di definire, al termine del lavoro, l'impatto di un passaggio addizionale al processo di estrazione prendendo in considerazione il miglioramento complessivo a fronte di un costo aggiuntivo al processo. Per poter ottemperare a questo obiettivo è stato necessario ottenere una quantificazione totale del TPC con etanolo, definibile solo tramite esaurimento della matrice. Partendo dai dati preliminari ottenuti, si è ripetuta un'estrazione multi-step in etanolo a ricadere, come già fatto per l'acqua. I dati per questi test vengono riportati in Tabella 3.4.

Tabella 3.4: Estrazioni convenzionali - esaurimento matrice

Prova No.	Solvente	Step	d_0	Т	t	Estratto Secco	$\mathrm{TPC}^{\mathrm{a}}$
			$\mu { m m}$	$(^{\circ}C)$	(\min)	(mg/g)	(mg/g)
EXT01-TA-044	EtOH	1°	212	80.0	180	240,12	38,01
EXT01-TA-045	EtOH	2°	212	80.0	180	$67,\!51$	$10,\!81$
						Т	ot: 48,82

^a : il valore di TPC é stato calcolato su base secca di matrice

Si può notare che il TPC riportato in Tab. 3.3 e quello ottenuto dal primo stadio della Tab. 3.4 non risultano identici, ma la variazione del valore è stata ritenuta trascurabile nella valutazione della riproducibilità del dato, in quanto intrinseca alla tipologia di *test* spettroscopico utilizzato.

Dai dati sperimentali risulta che l'etanolo permette di avere valori di resa più alti rispetto alle estrazioni condotte con acqua, ma a livello industriale progettare un impianto estrattivo che impieghi come solvente solo etanolo, oltre ad essere oneroso a livello economico, è anche altamente impattante per l'ambiente. Basandosi su questo, si è svolta un'estrazione in soluzione idroalcolica. Sono molto più comuni impianti che usano una miscela $H_2O/EtOH$ invece che etanolo puro, anche per ovviare al rischio di infiammabilità. Per la quantificazione in miscela idroalcolica dei raspi, ci si è rivolti a dati di letteratura, in modo da non dover sviluppare uno studio apposito, non essendo lo scopo di questo lavoro di tesi. Il risultato ottenuto applicando il protocollo individuato ([36]) ha permesso di ottenere un valore di TPC molto più elevato rispetto ai precedenti, andando anche a ridurre il quantitativo di etanolo impiegato. Si noti come il tempo di estrazione della EXT01-TA-063 e della EXT01-TA-056 sia di soli 23 min, in netto contrasto con i 180 min delle precedenti. La Tabella 3.5 illustra quanto commentato.

Tabella 3.5: Estrazioni convenzionali - Soluzione idroalcolica

Prova No.	Solvente	d_0	Т	t	Estratto Secco	$\mathrm{TPC}^{\mathrm{a}}$
		$\mu { m m}$	$(^{\circ}C)$	(\min)	(mg/g)	(mg/g)
EXT01-TA-056	$\rm H_2O/EtOH$	>1000	95	23	348,46	37,04
EXT01-TA-063	$H_2O/EtOH$	212	95	23	266,47	$63,\!60$

^a : il valore di TPC é stato calcolato su base secca di matrice

I valori di TPC ottenuti con queste estrazioni, considerati come quantità massima estraibile, sono stati, come scritto in precedenza, presi come termini di confronto per i metodi innovativi e sostenibili. Per poter raggiungere questi valori sono state indagate sia la soluzione di estrazione singola che doppia.

3.5 Estrazione Singola

3.5.1 Cup horn

Le prove con il R.E.U.S.S. (vd. 2.1.1, procedura descritta in 2.6.1) sono state finalizzate allo studio in scala di laboratorio di un sistema estrattivo assistito da US, utilizzando come solvente esclusivamente acqua. I test sono stati poi impiegati per ricavare un modello fisico che potesse definirne il comportamento e la cinetica di estrazione. Il parametro cardine è stato, come anticipato in precedenza, la valutazione del TPC ottenuto.

Si è innanzitutto proceduto a verificare gli effetti del pretrattamento di degrassaggio sulla matrice (vd. 2.5). Esiste la possibilità che eliminando la frazione più lipofila dell'estratto, la successiva estrazione dei polifenoli venga agevolata. Si è scelto di procedere con un tempo di estrazione medio (30 min) e sulla matrice più grosso-lana, in modo da non sovrapporre molteplici modifiche ai parametri sperimentali.

Prova No.	$d_0 \ \mu m$	TEMPO (min)	Estratto Secco (mg/g)	$\frac{TPC^{a}}{(mg/g)}$
EXT01-TA-001	>1000	30	332,29	28,24
EXT01-TA-008 ^b	>1000	30	296,85	28,39

Tabella 3.6: Estrazione singola R.E.U.S.S. - degrassaggio

^a : il valore di TPC é stato calcolato su base secca di matrice

^b : Il campione di matrice è stato degrassato

La Tabella 3.6 riporta i valori ottenuti. Si nota come tra la prova EXT01-TA-001 e EXT01-TA-008 non ci siano sostanziali differenze: il pretrattamento di degrassaggio quindi non migliora il processo estrattivo. Insieme alla valutazione della resa estrattiva ottenute nel paragrafo 3.3, queste evidenze sperimentali hanno portato a scartare ulteriori prove combinate degrassaggio-*cup horn*.

Il *set* di prove principale (vd. Tab. 3.7), volto a definire una cinetica estrattiva per il sistema, è stato svolto a tempi differenti ed utilizzando i raspi d'uva senza nessun pretrattamento (quindi a granulometria grossolana), in modo da considerare un processo più semplificato possibile.

Andando ad osservare i valori di TPC ottenuti si nota come il tempo ottimizzato di estrazione sia di 45 min, poiché la prova a 60 min presenta una diminuzione del quantitativo dovuta verosimilmente alla degradazione del materiale.

Prova No.	${ m d}_0 \ \mu{ m m}$	TEMPO (min)	Estratto Secco (mg/g)	$\frac{\rm TPC^a}{\rm (mg/g)}$
EXT01-TA-035 EXT01-TA-014 EXT01-TA-036 EXT01-TA-015 EXT01-TA-037 EXT01-TA-017	>1000 >1000 >1000 >1000 >1000 >1000	2 5 8 10 12 15	$273,21 \\ 253,70 \\ 291,41 \\ 331,51 \\ 290,02 \\ 321,03 \\ 321,03 \\ 3$	$15,69 \\ 16,03 \\ 21,71 \\ 22,95 \\ 24,42 \\ 26,25 \\ 20,24$
EXT01-TA-001 EXT01-TA-018 EXT01-TA-002	>1000 >1000 >1000	$\begin{array}{c} 30 \\ 45 \\ 60 \end{array}$	$332,29 \\ 305,49 \\ 299,29$	28,24 31,89 23,96

Tabella 3.7: Estrazione singola R.E.U.S.S. - screening tempo

^a : il valore di TPC é stato calcolato su base secca di matrice

La Figura3.2 riassume in un grafico i valori di TPC in relazione ai diversi tempi. Non è visibile un vero e proprio *plateux*, come ci si aspetterebbe dalla teoria di Peleg, poiché a 60 min abbiamo il decremento di cui sopra. Si può ipotizzare che lo stadio stazionario si possa trovare nei pressi di 45 min, qualora si andasse ad infittire quell'intorno con ulteriori prove. In figura sono anche inserite per confronto le rese massime ottenute con le estrazioni convenzionali (vd. tabelle nella sez.3.4).



Figura 3.2: Resa vs. Tempo - R.E.U.S.S

Con i dati raccolti è stato possibile trarre due tipologie di conclusioni: 1) sul confronto della tecnologia e dei solventi impiegati, 2) sull'esaurimento della matrice.

- 1. Confrontando i risultati ottenuti insieme ai dati convenzionali, sulla medesima granulometria di matrice ed in base al solvente utilizzato (tenendo lo stesso d₀), si vede come la UAE in *cup-horn* sia estremamente più efficace rispetto all'estrazione a caldo con acqua già dai primi minuti di lavoro. I sistemi di quantificazione più performanti, quelli basati su etanolo e sulla miscela idroalcolica, invece, risultano superiori e non raggiungibili dal UAE, anche se prossimi al TPC ottimizzato nel R.E.U.S.S. .
- 2. Al fine di valutare l'effettivo esaurimento della matrice, è stata confrontata l'efficienza estrattiva del sistema ad US applicato su $d_0>1000 \ \mu m$, con il protocollo di quantificazione in idroalcolica su matrice a 212 μm (linea continua azzurra), massimizzandone in questo modo la resa. In questo modo si nota come ci sia un sostanziale incremento in TPC, e come un singolo

step estrattivo US-assistito non sia sufficiente per ottenere una percentuale di esaurimento della matrice soddisfacente (ca. 50%). Verranno considerate in seguito sia l'opzione di un differente sistema di cavitazione (Ti-*horn*) sia l'utilizzo di un ulteriore passaggio estrattivo.

Un altro confronto è stato eseguito al fine di valutare l'eventuale sinergia della comminuzione della matrice con la cavitazione. Per fare ciò ci si è concentrati nella zona più prossima a quella ritenuta di equilibrio (30 e 45 min), in modo da studiare il sistema nella zona di stabilità massima.

Prova No.	$d_0 \ \mu m$	TEMPO (min)	Estratto Secco (mg/g)	$\frac{\mathrm{TPC}^{\mathrm{a}}}{(\mathrm{mg/g})}$
EXT01-TA-001 EXT01-TA-070	>1000 212	30 30	332,29 407.83	28,24 29,11
EXT01-TA-018 EXT01-TA-031	>1000 212	$\begin{array}{c} 45\\ 45\end{array}$	$305,49 \\ 344,88$	$31,89 \\ 34,00$

Tabella 3.8: Estrazione singola R.E.U.S.S. - confronto granulometria

^a : il valore di TPC é stato calcolato su base secca di matrice

I valori di TPC ottenuti con un taglio di matrice più piccolo mostrano degli incrementi, dovuti al fatto che la superficie specifica esposta è maggiore. Tuttavia l'incremento in polifenoli totali non è tale da giustificare l'utilizzo di un pretrattamento accoppiato ad un sistema estrattivo *cup-horn*. Anche in questo caso il valore di TPC della *EXT01-TA-031* risulta più alto del test a 30 min, confermando che l'ottimizzazione sia indicativamente intorno ai 45 min.

3.5.2 *Horn* a immersione

Lo scopo delle estrazioni svolte utilizzando il Ti-*horn* (lo strumento e le procedure da seguire sono elencate nel capitolo 2) è il medesimo di quello prefissato per i test in *cup-horn*.

Anche in questo caso si sono verificati gli effetti del pretrattamento di degrassaggio, procedendo con un tempo di estrazione medio di 30 min e sulla matrice a $d_0 > 1000$ μ m. I dati raccolti sono riportati in Tabella 3.9. Anche per le estrazioni svolte con questo sistema si nota come il pretrattamento non comporti un miglioramento nella resa, anzi si registra una lieve diminuzione del TPC sul campione EXT01-TA-007. Il tutto è ancora una sicuramente correlato alla variabilità intrinseca del test spettroscopico utilizzato. Ancora una volta, sono state scartate le prove combinate degrassaggio-Ti-*horn*.

Prova No.	$d_0 \ \mu m$	TEMPO (min)	Estratto Secco (mg/g)	$\frac{TPC^{a}}{(mg/g)}$
EXT01-TA-006	>1000	30	330,99	$ \begin{array}{r} 26,03 \\ 25,64 \end{array} $
EXT01-TA-007 ^b	>1000	30	373,79	

Tabella 3.9: Estrazione singola Ti-horn - degrassaggio

^a : il valore di TPC é stato calcolato su base secca di matrice

^b : Il campione di matrice è stato degrassato

La tabella 3.10 racchiude il set di prove principali effettuate con l'*horn* ad immersione. Anche in questo caso sono stati utilizzati i raspi d'uva come ottenuti dal fornitore per considerare un processo semplificato. Osservando i valori di TPC si nota come non sia presente la prova a 60 min, non testata considerando la resa ottenuta con il R.E.U.S.S. .

Tabella 3.10: Estrazione singola Ti-horn - screening tempo

Prova No.	${ m d}_0 \ \mu{ m m}$	TEMPO (min)	Estratto Secco (mg/g)	$\frac{\mathrm{TPC}^{\mathrm{a}}}{(\mathrm{mg/g})}$
EXT01-TA-038	>1000	2	160,82	10,75
EXT01-TA-009	>1000	5	180,07	10,86
EXT01-TA-040	>1000	8	$238,\!07$	$14,\!22$
EXT01-TA-013	>1000	10	$261,\!62$	$15,\!27$
EXT01-TA-039	>1000	12	262,97	15,76
EXT01-TA-005	>1000	15	$248,\!24$	$17,\!12$
EXT01-TA-006	>1000	30	$330,\!99$	26,03
EXT01-TA-019	>1000	45	287,11	$26,\!59$

^a : il valore di TPC é stato calcolato su base secca di matrice

La Figura3.3 riassume in forma grafica i TPC su diversi tempi. In questo caso il *plateaux* è più visibile, ma è anche evidente come i valori di resa delle estrazioni US-assistite siano molto più distanti da quelli ottenuti con le estrazioni convenzionali. Si noti come il valore TPC ottenuto con il sistema convenzionale in acqua (linea tratteggiata azzurra), venga eguagliato ai 10 minuti di UAE. Le rese a tempi brevi sono minori rispetto al sistema precedente, in quanto con il R.E.U.S.S. si superava immediatamente la resa della quantificazione in acqua. Il tutto è probabilmente correlato al fattore temperatura la cui gestione con il Ti-*horn* è facilitata e riesce ad impedirne l'eccessivo aumento. L'influenza della temperatura, è stata comunque indagata in seguito nel paragrafo dedicato (vd. Sec.3.5.3).

Poiché la la resa registrata a 30' e 45' è definibile come identica, si è deciso di

definire come tempo ottimale di estrazione 30 min solo per ragioni di semplicità di processo. Si guadagna un tempo di lavoro di 15', ma con un TPC invariato.



Figura 3.3: Resa vs. Tempo - Ti-horn

L'incidenza della sinergia comminuzione-cavitazione è stata indagata anche nel sistema Ti-*horn*. Osservando la Tabella 3.11 viene confermato quanto detto sopra: la comminuzione migliora sensibilmente la resa di estrazione, incremento osservabile a tutti i tempi d'estrazione considerati.

Prova No.	${ m d}_0 \ \mu{ m m}$	$\begin{array}{c} \text{TEMPO} \\ \text{(min)} \end{array}$	Estratto Secco (mg/g)	${ m TPC^a} \ ({ m mg/g})$
EXT01-TA-040	>1000	8	238,07	$14,22 \\ 22,51$
EXT01-TA-042	212	8	284,38	
EXT01-TA-005 EXT01-TA-069	>1000 212	$\begin{array}{c} 15\\ 15\end{array}$	$248,24 \\ 384,67$	$17,12 \\ 25,77$
EXT01-TA-006	>1000	30	330,99	26,03
EXT01-TA-026	500	30	346,38	26,55
EXT01-TA-027	212	30	401,73	34,08

Tabella 3.11: Estrazione singola Ti-horn - confronto granulometria

^a : il valore di TPC é stato calcolato su base secca di matrice

3.5.3 Effetto Temperatura su horn ad immersione

Le seguenti prove sono state eseguite al fine di indagare l'influenza della temperatura sulla resa di estrazione. Come è stato descritto nella sezione 2.1.2 il Ti-*horn* non ha un sistema di refrigeramento integrato ma esterno, ottenuto tramite un bagno di ghiaccio. Questo rende possibile un ottimo controllo della temperatura di estrazione, tanto da riuscire a condurre l'estrazione a temperatura costante con un *offset* di ± 0.5 °C. Per questo motivo è stato possibile condurre due set di prove in cui il calore viene dissipato in misura differente. Le temperature considerate $(27\pm0.5 \text{ e } 40\pm0.5 \text{ °C})$ sono state scelte per verificare la variazione dei TPC in funzione della T, all'interno del *range* permesso dagli US. Tutti i parametri sono rimasti invariati dai test precedenti, ad eccezion fatta per i tempi. Dall'analisi della Tabella 3.12 e dalla Figura3.4 si nota come una netta differenza ci sia applicando tempi brevi, dove la temperatura alta favorisce l'estrazione; a tempi più lunghi, prossimi al valore ottimizzato, i TPC dei due test sono invece quasi sovrapponibili, arrivando a definire uno stato stazionario di *plateaux* combaciante.

	Ti-horn	Ti- $horn$ @T=40°C		
Tempo	Prova No.	$\mathrm{TPC}^{\mathrm{a}}$	Prova No.	$\mathrm{TPC}^{\mathrm{a}}$
(\min)		(mg/g)		(mg/g)
5	EXT01-TA-009	10,86	EXT01-TA-024	15,70
10	EXT01-TA-013	$15,\!27$	EXT01-TA-023	17,07
15	EXT01-TA-005	$17,\!12$	EXT01-TA-022	26,32
30	EXT01-TA-006	$26,\!03$	EXT01-TA-021	26,73
45	EXT01-TA-019	$26,\!59$	EXT01-TA-025	29,71

Tabella 3.12: Effetto temperatura

^a : il valore di TPC é stato calcolato su base secca di matrice



Figura 3.4: Resa vs. Tempo - Ti-horn vs. Ti-horn (@T=40°C)

3.5.4 Confronto US vs Convenzionale

Si è proceduto ad un confronto diretto con le tecniche convenzionali (procedura descritta nella sezione 2.6.3). Il protocollo estrattivo ottimizzato in US è stato riprodotto in un sistema CSTR, impiegando i medesimi tempi e temperature, relativi alle diverse granulometrie di matrice. Considerando l'assenza di agitazione magnetica nei sistemi a cavitazione acustica, e non avendone definito un profilo fluidodinamico, si è scelto di sovrastimare il numero di rpm da impiegare nel sistema convenzionale.

Sono state scelte le prove al tempo ottimizzato svolte con il R.E.U.S.S. (45 min) sia a d₀>1000 μm che a d₀=212 μm e di ciascuna è stata calcolata la temperatura media di estrazione, rispettivamente 39,53°C e 38,23°C. In seguito le stesse condizioni sono state replicate con il sistema a riflusso; l'istogramma nella Figura3.5 riassume quanto ottenuto.



Confronto R.E.U.S.S

Figura 3.5: US vs. Convenzionali

• In modo analogo sono state scelte le prove ottimizzate in Ti-horn (30 min), anche in questo caso con entrambi i diametri, la cui temperatura media di estrazione della prova a $d_0>1000 \ \mu m$ è 31,07°C, mentre quella a $d_0=212 \ \mu m$ è 31,45°C. Queste condizioni di tempo e temperature sono state replicate con il sistema a riflusso ottenendo le rese in TPC visibili in Figura3.6



Figura 3.6: US vs. Convenzionali

Si può notare come lo scarto che si viene a creare tra le rese in TPC delle due tecniche rimane abbastanza costante per ogni diametro. Come si può notare da un'analisi della Tabella 3.13, la dimensione della matrice non ha ripercussione diretta sulla tecnica impiegata, ma solo sul trasporto di massa nell'estrazione. L'aumento di efficienza per la UAE è pressoché invariato per le diverse condizioni/sistemi considerati, attestandosi a circa un terzo in più rispetto al modello CSTR.

Tecnica	d_0	ΔTPC	Aumento
	$\mu { m m}$	$\mathrm{mg}_{\mathrm{GAE}}/\mathrm{g}_{0}$	%
R.E.U.S.S.	>1000 212	$7,39 \\ 6,9$	$\begin{array}{c} 30\\ 25 \end{array}$
Ti-horn	>1000 212	$6,9 \\7,97$	$\frac{36}{31}$

Tabella 3.13: Confronto UAE vs conv

3.5.5 Caratterizzazione cinetica estrattiva - modello di Peleg

Secondo quanto descritto e commentato nella sezione 2.7.2 è stata costruita la curva teorica cinetica teorica per il sistema estrattivo R.E.U.S.S., utilizzando i dati

sperimentali raccolti.

Secondo la linearizzazione definita dall'equazione 2.8 si ottiene quanto mostrato in Figura 3.7:



Figura 3.7: Linearizzazione dati sperimentali - R.E.U.S.S.

Dalla retta si ricavano i parametri teorici per il modello di Peleg che sono riportati in Tabella 3.14:

k_1	k_2
${\rm min}{\cdot}g_{\rm dw}/mg_{\rm GAE}$	$g_{\rm dw}/mg_{\rm GAE}$
0,16	0,028

Tabella 3.14: Parametri teorici

Ottenute le due costanti cinetiche, tramite l'equazione 3.2

$$y(t) = \frac{t}{0,16+0,028t} \tag{3.2}$$

è stato possibile definire la curva teorica del modello di Peleg e si ottiene quanto mostrato in Figura3.8 (curva arancione). Si nota come i risultati sperimentali siano concordi in buona misura con la curva teorica fino al tempo massimo di 45 min. Superato la linea rossa (a), il dato sperimentale è completamente discorde dal modello ottenuto. Ciò è spiegabile considerando che, come anticipato, il valore dei TPC crolla drasticamente dopo un'ora di estrazione, suggerendo l'insorgere di fenomeni degradativi. Si deve a questo punto tener conto che il modello di Peleg descrive un trasporto di massa (indipendentemente dalla direzione) senza però valutare altri effetti, quali ad esempio quelli di degradazione. Il fenomeno risulta perciò non descrivibile dal modello considerato, e pertanto il dato a 60 min non è stato considerato ai fini dell'estrapolazione delle costanti cinetiche. Non si è proceduto oltre con lo studio degradativo dei composti polifenoli nel sistema, non essendo questo tema aderente allo scopo della tesi. L'andamento della cinetica suggerisce che sia più vantaggioso lavorare sul ginocchio, poiché lì la forza spingente è maggiore. In quel punto (frecce nere su grafico) viene calcolato il B₀ definito come 1/k₁. Nel caso in questione, ad un tempo di 7 min, si ottiene un B₀=2,81 [mg_{GAE}/min·g_{dw}]. È stato poi possibile definire la massima quantità teorica estraibile in un singolo stadio secondo la cinetica di Peleg, definendo la y_s con t $\rightarrow\infty$ dell'equazione 2.8 come segue:

$$y_{\rm s} = \frac{1}{k_2} \tag{3.3}$$

Con una k_2 di 0,028 $[g_{dw}/mg_{GAE}]$ si ottiene una $y_s=35,09$ $[mg_{GAE}/g_{dw}]$ valore molto vicino a quanto riportato in tabella 3.7, ed indice perciò del fatto che lo studio del sistema d'estrazione è stato eseguito correttamente, giungendo prossimi al punto di equilibrio raggiungibile.

La medesima operazione è stata fatta con i dati sperimentali raccolti con il Ti-*horn*. La Figura3.9 mostra la linearizzazione dei dati sperimentali.

I parametri cinetici relativi sono raccolti in Tabella 3.15 :

essi permettono di ottenere l'equizione cinetica teoria (3.4)

k ₁	k_2
${\rm min}{\cdot}g_{\rm dw}/mg_{\rm GAE}$	$g_{\rm dw}/mg_{\rm GAE}$
0,36	0,029

Tabella 3.15: Parametri teorici

$$y(t) = \frac{t}{0,36+0,029t} \tag{3.4}$$

dalla quale si ottiene la curva visibile nella Figura 3.10. Anche in questo caso le rese in TPC sperimentali sono coerenti alla curva di estrazione ricavata teoricamente. In modo analogo (vd. 3.3) è stato poi calcolato il valore di B₀ per il punto di gomito a 7 min: $B_0=1,77$ [mg_{GAE}/min·g_{dw}]. Si procede poi anche al calcolo della



Figura 3.8: Cinetica di estrazione - Sperimentale(R.E.U.S.S.) vs Teorica



Figura 3.9: Linearizzazione dati sperimentali - Ti-horn

massima quantità teorica estraibile con un singolo stadio con il Ti-*horn*: con una k₂ di 0,029 [g_{dw}/mg_{GAE}] si ottiene una y_s=34,36 [mg_{GAE}/g_{dw}].

Per ogni punto sperimentale è stato poi anche calcolata la $k_{L}a$ secondo la 2.25.



Figura 3.10: Cinetica di estrazione - Sperimentale(Ti-horn) vs Teorica

R.E.	R.E.U.S.S.		Ti-horn		
t [min]	$k_{\rm L}a[1/s]$	t [min]	$k_La [1/s]$		
2	0,14	2	0,09		
5	0,06	5	$0,\!04$		
8	$0,\!05$	8	$0,\!03$		
10	$0,\!04$	10	$0,\!03$		
12	$0,\!04$	12	$0,\!02$		
15	$0,\!02$	15	$0,\!02$		
30	$0,\!02$	30	$0,\!02$		
45	$0,\!02$	45	$0,\!01$		
60	$0,\!01$				

I valori ottenuti sono racconl
ti nella tabella 3.16

Tabella 3.16: Calcolo $\mathbf{k}_{\mathrm{L}}\mathbf{a}$

3.6 Estrazione Doppia

Si sono considerati i risultati delle UAE ad un unico stadio, unitamente alla distanza tra i TPC ottenuti all'equilibrio e quelli totali delle quantificazioni e per valutare l'avvicinamento all'esaurimento della matrice ed incrementare la resa estrattiva, è stato testato un set di doppie estrazioni. Si è scelto di utilizzare per questo screening il sistema horn ad immersione, considerando che questa tecnica, in scala di laboratorio, è la più semplice da mantenere a basse temperature, riducendo quindi gli effetti dovuti al riscaldamento. I test sono stati eseguiti considerando le due granulometrie finora considerate, tenendo come riferimento i tempi di estrazione ottimizzati. Un primo set di prove è stato svolto con lo scopo di valutare l'effetto di "pretrattamento" fisico degli ultrasuoni sulla matrice, anteponendo un primo breve step estrattivo breve di 8 minuti, in modo da ridurre al minimo la rimozione dei polifenoli, ma operando al contempo una comminuzione dei raspi. Gli 8 minuti sono stati utilizzati poiché già facenti parte del set di dati sperimentale. Al primo stadio ne viene fatto seguire un secondo svolto a tempi ottimizzati (45 min). I dati attesi sfortunatamente non dimostrano l'effetto atteso, auspicato soprattutto per la matrice grossolana. La seconda estrazione risulta avere TPC simili o addirittura inferiori alla prima. Si può concludere da questi valori che, su passaggi estrattivi brevi, ha più incidenza il trasporto di massa incrementato dalla dimensione delle particelle, che l'effetto distruttivo degli US. Su $d_0>1000$ invece i suddetti effetti fisici non sono sufficienti per portare ad un incremento delle rese. In funzione di questi dati, si è svolta un'ulteriore prova, adottando la matrice a 212 μ m. I raspi sono stati sottoposti a due stadi estrattivi applicando i tempi ottimizzati (45 min). Come atteso, il primo passaggio è stato il più efficiente, superando il EXT01-TA-042 dell'33%, mentre il secondo è risultato pressoché invariato rispetto all' EXT01-TA-043. Risulta, dal confronto con le prove descritte nella Tab.3.4, risulta che la doppia estrazione (45'+45) US-assistita a diametro fine fornisca una resa estrattiva pressoché comparabile a quella ottenuta con i metodi convenzionali. Risulta però maggiore del *plateaux* ottenuto tramite studio cinetico (vd. Tab.3.10) che viene ampiamente superato. Tutti i dati commentati sono raccolti nella tabella 3.17

Prova No.	d_0	TEMPO	ESTRATTO SECCO	TPC^{a}	TOT
	(μm)	(11111)	(IIIg/g)	(mg/g)	(mg/g)
1° EXT01-TA-040	>1000	8	$238,\!07$	$14,\!22$	31
2° EXT01-TA-041	>1000	45	60,76	16,78	51
1° EXT01-TA-042	212	8	284,38	$22,\!51$	29 61
2° EXT01-TA-043	212	45	45,32	$16,\!13$	38,04
1° EXT01-TA-032	212	45	326,25	30,04	47.0
2° EXT01-TA-033	212	45	49,33	$17,\!86$	47,9

Tabella 3.17: Estrazioni doppie Ti-horn

^a : il valore di TPC é stato calcolato su base secca di matrice

3.7 Analisi qualitativa GC-MS

Tutti i composti identificati tramite GC-MS sono riassunti in Tabella 3.18 e hanno permesso la caratterizzazione qualitativa della frazione lipidica tramite frammentazione e ionizzazione elettronica (vd. Sec2.7.4). La Figura3.11 mostra il cromatogramma del campione analizzato.



Figura 3.11: Cromatogramma GC-MS

Si notano tra i diversi componenti presenti, alcune famiglie di grande interesse quali gli Steroli e gli acidi grassi. Si noti anche la presenza di Vitamina E.

Time	Compounds	Time	Compounds
min		min	
27:04	Hexadecanoic acid, methyl	36:74	Octacosanol
	ester		
27:22	9-Hexadecanoic acid	36:68	Eicosane
27:48	n-Hexadecanoic acid	37:19	Vitamin E
28:74	cis-13 Octodecanoic acid,	38:42	Campesterol
	methyl ester		
29:16	9,12- Octadecanoic acid	38:78	Stigmasterol
	(Z,Z)		
29:35	$Octa de canoic \ acid$	39:55	. gamma sitosterol
32:13	Penta cos ane	39:71	Sitosterol
32:61	Bis~(2-ethylhexyl)phtalate	40:13	.alphaAmyrin
33:66	Hepta cos ane	40:78	Taraxasterolo
34:65	Oxirane, hexadecyl-	41:54	Androst-4-en-3-one, 17-hydroxy-
			,(17.alpha.)-
35:09	Nona cos ane	43:63	Methyl 3.betahydroxyolean-18-
			en-28- $oate$
36:21	$1, 19 extsf{-}Eicosadiane$	44:08	1-(2-Methoxyphenyl)-2,5-
			dihydro-1H- $pyrole-2,5$ - $diane$

Tabella 3.18: Caratterizzazione frazione lipidica

3.8 Analisi qualitative LC-MS

Si è svolto un primo screening compositivo dell'estratto idrofilico, nello specifico confrontando un campione ottimizzato in US (EXT01-TA-031) e il campione ottenuto con l'estrazione idroalcolica convenzionale (EXT01-TA-064). Lo studio degli standard è stato preceduto da un'indagine preventiva delle masse ottenute in funzione della composizione attesa secondo letteratura. Una volta identificati sommariamente i composti principali, si è proceduto con l'utilizzo dei riferimenti commerciali disponibili come descritto nella sezione 2.7.5. Si espone nelle tabelle 3.19 e 3.20 una panoramica sui composti riconosciuti. Le figure seguenti, invece, mostrano i cromatogrammi UV e MS registrati dallo strumento.

		(/	
Composto	$\mathrm{R}_t \; \mathbf{UV}$	$\rm R_t$ Massa	$[M-H]^+$	Metodo
	$[\min]$	$[\min]$	uma	
Acido Ferulico	$26,\!33$	26,52	195	Acidi Fenolici
Quercetina	$25,\!87/-$	$26,\!35/32,\!35$	303	Acidi Fenolici
Canferolo	27,49/-	27,49/34,88	287	Acidi Fenolici
Acido Gallico	11,50	$11,\!82$	465	Acidi Fenolici
Acido Protocatecuico	-	$19,\!23$	155	Acidi Fenolici
Acido p-Cumarico	-	$22,\!57$	165	Acidi Fenolici
Catechina	-	$18,\!46$	291	Catechine
Epicatechina	-	22,57	291	Catechine

LC-MS - EXT01-TA-031 (UAE)

Tabella 3.19:	Analisi	LC-MS	su	ottimizzato	UAE
Tabella 5.19:	Anansi	LC-M2	\mathbf{su}	ottimizzato	UAL

Composto	$\mathrm{R}_{\mathrm{t}}~\mathbf{UV}$	$\rm R_t$ Massa	$[M-H]^+$	Metodo
	$[\min]$	$[\min]$	uma	
Acido Ferulico	-	$26,\!48$	195	Acidi Fenolici
Q-3-Glc	-	$25,\!47$	465	Acidi Fenolici
Quercetina	$25,\!85/31,\!78$	26,22/32,18	303	Acidi Fenolici
Σ -Viniferina	$32,\!90$	$33,\!40$	455	Acidi Fenolici
Canferolo	-	$27,\!42/35,\!05$	287	Acidi Fenolici
Acido Protocatecuico	-	$19,\!24$	155	Acidi Fenolici
Acido p-Cumarico	-	$22,\!67$	165	Acidi Fenolici
Catechina	-	$18,\!54$	291	Catechine
Epicatechina	-	20,51	291	Catechine

LC-MS - EXT01-TA-064 (Convenzionale)

Tabella 3.20: Analisi LC-MS su ottimizzato Convenzionale



Figura 3.12: Spettro del campione ottenuto con UAE con metodo Acidi Polifenolici

67


Figura 3.13: Spettro del campione ottenuto con UAE con metodo Catechine

89



Figura 3.14: Spettro del campione ottenuto con estrazione convenzionale con metodo Acidi Polifenolici

69



Figura 3.15: Spettro del campione ottenuto con estrazione convenzionale con metodo Catechine

70

Si nota come in base al metodo utilizzato, lo spettro della massa cambi notevolmente. Molti picchi, con il metodo 'Catechine', non sono visibili poiché l'eluizione è mirata al riconoscimento prevalentemente della medesima classe di composti. Lo spettro UV con i due metodi non subisce modifiche sostanziali, se non un leggero appiattimento.

Tra i due campioni analizzati non sono visibili differenziazioni di composizione, eccezion fatta per la presenza di ϵ -Viniferia e Q-3-Glc nell'estratto convenzionale e acido gallico nella UAE. Si può comunque osservare una relativa complessità di distribuzione di molecole antiossidanti negli estratti, coerentemente con i dati di letteratura. Si noti che i componenti principali, secondo questa analisi, appartengono alla classe degli acidi fenolici, rilevando solo tracce di catechine. E' necessario evidenziare che gli R_t di alcune molecole non sono stati riportati essendo i relativi picchi coperti della linea di base del cromatogramma UV; è stato comunque possibile risalire alla molecola tramite la massa registrata. Per quanto riguarda la quercetina e il canferolo, si è identificato uno sdoppiamento dei picchi nello spettro UV, rispondente ad un'unica massa. Si è ipotizzato trattarsi di fenomeni degradativi e/o di ripartizione cromatografica, essendosi verificato il medesimo fenomeno anche con i composti commerciali. I picchi di tutti i componenti riconosciuti sono racchiusi in appendice A.

3.9 Analisi HPLC-DAD

All'identificazione effettuata con il sistema LC-MS, resa possibile dagli strumenti di ricerca diretta delle masse, si è affiancato uno strumento analitico più adatto alla quantificazione, in grado di lavorare e registrare concentrazioni anche molto ridotte. L'HPLC-DAD è in grado di lavorare con basse concentrazioni e restituire per ogni picco ottenuto, uno spettro di assorbanza tipico per componente o famiglia di composti.

La procedura analitica ha previsto l'iniezione di ciascun campione secondo due metodi di eluizione differenti (2.7.6), in modo da poter discriminare in maniera efficiente diverse classi di composti in funzione delle relative affinità chimiche. Nello specifico, ogni metodo porta il nome della famiglia di composti che meglio viene risolta (catechine ed acidi fenolici). Ciascuno dei protocolli di analisi prevede una lunghezza d'onda tipica assegnata, nello specifico 280 nm per 'Catechine' e 340nm per 'Acidi fenolici'. Per completezza analitica vengono comunque sempre registrati gli spettri per entrambi i canali, riportando però solamente i casi utilizzabili per fini qualitativi. Questo poiché le tarature (approfondite in seguito) sono state svolte solamente alla lunghezza d'onda specifica per ogni metodo ed effettuate per la quantificazione degli estratti. Dati i numerosi picchi registrati nei cromatogrammi, in netta minoranza con gli standard disponibili (vd. sec.2.7.6), si è stilato un report delle molecole appartenenti a classi di composti noti, valutando la sovrapponibilità dei relativi spettri di assorbanza e quindi degli assorbimenti tipici. Per i rimanenti casi, è stata possibile la quantificazione, dosando gli analiti sullo standard di riferimento (i.e. taratura della catechina per i composti simil-catechina).

Metodo: Acidi fenolici - 340nm

Nelle Tabelle 3.21 e 3.22 sono raccolte le caratterizzazioni dei picchi visibili in Figura3.16 e Figura3.17. Fanno riferimento al campione EXT01-TA-031 (ottimizzato UAE) e al campione EXT01-TA-064 (estratto secondo procedure convenzionali); si noti che i picchi contrassegnati da No. picco sono quelli appartenenti allo standard, mentre i seguenti, col medesimo numero, sono stati associati alla medesima classe tramite il profilo di assorbimento del picco corrispondente. Per questi ultimi non si ha a disposizione nessuno standard. Per l'estratto ottenuto con estrazione classica si osserva un minor numero di picchi rispetto all'estratto in US. Fa eccezione la presenza di ϵ -viniferina, identificabile solo in questo campione.

EXT01-TA-031				
Metodo: Acidi fenolici				
Picco No R_t [M-H] ⁺ Componente				
min	uma			
28,92	465	Quaractin 2 glucosida		
$27,\!54$	400	Querceriii-5-giucoside		
$25,\!16$	195	Acido ferulico		
$29,\!35$	165	Acido p-cumarico		
21,2	155	Acido protocatecuico		
$22,\!8$	341	Acido clorogenico		
28,9	303	Quercetina		
30,11	287	Canferolo		
	Met R _t min 28,92 27,54 25,16 29,35 21,2 22,8 28,9 30,11	$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $		

Tabella 3.21: Identificazione HPLC-DAD (340 nm; Metodo:Acidi Fenolici)



Figura 3.16: Cromatogramma 340nm. Metodo: Acidi Fenolici

EXT01-TA-064				
Metodo: Acidi fenolici				
Picco No	R_t [M-H] ⁺ Componente			
	\min	uma		
2	27,93			
	28,2	465	Quarcatin 3 glucosida	
2	$27,\!66$	400	Quercenn-5-gracoside	
	30,14			
6	$33,\!00$	165	Acido p-cumarico	
9	$23,\!57$	341	Acido clorogenico	
10	$34,\!24$	303	Quercetina	
14	$35,\!07$	455	Epsilon-Viniferina	

Tabella 3.22: Identificazione HPLC-DAD (340 nm; Metodo: Acidi Fenolici)



Figura 3.17: Cromatogramma 340nm. Metodo: Acidi Polifenolici

Metodo: Acidi fenolici - 280nm

La medesima operazione, di cui sopra, è stata effettuata anche registrando l'assorbanza a 280nm, lunghezza d'assorbimento tipica delle catechine. La Figura3.18 mostra un cromatogramma con una interferenza della linea di base tra i minuti 20 e 32 circa. Questo andamento, evidente solo a questa lunghezza d'onda, è stato ipotizzato essere dovuto alla presenza di dimeri od oligomeri di composti catechinici, nominalmente appartenenti alla classe delle proantocianidine. La presenza in letteratura di questi composti nella matrice di partenza corrobora l'ipotesi in questione. Il cromatogramma dell'estratto convenzionale (vd. Fig.3.19) è riportato solo a fini dimostrativi poiché non vi erano picchi identificabili con questo protocollo a causa della forte interferenza delle proantocianidine. I picchi, anche in questo caso, sono caratterizzati come descritto sopra (vd. Tab3.23).

		EXT0	1-'I'A-031		
	Metodo: Acidi fenolici				
Picco No	R _t [M-H] ⁺ Componente				
	\min	uma			
	$23,\!45$				
1	24,02				
1	$24,\!38$	291	Epicatechina		
	24,77				
1	$26,\!85$				
2	28,92	465	Quercetin-3-glucoside		
3	10,68				
2	8,84	171	Acido gallico		
პ	21,72		-		
4	30,56	183	Acido veratrico		
5	$22,\!87$	195	Acido ferulico		
6	25,16	165	Acido p-cumarico		
7	$29,\!37$	-	Componente idrossibenzoico		

Tabella 3.23: Identificazione HPLC-DAD (280 nm; Metodo:Acidi Fenolici)



Figura 3.18: Cromatogramma 280nm. Metodo: Acidi Fenolici



Figura 3.19: Cromatogramma 280nm. Metodo: Acidi Fenolici

Metodo: Catechine - 280nm

Gli stessi campioni sono stati analizzati anche con il metodo 'Catechine' per valutarne il contenuto al loro interno. Anche in questo caso sono state individuati composti assegnabili a classi note, ma non quantificabili. I picchi sono riportati in tabella.

EXT01-TA-031					
	Metodo: Catechine				
Picco No	R _t	[M-H] ⁺	Componente		
	111111	uma			
1	$23,\!17$ $15,\!68$	291	Epicatechina		
2	27,29 28,27	465	Quercetin-3-glucoside		
3	$4,75 \\ 5,36$	171	Acido gallico		
5	16,96	195	Acido ferulico		
7	29,37	-	Componente idrossibenzoico		
8	9,72	155	Acido protocatecuico		
9	$10,\!85$	341	Acido clorogenico		
12	$13,\!59$	443	Catechin-3-gallata		
13 13	$16,20 \\ 11,957$	291	Catechina		

Tabella 3.24: Identificazione HPLC-DAD (280 nm; Metodo:Catechine)



Figura 3.20: Cromatogramma 280nm. Metodo: Catechine

EXT01-TA-064					
	Metodo: Catechine				
Picco No	$ m R_t \ min$	$[M-H]^+$ uma	Componente		
1	20,68 22,68 32,58	291	Epicatechina		
2	$26,85 \\ 27,9$	465	Quercetin-3-glucoside		
3	5,73 7,30 28,6	171	Acido gallico		
6	29,4 33,0	165	Acido p-cumarico		
10 14 15 16	$34,24 \\ 37,75 \\ 9,74 \\ 4,597$	303 455 -	Quercetina Epsilon-Viniferina Derivato acido benzoico[40] Diidroflavonoidi[40]		

Tabella 3.25: Identificazione HPLC-DAD (280 nm; Metodo: Catechine)



Figura 3.21: Cromatogramma 280nm; metodo: Catechine

Confrontando i cromatogrammi registrati a 280nm con il metodo 'Acidi fenolici' si può osservare come per il metodo 'Catechine' la presenza di composti oligomerici proantocianidinici interferisca in minor misura sulla linea di base. Effetto maggiormente visibile per l'estratto UAE, ed in minor misura su quello convenzionale. Ciò è motivabile dal differente gradiente di eluizione del metodo, che porta a desorbire dalla colonna questi composti in maniera più efficiente. Queste considerazioni portano ad ipotizzare un maggior contenuto di proantocianidine nell'estratto convenzionale, un maggior rapporto oligomeri/dimeri od ancora una maggior lunghezza di catena. Al fine di poter valutare questo aspetto, ci si è rivolti ad un Gruppo di ricerca specializzato; l'argomento verrà trattato in seguito (vd. Sec.3.10).

Quantificazione

In funzione dei risultati sopra riportati, si è proceduto alla quantificazione dei diversi componenti, dove possibile, con la procedura che segue. E' stato necessario l'impiego di una retta di taratura ottenuta per regressione lineare. Il picco dello standard sottende un'area, grazie alla quale possono trovarsi i coefficienti della retta specifica per ogni componente (a, b; vd.Fig 2.9 et al.). Con questi dati è poi possibile ottenere la concentrazione in milligrammo di componente sia su grammo di estratto secco che di matrice estratta $[mg_p/g_{dw}]$. La procedura da seguire è stata la seguente:

- 1. Si prepara la soluzione da iniettare a concentrazione nota (C [mg/mL])
- 2. Si definisce l'area del picco interessato
- 3. Tramite i coefficienti della retta di taratura dello stesso standard si trova la concentrazione(C_1 , [mg/mL]) di quel dato componente nell'estratto iniettato, secondo la 3.5

$$C_1 = \frac{AREA - b}{a} \tag{3.5}$$

4. Viene definita la percentuale del componente nell'estratto iniettato

$$\% p/p = \frac{C_1}{C} * 100 \tag{3.6}$$

5. Normalizzazione del contenuto del singolo componente sui grammo di estratto $(C_{pE}, [mg_p/g_{extr}])$ e sui grammi di matrice processata $(C_p, [mg_p/g_{dw}])$.

Le concentrazioni dei singoli componenti vengono sommati per avere una quantificazione numerica totale. Le Tabelle 3.26 e 3.27 racchiude le singole concentrazioni e quelle totali.

EXT01-TA-031				
Componente	λ	C_{pE}	C _p	Metodo
	nm	$\mathrm{mg}_\mathrm{p}/\mathrm{g}_\mathrm{ext}$	$\mathrm{mg}_\mathrm{p}/\mathrm{g}_\mathrm{dw}$	
Acido gallico	280	0,14	0,52	
Simili		0,03	0,12	Acidi fenolici
Simili		$0,\!10$	$0,\!38$	
Acido protocatecuico	280	$0,\!03$	0,11	Acidi fenolici
Acido clorogenico	340	$0,\!02$	0,08	Acidi fenolici
Acido veratrico	280	$0,\!04$	$0,\!15$	Acidi fenolici
Quercetin-3-glucoside	340	$0,\!04$	$0,\!13$	Acidi fonolici
Simili		0,02	0,06	Acidi lenonci
Quercetina ^a	340	$0,\!3$	$1,\!11$	Acidi fenolici
Catechina	280	$0,\!15$	$0,\!56$	
Simili		0,02	0,06	Catechine
Simili		$0,\!24$	$0,\!89$	
Epicatechina	280	$0,\!05$	$0,\!19$	
Simili		0,01	0,04	Catechine
Simili		$0,\!01$	$0,\!04$	
Epicatechina	280	0,76	2,83	
Simili		0,50	1,87	
Simili		$0,\!48$	$1,\!80$	Acidi fenolici
Simili		$0,\!67$	$2,\!49$	
Simili		0,74	2,74	
Canferolo ^a	340	0,04	0,16	Acidi fenolici
Acido ferulico	340	$0,\!09$	$0,\!34$	Acidi fenolici
Conc.Totale		4,47	$16,\!68$	

Tabella 3.26: Quantificazione tramite HPLC-DAD

^a : è stata utilizzata la regressione lineare dello standard di Quercetin-3-glucoside

EXT01-TA-064					
Componente	λ	$C_{\rm pE}$	C_p	Metodo	
	nm	$\mathrm{mg_p/g_{ext}}$	$\mathrm{mg}_\mathrm{p}/\mathrm{g}_\mathrm{dw}$		
Acido clorogenico	340	$0,\!20$	$0,\!62$	Acidi fenolici	
Quercetin-3-glucoside	340	0,28	$1,\!05$		
Simili		2,22	6,84	Acidi fenolici	
Simili		$1,\!13$	$4,\!20$		
Acido p-cumarico	340	$0,\!25$	0,76	Acidi fonolici	
Simili		0,06	$0,\!17$	Actur renonci	
Quercetina ^a	340	$0,\!05$	0,16	Acidi fenolici	
Epsilon-Viniferina	340	$0,\!07$	$0,\!22$	Acidi fenolici	
Epicatechina	280	$0,\!17$	$0,\!53$		
Simili		0,15	0,46	Catechine	
Simili		$5,\!97$	18,38		
Conc.Totale		$10,\!55$	$33,\!39$		

Tabella 3.27: Quantificazione tramite HPLC-DAD

^a : è stata utilizzata la regressione lineare dello standard di Quercetin-3-glucoside

3.10 IWC - Institute of Wood Chemistry (Rig, Lettonia), prof. Telysheva, G

Per approfondire alcuni aspetti delle caratterizzazioni degli estratti, nello specifico la composizione e quantificazione in proantocianidine, e alla valutazione del potere antiossidante, ci si è appoggiati ad un centro di ricerca Lettone, specializzato nella parte analitica.

3.10.1 LC-MS/MS - Identificazione

Sfruttando la tecnologia di frammentazione MS/MS è possibile ricavare la composizione di estratti naturali senza l'utilizzo diretto di standard, ed inoltre è possibile valutare la dimensione di composti di- ed oligomerici. Con questo obiettivo, i campioni analizzati al DSTF sono stati processati anche da IWC. La TabellaB.1 (vd. app.B) riassume i parametri raccolti dei composti trovati nei campioni e la FiguraB.1 mostra i cromatrogrammi ottenuti (i numeri associati ai singoli composti caratterizzano i picchi). I dati sono stati ottenuti tramite analisi in LC-ESI(-)-MS (vd.2.7.3)

Osservando la composizione dei vari estratti (vd. Tabella 3.28) si faccia particolare attenzione ai composti presenti nell'estratto convenzionale, dove accanto a dimeri di procianidina sono presenti anche suoi oligomeri. Ciò conferma quanto ipotizzato nell'analisi dei risultati HPLC-DAD: la loro presenza può portare ad un'interferenza della linea di base.

3.10.2 Quantificazione flavonoidi e proantocianidine

Per meglio caratterizzare gli estratti ottenuti e gli effetti degli US, si è ritenuto necessario confrontare il contenuto di proantocianidine e flavonoidi per mezzo di due tecniche spettroscopiche che li quantificassero indicativamente. Questo permette di quantificare la frazione polimerizzata di flavonoidi (proantocianidine) e quella libera.

I dati delle prove descritte nella sezione 2.7.3 sono raccolti nella tabella 3.29 Per quanto riguarda la determinazione del contenuto totale di proantocianidine (vd.2.7.3) i dati raccolti dalle prove fatte in IWC sono riassunti nella tabella 3.30

Dall'analisi della Tabella 3.29 si può notare come il quantitativo di flavonoidi ottenuto con una singola estrazione in Ti-*horn* (EXT01-TA-019) si di poco inferiore

Campione	Composto
EXT01-TA-019 ^{3.10}	Acido gallico Rutina Canferol-3-O-glucoside-7-ramnoside Isoramnetina Acido citricio Catechina Dimero procianidina
EXT01-TA-033 ^{3.17}	Derivati dimero procianidina Derivati Catechina Isoramnetina Quercetin-3-glucuronide
EXT01-TA-044 + EXT01-TA-045 ^{3.4}	Acido gallicoCanferol-3-O-glucoside-7-ramnosideIsoramnetinaAcido citricioCatechinaDimero procianidinaOligomero procianidinaCanferol-3-O-glucoside-7-ramnosideQuercetin-3-glucuronide

Tabella 3.28: Assegnazione dei Composti

I numeri in apice collegano le tabelle in cui è espresso il tipo di campione

Campione	Rutina equivalenti mg/g
EXT01-TA-019 ^{3.10}	6,53
EXT01-TA-033 ^{3.17} EXT01-TA-044 + EXT01-TA-045 ^{3.4}	$\begin{array}{c} 31,33\\ 9,66\end{array}$

Tabella 3.29: Quantificazione contenuto flavonoidi

I numeri in apice collegano le tabelle in cui è espresso il tipo di campione

al valore ottenuto con un'estrazione convenzionale (EXT01-TA-044 + EXT01-TA-045). Degno di nota il fatto che andando analizzare il campione ottenuto dopo una seconda estrazione del solido esausto (EXT01-TA-033) il valore aumenti drasticamente. Ciò implica che l'aggiunta di uno *step* estrattivo porti un aumento di selettività in flavonoidi.

In Tabella 3.30 si nota come il contenuto totale di proantocinidine sia maggiore nel campione estratto convenzionalmente se confrontato con le UAE. Questa è

Campione	m mg/g
EXT01-TA-019 ^{3.10}	30,5
$EXT01-TA-033^{3.17}$	34,5
EXT01-TA-044 + EXT01-TA-045 ^{3.4}	$47,\! 6$

Tabella 3.30: Quantificazione proantocianidine

I numeri in apice collegano le tabelle in cui è espresso il tipo di campione

un'ulteriore verifica di quanto si evince dalle analisi precedenti. I seguenti composti risultano essere maggiori, nell'estratto convenzionale, poiché presenti anche in forma di dimeri e oligomeri. Non è però confermato che siano presenti per sola affinità chimica, poiché non ci è dato sapere se l'assenza nell'estratto US-assistito si attribuisco ad una non estrazione o ad una frantumazione della struttura per opera degli US stessi.

3.10.3 Potere Antiossidante - DPPH/ORAC

I dati raccolti dalle prove descritte nella sezione 2.7.3 sono riassunti nella tabella 3.31

Campione	ORAC, TE	$DPPH, IC_{50}$
	$\mathrm{mmol/g}$	g/L
EXT01-TA-019 ^{3.10}	$0,\!87$	85,3.
EXT01-TA-033 ^{3.17}	2,86	15,7
EXT01-TA-044 + EXT01-TA-045 ^{3.4}	$1,\!68$	67,1

Tabella 3.31: Proprietà antiossidanti

I numeri in apice collegano le tabelle in cui è espresso il tipo di campione

In generale vale che l'attività antiossidante è tanto più alta quanto il valore di ORAC è alto e il valore di IC_{50} del DPPH è basso. Dall'analisi della tabella è visibile che un primo step estrattivo non sia sufficiente a battere l'estrazione classica, mentre un secondo step estrattivo intensifichi in maniera visibile entrambi i parametri.

Capitolo 4

Scale-Up Industriale

4.1 **Process Description**

La parte progettuale della tesi viene descritta nel capitolo seguente. Il processo ha come scopo la valorizzazione dei raspi dell'uva. L'impianto viene collocato geograficamente nel piemontese, utilizzando gli scarti che derivano da una serie di industrie vinicole in un raggio di 50 km da Asti. Tramite dati statistici la potenzialità dell'impianto si attesta intorno alle 400 ton/y con un turndow ratio che va dal 60% al 110% della potenzialità nominale. Si è ipotizzato che l'impianto potesse funzionare tutto l'anno andando ad eliminare le problematiche relative alla stagionalità del raccolto. Deve quindi prevedersi una fase di essiccamento della matrice per evitare che marcisca essendo comunque un composto organico (questo aspetto è sta solo ipotizzato, non sono stati fatte prove a riguardo). Le caratteristiche dell'impianto vengono riportate nella tabella 4.1.

Tramite prove di laboratorio è stata definita anche la composizione della matrice;

Tipo Alimentazione	Raspi d'Uva
Potenzialità impianto [ton/y]	400
Funzionamento impianto [mesi]	12
Settimane [w]	50
Giorni a settimana $[d/w]$	5
Ore $giornaliere[h/d]$	14
Turndown Ratio Min	$0,\!6$
Turndown Ratio Max	$1,\!10$
Alimentazione oraria [kg/h]	$114,\!30$
Alimentazione MIN [kg/h]	$68,\!57$
Alimentazione MAX $[kg/h]$	125,71

Tabella 4.1: Caratterisiche impianto

la tabella 2.1 racchiude la composizione percentuale reale. La tabella 4.2 invece riporta le composizioni della corrente solida secca in ingresso all'impianto. Sono stati condotti dei rapidi calcoli che valutassero un essiccamento della matrice al 25% circa. Si nota anche che la quota parte dei composti fenolici è stata scorporata dall'ammontare totale organico.

Componente	Composizione w/w	Portatate
		kg/h
Acqua	0,024	$2,\!59$
Fenoli	0,065	6,96
Organico	$0,\!87$	92,73
Altro	0,048	$5,\!156$

Tabella 4.2: Composizione FEED

4.1.1 Panoramica Impianto

L'Impianto, idealmente, prevede una suddivisione in tre sezioni

- 1. Pretrattamento
- 2. Estrazione
- 3. Concentrazione del prodotto

Sulla sezione iniziale e su quella finale non sono stati effettuati calcoli, in quanto nei mesi trascorsi in laboratorio sono state effettuate solo prove per poter ottenere dei dati di partenza da utilizzare nella progettazione della sezione di estrazione. A titolo informativo si può dire che la sezione di pretrattamento è atta all'essicamento della matrice e quindi assicura la possibilità di spalmare la produzione su tutto l'anno e non solo nei mesi del raccolto. La sezione di concentrazione del prodotto è quella che permette di ottenere i composti fenolici puri e in più prevede anche il recupero del solvente.

Per quanto invece riguarda la sezione di estrazione si è cercato di definire un impianto che ripercorresse il più fedelmente possibile le prove svolte in dipartimento. Si prevedono due stadi estrattivi poiché sono stati svolti esperimenti mirati alla ri-estrazione del solido esausto per poter ottenere il più alto valore di resa in polifenoli. Non si è definito un terzo stadio, poiché i risultati ottenuti dopo la seconda estrazione avevano già evidenziato un esaurimento della matrice. Il corpo centrale di ognuno dei due stadi è un estrattore ultrasonico cavitazionale che nello specifico è rappresentato dal *flow-through cell* della *Weber Ultrasonic*. Si è deciso di non dimensionare né un *cup-horn* né un *horn* ad immersione perché i risultati ottenuti hanno dimostrato come sugli ottimizzati la differenza di tecnica è ininfluente sulla resa, per cui la scelta ricade sulla cella della *Weber*, anche per assicurare un processo continuo. La corrente attraversando il Weber viene investita dagli ultrasuoni emessi da una serie di traduttori applicati all'esterno (vd. Figura4.1) della cella e collegati ad un generatore, che favoriscono il trasporto di materia e l'estrazione.



Figura 4.1: Flow-Through Cell

La corrente di solido viene inviata all'estrattore previa miscelazione e comminuzione per aumentare la superficie esposta agli ultrasuoni. Lo slurry che fuoriesce viene inviato ad un decanter per poter simulare la filtrazione sottovuoto che veniva eseguita dopo ogni estrazione. Il recupero del solido e del liquido dopo ogni stadio è stato ipotizzato nell'impianto con delle presse e dei filtri a tamburo rotante posti in successione al decanter. Soluzione simile a quella in laboratorio dove prima di analizzare l'estratto veniva inviato ad una centrifuga per rimuovere il solido rimasto in sospensione.

4.1.2 Sezione di estrazione

Come già detto, per ottimizzare la resa in polifenoli sono stati previsti due stadi in controcorrente riassunti nello schema in Figura4.2. Una volta definite le condizioni al contorno e la composizione della corrente slurry iniziale, è stata calcolata tramite un bilancio di materia la costante di equilibrio k liquido-solido, che definisce l'equilibrio termodinamico che si viene ad imporre all'interno dell'estrattore e esplica con quale composizione la componente di interesse passa dalla fase solida (x) a quella liquida (y). Nello specifico, osservando la Figura4.2, la composizione di polifenoli nella corrente 6 è in equilibrio termodinamico con la corrente 7 secondo quel fattore k indagato. Viene impostato un sistema di equazione tra il bilancio di materia e di equilibrio (y=kx), dove essendo noti i dati sperimentali ottenuti in laboratorio, il suddetto sistema si risolve per l'unica incognita che è la costante k.



Figura 4.2: Estrazione doppio Stadio controcorrente

Viene poi effettuato un calcolo iterativo sul sistema in controcorrente che definisce il numero di stadi necessari al variare del rapporto solido-liquido. Anche qui, viene impostato un bilancio di materia che si ripete per n-stadi e si definisce la composizione finale da raggiungere. Il calcolo procede fino a neutralità, ossia fin quando la composizione del liquido in uscita dallo stadio n-esimo è minore di quella finale imposta prima. Il calcolo si ripete con diversi rapporti L/S e si ottiene la mappa fluidodinamica visibile in Figura4.3



Figura 4.3: Mappatura grafica

Si nota come, sia confermato quanto ottenuto in laboratorio, ossia di operare con un numero di stadi minimo di 2, poiché con un numero di stadi maggiori, si va incontro a zone di impraticabilità definite dai rapporti L/S di 7 e 10.

Il Process Flow Diagram è nell'Appendice D e aiuterà nella descrizione più dettagliata degli stadi. La corrente solida di raspi $(1, \dot{m}=0.1 \text{ [ton/h]})$ essicati,

proveniente dal pretrattamento dove è stata privata del suo contenuto di umidità, nel miscelatore **D-101** incontra la corrente di solvente esausto uscente dal secondo stadio con la quale si trova in rapporto 1/20 (corrente 27). La corrente slurry in uscita viene spostata tramite pompa volumetrica **P-101** al KONMIX dove avviene la comminuzione ad umido per evitare che l'operazione comporti un eccessivo aumento di temperatura. Successivamente la corrente entra nell'estrattore cavitazionale **UR-101** dove si raggiunge l'equilibrio termodinamico, in modo da ottenere nella fase liquida la componente antiossidante presente nella matrice. Per gravità, la corrente in uscita viene inviata al decanter **CS-101** che separa la fase solida (7) da quella liquida (6). Un albero rotante trasporta lo slurry in direzione assiale sino all'uscita delle due correnti:

- La fase liquida (corrente 6, m=1,3 [ton/h]) separata per sedimentazione spontanea, esce dall'alto ed è già pronta per essere inviata alla fase di concentrazione del prodotto
- La fase solida, in uscita dal basso, è ancora imbibita di liquido e quindi viene inviata alla pressa CP-101 -nodo (a) nella Figura4.2- dalla quale si ottiene il solido esausto (9) che viene inviato al secondo stadio estrattivo e una corrente liquida (8, m=0,7 [ton/h]) anch'essa già prodotto.

La corrente 8 viene direttamente inviata alla sezione di concentrazione previo passaggio in un filtro a tamburo rotante (**RF-101**) per la rimozione delle particelle di solido più piccole rimaste in sospensione.

Il secondo stadio si compone in maniera analoga al primo con la differenza che qui è il solido esausto del primo stadio ad incontrare il solvente fresco (corrente 19).

4.2 Design Basis

4.2.1 Caratteristiche utilities

Le *utilities* impiegate sono raccolte in Tabella 4.3.

Tabella 4.3:	Definizione e	Caratteristiche	Utilities

Utility	Caratteristiche	Consumo orario	Consumo specifico ^a
En. Elettrica	400 Volt (± 10%)-3 Ph-50 ±	14,40 [Kwh]	$2,55 \cdot 10^3 $ [kWh/ton _{prod}]
	0,5 Hz; 6 kVolt (± 10%)-3		
	Ph-50 \pm 0,5 Hz		
Acqua di rete	Temperatura e pressione	$0,02 \ [ton/h]$	$3,23 [ton/h/ton_{prod}]$
	ambiente		

a. calcolato su tonnellata di prodotto mix polifenolico

4.2.2 Caratteristiche prodotto

Portata prodotto			
5,65 kg/h			
Composizione			
Composto	% w/w		
Acido gallico	$0,\!27$		
Acido protocatecuico	0,03		
Acido clorogenico	0,02		
Acido veratrico	0,04		
Quercetin-3-glucoside	$0,\!05$		
Quercetina	$0,\!30$		
Catechina	$0,\!15$		
Epicatechina	$3,\!22$		
Canferolo	0,04		
Acido ferulico	0,09		

Tabella 4.4: Caratteristiche prodotto

4.3 Dimensionamento

4.3.1 Miscelatori (ST-101, ST-102)

Per il dimensionamento dei miscelatori sono state definite le caratteristiche dei deflettori raccolti nella tabella 4.5

A310/Hydrofoil	
Deflettori lama piatta Angolo lama	$\frac{3}{45^{\circ}}$

Sono stati definiti in base al diametro delle particelle i valori geometrici del miscelatore e dell'impeller rappresentato in Figura 4.4 e raccolti nella tabella 4.6



Diametro Impeller (D) [m]	$0,\!4$
D/T	$0,\!5$
D/H	$0,\!42$
$\rm D/D_{Albero}$	5,2
Diametro Impeller (D) [m]	$0,\!4$

Tabella 4.6: Geometria Misceltaore

Figura 4.4: Miscelatore

È stata poi calcolata la velocità della girante secondo la formula 4.1

$$N_{\rm JS} = S(\frac{\mu_{\rm L}}{\rho_{\rm L}})^{0,1} d_{\rm p}^{0,2} (\frac{g(\rho_{\rm s} - \rho_{\rm L})}{\rho_{\rm L}})^{0,45} \frac{X^{0,13}}{D^{0,85}}$$
(4.1)

e successivamente è stato calcolato il tempo di permanenza all'interno della camera che risulta essere di circa 20 min per entrambi.

4.3.2 Pompe a girante flessibile (P-101, P-106)

Le seguenti pompe vengono inserite per lo spostamento della corrente slurry che si ottiene dopo la miscelazione. Come prima cosa, secondo lo "Slurry handbook Guidelines for slurry pumping", è fondamentale definire la specific gravity dello slurry partendo da quella del solido. Si è scelto di utilizzare SG della *Vitex* Confassussimile ai raspi per consistenza. Il calcolo segue poi quanto segue secondo la 4.2

$$SG_{\rm sl} = 1 + C_{\rm v}(SG_{\rm s} - 1)$$
 (4.2)

È stato poi necessario definire una prima ipotesi di diametro delle tubazioni per definire la velocità critica (v_{cr}) tramite il manuale. È stata poi definita la velocità effettiva. La pompa funziona senza blocchi o intoppi se vale la 4.3:

$$v_{\rm eff} > v_{\rm cr} \tag{4.3}$$

Con l'aiuto di grafici sono state definite tutte le perdite da tenere a bada per il calcolo finale della prevalenza. La scelta della pompa da utilizzare è stata fatta tramite le informazioni di prevalenza (H) e portata tramite la Figura4.5



Figura 4.5: Curve Caratteristiche

4.3.3 Presse e KONMIX (CP-101, CP-102, KH-101)

Per le presse e per il konmix non è stato fatto un dimensionamento, ma sono state scelti dei modelli che potessero processare al meglio le portate in gioco e si è poi scelto con quante unità lavorare.

- Presse modello MDS-131, BENEV
- Konmix modello KRB/3, KONMIX

L'unica operazione fatta è stata quella di calcolare la potenza specifica erogata dalla pressa, e di conseguenza quella relativa alla portata trattata

4.3.4 Estrattore ad ultrasuoni (UR-101, UR-102)

Per il dimensionamento dell'estrattore ad ultrasuoni si è optato per un flowthrough cell della Weber-Ultrasonic. Non avendo delle specifiche industriali si è ipotizzato di tenere come modello quello presente in dipartimento e adattarlo alle specifiche in gioco. Sono state prese fisicamente le misure della camera e noto il volume è stato calcolato il lato della camera. La tabella4.7 riporta i valori della camera; si è caratterizzata la sola parte in cui agiscono solo i trasduttori. Avendo

Tabella 4.7: Geometria Weber

Volume camera [L]	14
H [m]	$0,\!6$
L[m]	$0,\!15$

impostato il tempo di estrazione ottimale, tramite la cinetica di Peleg (ved. 2.7.2), t^* a 5 minuti è stato calcolato il volume necessario per la portata in questione, con l'accortezza di assicurare un regime turbolento. Si è ipotizzato di mantenere la stessa dimensione del lato della camera, ma di modificare la sua altezza. Le specifiche del generatore sono invece riassunte in tabella 4.8

Tabella 4.8: Specifiche Generatore

Generatore				
Modello	Sonic Digital MG Multi Premium - Weber Ultrasonic			
Frequenza [kHz]	40-80-120			
Potenza $[W]$	1000			

4.3.5 Decanter (CS-101, CS-102)

Per i decanters è stato scelto di utilizzare il modello F2000 della Andritz. Accanto alle specifiche geometriche fornite dal catalogo è stata eseguita una prova di verificare al fine di valutare quante unità servissero per processare la portata effettiva. È stata seguita la procedura del Perry's Chemical Engineers' Handbook. In tabella 4.9 sono raccolti i parametri da inserire per portare avanti il calcolo di verifa. G e D_b sono stati presi da catalogo mentre il recupero del solido è stato ipotizzato.

Tabella 4.9: Parametri Decante

Andritz - F2000	
G	3500
Diametro bowl (D_b)	$0,\!26$
Recupero	$0,\!98$

Il calcolo di verifica consiste nel risolvere quanto riportato nell'equazione 4.4:

$$\frac{Q_{\rm d}}{2V_{\rm gd}} = \frac{\pi\Omega^2 L}{g} \frac{r_{\rm p}^2 - r_{\rm b}^2}{\ln\{1 - Rec_{\rm d}[1 - (r_{\rm p}/r_{\rm b})^2]\}} = \Sigma_{\rm Rec_{\rm d}}$$
(4.4)

Viene prima calcolato il valore di $\Sigma_{\mathrm{Rec}_{\mathrm{d}}}$ tramite la 4.5

$$\frac{\pi \Omega^2 L}{g} \frac{r_{\rm p}^2 - r_{\rm b}^2}{\ln\{1 - Rec_{\rm d}[1 - (r_{\rm p}/r_{\rm b})^2]\}} = \Sigma_{\rm Rec_{\rm d}}$$
(4.5)

e poi viene invece valutata la Q_d che sarebbe la portate teorica che quel decanter può processare tramite la 4.6

$$\frac{Q_{\rm d}}{2V_{\rm gd}} = \Sigma_{\rm Rec_d} \tag{4.6}$$

Questa viene poi paragonata alla portata effettiva da processare e si valuta quanti decanter impiegare: nello specifico una sola unità è sufficiente.

4.3.6 Filtri a tamburo rotante (RF-101, RF-102)

Per dimensionare i filtri a tamburo rotante è state utilizzato l'esempio 6 a pagina 18-94 del Perry's Chemical Engineers' Handbook. Come prima cosa è necessario definire lo spessore del cake per lo scarico dei solido: vengono forniti diversi valori minimi. La scelta fatta è riportata in tabella4.10: Una volta impostato questo

Tabella 4.10: Spessore Cake

Minimum design	thickness
Filter type Bolt	mm 0.75
DCIU	0,10

valore è stato trovato il peso secco del cake tramite la Figura4.6:

Vengono poi definiti i seguenti parametri :

• TDS - Total dissolved solid = 0.33 w/w



Figura 4.6

- Solidi restanti nel liquido = 0,1 w/w (ipotesi)
- Residual moisture (RUR) = 25%

Così facendo si riesce a calcolare la percentuale di recupero richiesto che serve per trovare il valore di N (wash ratio) tramite il grafico in Figura 4.7 Viene poi di



Figura 4.7

seguito calcolato il volume di lavaggio (WV
w $[\rm kgL/m^4])$ tramite le equazioni 4.7 e 4.8

$$L_{\rm cake}^{\rm f} = \frac{W * RUR/100}{(100 - RUR)/100}$$
(4.7)

dove $L_{cake}{}^{f}$ rappresenta il liquido nel cake finale in kg/m²xciclo

$$WVw = \frac{N * L_{\text{cake}}^{\text{f}}}{No.cicli}W$$
(4.8)

con il quale poi si riesce a trovare il tempo di lavaggio utilizzando il grafico in Figura 4.8 Si è così potuto definire il tempo di un totale ciclo che prevede filtrazione,



Figura 4.8

asciugatura e lavaggio. Tramite la Figura4.9 si definisce la portata di gas che attraversa il nastro per poter poi calcolare il flusso del gas richiesto per la procedura finale di essiccamento.



Figura 4.9

4.3.7 Serbatoi

La scelta dei serbatoi, dovendo contenere solo liquidi, è ricaduta su tipologie verticali con fondo ellissoidale, parte centrale cilindrica e raccordo torosferico in testa, come mostrato in Figura 4.10.a. Sono state fatte le seguenti ipotesi:

- Tempo permanenza all'interno del serbato
io 1 ${\bf h}$
- Portata volumetrica maggiorata del 10%
- Volume del serbatoio maggiorato con un 20% di disimpegno

I valori nominali sono stai scelti tra una serie di valori tabulati (Figura4.10.b) e adattati di volta in volta alle portate. Si è seguita la normativa **EN 13445** per il calcolo degli spessori.



Figura 4.10: Dimensionamento serbatoio

4.3.8 Pompe Centrifughe

Tutte le pompe centrifughe sono state dimensionate nel medesimo modo. È stata fatta una prima ipotesi sulla disposizione nello spazio delle varie apparecchiature in modo da poter definire i valori di massima di lunghezza delle tubazioni e del dislivello tra pelo libero del liquido, ed inoltre sono stati scelte tubazioni in acciaio con un rugosità media (\mathbf{k}) di 100 μ m.

I diametri e gli spessori delle tubazioni sono stati presi KSB Italia S.p.a "Selezione delle pompe centrifughe" (vd. Figura4.11) come anche la procedura di calcolo. È

		Tutte le misure in mm senza saldatura saldato			
DN	D	s *	d	S **	d
15	21,3	2,0	17,3	1,8	17,7
20	26,9	2,0	22,9	1,8	23,3
25	33,7	2,3	29,1	2,0	29,7
32	42,4	2,6	37,2	2,3	37,8
40	48,3	2,6	43,1	2,3	43,7
50	60,3	2,9	54,5	2,3	55,7
65	76,1	2,9	70,3	2,6	70,9
80	88,9	3,2	82,5	2,9	83,1
100	114,3	3,6	107,1	3,2	107,9
125	139,7	4,0	131,7	3,6	132,5
150	168,3	4,5	159,3	4,0	160,3
200	219,1	6,3	206,5	4,5	210,1
250	273,0	6,3	260,4	5,0	263,0
300	323,9	7,1	309,7	5,6	312,7
350	355,6	8,0	339,6	5,6	344,4
400	406,4	8,8	388,8	6,3	393,8
500	508,0	11,0	486,0	6,3	495,4
600	610,0	12,5	585,0	6,3	597,4

Figura 4.11

stata poi calcolata la prevalenza della pompa tramite l'equazione 4.9

$$H_{\rm A} = H_{\rm geo} + \frac{\Delta p}{\rho g} + \Sigma H_{\rm v} \tag{4.9}$$

dove:

- H_{geo} è dislivello geodetico
- ΣH_v sono tutte le perdite di carico delle tubazioni dovuti al flusso, alle valvole, ai gomiti e così via.
- Δp sono invece le perdite di carico dovute alla differenza di pressione che la pompa stessa imprime al fluido: per mancanza di dati sono state simulate sul software Aspen.

È stato poi effettuato un calcolo di sicurezza per evitare che la pompa incorresse in cavitazione tramite l'NPSH_{disp} ottenuto secondo l'equazione 4.10:

$$NPSH_{\rm disp} = \frac{p_{\rm e} + p_{\rm b} - p_{\rm D}}{\rho g} + \frac{v_{\rm e}^2}{2g} - H_{\rm v,s} - H_{\rm s,geo} \pm s'$$
(4.10)

Il calcolo di verifica consiste nello scegliere il modello della pompa e vedere tramite dei grafici di funzionamento simili a quello in Figura 4.12 -ogni modello di pompa ne ha uno- quale sia il suo NPSH_{nec}. Il calcolo di verifica consiste nel valutare che:

$$NPSH_{disp} > NPSH_{nec}$$
 (4.11)

Figura 4.12: Curva caratteristica pompa centrifuga 40-160 - FLOWSERVE

4.4 Sistema di controllo

- Controllo di portata su corrente 1 e 27 per mantenere il rapporto di 1/20 tra solido e liquido all'ingresso del miscelatore
- **CP-101** e **CP-102** prevedono un controllo di pressione tramite immissione di aria sul controcono in uscita del pannello esausto
- Controllo di portata su corrente 15 e 29
- Controllo di livello sulla vasca di raccolta di acqua di $\bf RF-101$ e $\bf RF-102$

Capitolo 5

Conclusioni

Durante il lavoro presso il laboratorio DSTF si è cercato di definire ed ottimizzare un processo estrattivo US-assistito al fine di poter isolare i polifenoli presenti nei raspi d'uva, biomassa di scarto, impiegando come solvente semplice acqua. Sono state impiegate strumentazioni dedicate per la caratterizzazione della matrice e dell'estratto dal punto di vista chimico e fisico.

Due differenti tipologie di reattori ad ultrasuoni sono state impiegate per l'estrazione in scala di laboratorio: un *cup-horn* ed un *horn* ad immersione. Entrambi sfruttano il fenomeno della cavitazione acustica per promuovere il *mass transfer* e quindi migliorare la resa estrattiva del processo. È stata prevista una prima quantificazione degli estratti per individuare i polifenoli in essi contenuti, tramite un un test analitico (*Folin-Ciocalteau*). Sono stati poi confrontati con dei protocolli convenzionali al fine di valutare il massimo estraibile tramite l'esaurimento della matrice. In funzione di questo riferimento, è stato condotto uno *screening* dei parametri che influenzano l'estrazione.

I risultati ottenuti indicano che entrambe le tecniche impiegate denotano rese confrontabili, andando a definire protocolli ottimizzati simili che non influenzano in modo sostanziale l'estrazione in singolo *step*. Considerando la somiglianza dei dati, per ragioni di maggior controllo di alcuni parametri fisici (i.e. temperatura), è stato scelto di utilizzare l'*horn* ad immersione per valutare, tramite prove ulteriori, le condizioni che potessero portare ad esaurimento della matrice.

Nello specifico è stato indagato un processo *multi-step* sulla matrice, tramite una seconda estrazione del solido risultante dal primo trattamento UAE. Si è studiata contemporaneamente l'influenza della durata del primo trattamento sulla resa complessiva, dimostrando che la cavitazione svolge prevalentemente un potenziamento del trasferimento di massa rispetto ad un trattamento fisico, nel sistema considerato. Al termine dei test si è potuto registrare un aumento di efficienza estrattiva del 40% se confrontata con l'estrazione singolo step, arrivando ad un esaurimento complessivo della matrice del 99.4%, avvicinandosi al valore della quantificazione convenzionale.

Gli estratti di riferimento (quantificazioni convenzionali) e quelli ottenuti da protocolli UAE ottimizzati sono stati caratterizzati per mezzo di tecniche e strumentazioni (i.e. LC-MS, HPLC-DAD) che permettessero prima un'identificazione generica delle classi di composti, al fine di poter poi procedere con una quantificazione precisa dei componenti principali e di maggior efficacia/valore aggiunto. I diversi risultati sono stati impiegati per caratterizzare in maniera completa il prodotto finale, confrontandolo con gli estratti ottenuti tramite metodi classici e dimostrando l'efficacia dell'utilizzo degli US. Dalle analisi, si nota come i componenti presenti in maggior quantità siano quercetina, quercetin-3-glucoside ed epicatechina, indifferentemente che l'estratto fosse stato ottenuto tramite operazioni US-assistite o tramite procedure convenzionali. Questo dimostra una completa sovrapponibilità delle tecniche per ciò che riguarda la popolazione di composti principali, tra i più attivi nel complesso polifenolico ottenuto.

Differenze nelle componenti estratte è stata comunque riscontrata, confrontando i due diversi processi. Sostanzialmente è stato dimostrato come i componenti proantocianidinici si ottengano a maggior concentrazione utilizzando protocolli convenzionali piuttosto che US-assistiti. Non sono stati svolti test per approfondire il meccanismo di questo fenomeno, ma si sono potute formulare due ipotesi plausibili: maggior affinità chimica degli oligomeri verso il solvente classico (etanolo) od azione depolimerizzativa della cavitazione sulle strutture proantocianidiniche.

Ciò che rendere interessanti i composti polifenolici sia a per l'industria alimentare che per quella farmaceutica e cosmetica è il loro potere antiossidante. Sono stati eseguiti test specifici affinché venisse determinato (DPPH e ORAC) e si è evinto come l'UAE generi un prodotto con attività simile a quello ottenuto con metodi classici. Proseguendo con analisi più approfondite, inoltre, si è dimostrato che l'estratto isolato dal secondo *step* del processo multistadio dimostra valori di gran lunga superiori a tutti i campioni analizzati, sia per attività antiossidante che per contenuto complessivo in flavonoidi.

Il lavoro di laboratorio, infine, è stato finalizzato a definire le condizioni al contorno per progettare un impianto estrattivo su scala industriale. Un impianto efficiente, con basso impatto ambientale e che minimizzi gli sprechi. Per questo motivo, si è scelto di processare degli scarti dell'industria vinicola e di impiegare un solvente sostenibile ed economico. Lo *screening* del tempo sulle estrazioni svolte in laboratorio è stato necessario per definire i parametri cinetici e fluidodinamici

utili al dimensionamento dell'estrattore ad US. Una volta appurato che la cinetica ricavata sperimentalmente potesse essere descritta fedelmente dalla teoria del modello di Peleg, è stato scelto il tempo ottimale di estrazione e conseguentemente calcolato il coefficiente di scambio volumetrico $k_{\rm L}a$.

È stato progettato un impianto che riproducesse fedelmente tutte le operazioni svolte in laboratorio, caratterizzato da due stadi estrattivi in controcorrente il cui corpo principe è il *flow-through cell* della 'Weber Ultrasonic'. L'impianto che si vuole progettare è situato nel territorio piemontese e raccoglie gli scarti di una serie di industrie vinicole in un raggio di 50 km da Asti. La potenzialità dell'impianto, tramite dati statistici, si attesta intorno a 400 ton/y, con la produttività di 19,78 ton/y di prodotto.

Bibliografia

- Wikipedia (2018), Storia del vino, "//it.wikipedia.org/w/index.php? title=Storia_del_vino&oldid=96221360", L'enciclopedia libera
- [2] Zacharof, M. Grape Winery Waste as Feedstock for Bioconversions: Applying the Biorefinery Concept, 2016
- [3] Galanakis, C. Handbook of Grape Processing By-Products Sustainable Solution, **2107**
- [4] Wikipedia, Uva, "//it.wikipedia.org/w/index.php?title=Uva&oldid= 91958268", Wikipedia, L'enciclopedia libera 2018
- [5] Prozil, S.; Evtuguin, D.V.; Lopes, S.M.; Cruz Lopes, L.P.; Arshanitsa, A.S.; Solodovnik, V.P.; Telysheva, G.M. Evaluation of grape stalks as a feedstok for pellets production, 2014
- [6] Tsao, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols, Nutrients 2010, 2, 1231-1246; doi:10.3390/nu2121231
- Bertran, E.; Sort, X.; Soliva, M.; Trillas, I. Composting winery waste: sludges and grape stalks, Bioresource Technology 95 (2004) 203–208
- [8] Sigma-Aldrich (2018), "https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/ sigma/e1753?lang=it®ion=IT"
- [9] Sigma-Aldrich (2018), "hhttps://www.sigmaaldrich.com/catalog/ product/sial/e3893?lang=it®ion=IT"
- [10] Sigma-Aldrich (2018), "https://www.sigmaaldrich.com/ catalog/product/sial/90733lang=it®ion=IT&gclid= CjwKCAjwopTYBRAzEiwAnU4kb3ZdXx0IqACOvtRykk9-lscDYHCoXhOHN1Dci6\ qvweY1WpXvDCcBX\RoCEfQQAvD_BwE"
- [11] MedChemExpress (2018), "https://www.medchemexpress.com/Rutin. html"

- [12] Sigma-Aldrich (2018), "https://www.sigmaaldrich.com/catalog/ product/sigma/90242?lang=it®ion=IT"
- [13] Sigma-Aldrich (2018), "https://www.sigmaaldrich.com/catalog/ product/sial/04500585?lang=it®ion=IT&cm_sp=Insite-_ -prodRecCold_xorders-_-prodRecCold2-1"
- [14] Sigma-Aldrich (2018), "https://www.sigmaaldrich.com/catalog/ product/sial/79311?lang=it®ion=IT
- [15] Sigma-Aldrich (2018), "https://www.sigmaaldrich.com/catalog/ product/usp/1086039?lang=it®ion=IT"t
- [16] Sigma-Aldrich (2018), "https://www.sigmaaldrich.com/catalog/ product/sigma/smb00074?lang=it®ion=IT"
- [17] Arvanitoyannis, I; Ladas, D; Mavromatis, A. Potential uses and applications of treated wine waste: a review, International Journal of Food Science and Technology 2006, 41, 475–487
- [18] Barros, A.; Gironés-Vilaplana A.; Teixeira, A. et al. Evaluation of grape (Vitis vinifera L.) stems from portuguese varieties as a resource of (poly)phenolic compounds: A comparative study, Food Research Internationl 65 (2014) 375-384
- [19] Gorzynik-Debicka, M.; Przychodzen, P.; Cappell, F. et al. Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols, International Journal of Molecular Science 2018, 19, 547; doi:10.3390/ijms19030686, "www.mdpi.com/journal/ ijms"
- [20] Perea-Rasines, Z.; Teissendre, P.L. Grape Polyphenols' Effects in Human Cardiobascualr Diseases and Diabetes Molecules 2017, 22, 68; doi:10.3390/molecules22010
- [21] McDonnel, C.; Tiwari, B.K. Comprehensive Analytical Chemistry, Volume 76, 2017, Pages 111-129, "http://dx.doi.org/10.1016/bs.coac.2017.03.005"
- [22] Alonso, A; Guillén, D.; Barroso, C; Puertas, B; García, A. Determination of Antioxidant Activity of Wine Byproducts and Its Correlation with Polyphenolic Content, IJ. Agric. Food Chem. 2002, 50, 5832-5836
- [23] TutorVista. Green Chemistry, 2016, "https://chemistry.tutorvista.com/ environmental-chemistry/green-chemistry.html"
- [24] United States Evironmental Protection Agency. Basics of Green Chemistry, 2015, "https://www.epa.gov/greenchemistry/basics-green-chemistry"
- [25] Tang, S; Bourne, R.; Smith, R.; Poliakoff, M. The 24 Principles of Green Engineering and Chemistry: "IMPROVEMENTS PRODUCTIVELY, Green Chem., 2008, 10, 268–269
- [26] P. T. Anastas and J. B. Zimmerman, *Environ.*, Sci. Technol., **2003**, 37, 94A.
- [27] American Chemical Society, "https://www.acs.org/content/acs/en/greenchemistry/ what-is-green-chemistry/principles/12-principles-of-green-engineering. html"
- [28] Chemat, F.; Abert Vian, M.; Cravotto, G. Green Extraction of Natural Products: Concept and Principlea, Int. J. Mol. Sci. 2012, 13, 8615-8627
- [29] Chemat, F.; Rombaut, N.; Sicaire, A.; Meullemiestre, A.; Fabiano-Tixier, A.; Abert-Vian, M. Ultrasoundassisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review, Ultrasonics Sonochemistry 34 (2017) 540–560
- [30] Cravotto, G.; Cintas, P. Power ultrasound in organic synthesis: moving cavutational chemistry from academia to innovative and large-scale applications, Chem. Soc. Rev, 2006, 35, 180-196
- [31] Chemat, F.; Zill-e-Huma; Kamran Khan, M. Applications of ultraosounds in food technology: Processing, pr eservation and extraction, Ultrasonics Sonochemistry 18(2011) 813-835
- [32] Luque-García, J.L.; Luque de Castro, M.D. Ultrasound: a powerful tool for leaching, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 22, No.1, 2003
- [33] Suslik, K. The Chemical Effects of Ultrasound, Scientific American February 1989
- [34] Toma, M.; Vinatoru, M.; Paniwnyk, L.; Mason, T.J. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction, Ultrasonics Sonochemistry 8 (2001) 137-142
- [35] Both, S.; Chemat, F.; Strube, J. Extraction of polyphenols from black tea -Conventional and ultrasound assisted extraction, Ultrasonics Sonochemistry 21 (2014) 1030–1034

- [36] Domínguez-Perles, R.; Teixeira, A.I.; Rosa, E.; Barros, A.I. Assessment of (poly)phenols in grape (Vitis vinifera L.) stems by using food/pharma industry compatible solvents and Response Surface Methodology, Food Chemistry 164 (2014) 339-346
- [37] Peleg, M. An Empirical Model for the Description of Moisture Sorption Curvese, Journal of Food Science - Vol.54, No.4, 1988
- [38] Dalzell, A.S.; Kerven, G.L.; A rapid method for the measurement of Leucaena spp Proanthocyanidis by the Proanthocyanidin (Butanol/HCl) Assay, J Sci Food Agric, 1998, 78, 405-416
- [39] C.Zhou, C. Sun, K. Chen, X. Li.; Flavonoids, Phenolics, and Antioxidant Capacity in the Flower of Eriobotrya japonica Lindl., Int J Mol Sci. 2011; 12(5): 2935–2945
- [40] Almaraz-Abarca, N.; González-Elizondo, M. et al.; Variability of the foliar phenol profiles of the agave victoriae-reginae complex(AGAVACEAE), Botanical Sciences 91 (3): 295-306, 2013

Appendice A

LC-MS

Sono riportati i picchi dei componenti indagati nei campioni ottenuti in laboratorio. Questi, confrontati con gli standard, rivelano la presenza o meno dello stesso.



Figura A.1: Picchi campione EXT01-TA-031



(c) (Epi)Catechina

Figura A.2: Picchi campione EXT01-TA-031



Figura A.3: Picchi campione EXT01-TA-064



Figura A.4: Picchi campione EXT01-TA-064

Appendice B

LC-MS/MS - Institute of Wood Chemistry (IWC, Lettonia), Prof. Telysheva, G.

Picco No	R_{t}	[M-H] ⁻	Composto
	min		
4	$1,\!02$	196	Acido Gallico
8	$2,\!85$	759	Derivati dimero procianidina
12	$4,\!31$	595.	. Derivati Catechina
16	6,75	609	Rutina
17	$6,\!87$	593	Canferol-3-O-glucoside-7-ramnoside
18	$1,\!92$	315	Isoramnetina
19	$0,\!56$	191	Acido Citrico
20	2,79	289	Catechina
21	$2,\!43$	577	Dimero procianidina
22	2,51	1153	Oligomero procianidina
23	6,73	477	Quercetin-3-glucuronide

Tabella B.1: Identificazione di composti tramite LC-ESI(-)-MS



Figura B.1: Cromatogrammi (ionizzazione negativa) - LC-MS/MS

112

Appendice C HPLC-DAD

* Non viene riportata l'intensità sul grafico, poiché l'unico scopo è quello di mostrare l'andamento dell'assorbimento.

C.1 Assorbanze ottimizzato UAE



Tabella C.1: Assorbanza acido gallico e componenti simili - EXT01-TA-031



Tabella C.2: Assorbanza Acido Veratrico - EXT01-TA-031



Tabella C.3: Assorbanza Acido protocate
cuico e componenti simili - EXT01-TA-031



Tabella C.4: Assorbanza Acido clorogenico e componenti simili - EXT01-TA-031



Tabella C.5: Assorbanza Acido ferulico e componenti simili - EXT01-TA-031



Tabella C.6: Assorbanza Quercetin-3-Glucoside - EXT01-TA-031



Tabella C.7: Assorbanza Quercetina - EXT01-TA-031



Tabella C.8: Assorbanza Acido p-cumarico e componenti simili- EXT01-TA-031



Tabella C.9: Assorbanza composto simili-catechina - EXT01-TA-031



Tabella C.10: Assorbanza composti simil-epicatechina - EXT01-TA-031



Tabella C.11: Assorbanza Canferolo - EXT01-TA-031



Tabella C.12: Assorbanza componenti idrossobenzoici - EXT01-TA-031

C.2 Assorbanze convenzionale



Tabella C.13: Assorbanza componenti diidroflavonoidi - EXT01-TA-064



Tabella C.14: Assorbanza acido gallico e componenti simili - EXT01-TA-064



Tabella C.15: Assorbanza componenti acidi benzoicii - EXT01-TA-064



Tabella C.16: Assorbanza Acido clorogenico e componenti simili - EXT01-TA-064



Tabella C.17: Assorbanza Acido p-cumarico e componenti simili - EXT01-TA-064



Tabella C.18: Assorbanza composti simil-epicatechina - EXT01-TA-064



Tabella C.19: Assorbanza Quercetin-3-Glucoside - EXT01-TA-064



Tabella C.20: Assorbanza Quercetina - EXT01-TA-064



Tabella C.21: Assorbanza $\epsilon\text{-viniferina}$ - EXT01-TA-064

Appendice D

Process Flow Diagram

