

# POLITECNICO DI TORINO

Collegio di Ingegneria Chimica e dei Materiali

## Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Chimica e dei Processi Sostenibili

Tesi di Laurea Magistrale

*Intensificazione di processo nell'estrazione di componenti ad elevato valore aggiunto da scarti dell'industria del té.*



### Relatori

Prof. Bensaid Samir  
Prof. Giuliano Cavaglià  
Prof. Giancarlo Cravotto

### Candidato

Caterina Gallone

Luglio 2018



*Alla mia famiglia:  
casa del mio cuore,  
rifugio per il mio corpo,  
salvezza da me stesso.*

*"Sic mundus creatus est"  
"Così è stato creato il mondo"  
Ermete Trismegisto*



# Indice

<b>Elenco delle figure</b>	<b>4</b>
<b>Elenco delle tabelle</b>	<b>5</b>
<b>1 Introduzione</b>	<b>7</b>
1.1 Valorizzazione Scarti Industriali . . . . .	7
1.1.1 GreenChemistry . . . . .	12
1.2 Tecniche di Intensificazione di Processo . . . . .	14
1.2.1 Estrazione Assistita da Ultrasuoni . . . . .	14
1.2.2 Cavitazione . . . . .	15
1.3 Scopo della Tesi . . . . .	18
<b>2 Descrizione Attività Sperimentale</b>	<b>21</b>
2.1 Caratterizzazione Matrice . . . . .	21
2.2 Apparecchiature Estrattive . . . . .	23
2.2.1 Cup-Horn . . . . .	23
2.2.2 Sistema Convenzionale . . . . .	24
2.2.3 Estrazioni . . . . .	25
2.2.4 <i>Work up</i> post-estrazione . . . . .	26
2.3 Analisi dei Dati . . . . .	26
2.3.1 Quantificazione polifenoli totali - TPC . . . . .	26
2.3.2 Fluidodinamica e Caratterizzazione della Cinetica Estrattiva: Il Modello di Peleg . . . . .	28
2.4 Caratterizzazione Qualitativa . . . . .	32
2.4.1 LC/Massa . . . . .	32
2.5 Caratterizzazione Quantitativa . . . . .	42
2.5.1 HPLC . . . . .	42
2.5.2 Determinazione del contenuto di Flavonoidi - Institute of Wood Chemistry (IWC, Lettonia), Prof. Telysheva, G. . . . .	46
2.5.3 Analisi Qualitativa LC-MS/MS - Institute of Wood Chemi- stry (IWC, Lettonia), Prof. Telysheva, G. . . . .	46
2.5.4 Caratterizzazione delle proprietà antiossidanti . . . . .	46
<b>3 Risultati</b>	<b>48</b>
3.1 Blend Screening . . . . .	48
3.2 South Indian . . . . .	50
3.2.1 Estrazioni in Convenzionale . . . . .	50

3.2.2	<i>Time Screening</i> . . . . .	51
3.2.3	Cinetica di Peleg . . . . .	53
3.2.4	Cross-Flow . . . . .	55
3.3	Ceylon Orange . . . . .	59
3.3.1	Estrazioni in Convenzionale . . . . .	59
3.3.2	<i>Time Screening</i> . . . . .	60
3.3.3	Cinetica di Peleg . . . . .	62
3.3.4	Cross-Flow . . . . .	64
3.4	Analisi dei dati . . . . .	67
3.4.1	Analisi Qualitativa LC/MS . . . . .	67
3.4.2	Analisi Quantitativa HPLC . . . . .	79
3.4.3	Analisi Qualitativa LC-MS/MS - Institute of Wood Chemistry (IWC, Lettonia), Prof. Telysheva, G. . . . .	92
3.4.4	Quantificazione contenuto Flavonoidi - Institute of Wood Chemistry (IWC, Lettonia), Prof. Telysheva, G. . . . .	95
3.4.5	Caratterizzazione delle proprietà antiossidanti - Institute of Wood Chemistry (IWC, Lettonia), Prof. Telysheva, G. . . . .	95
<b>4</b>	<b>Scale-up Industriale</b> . . . . .	<b>97</b>
4.1	Process Description . . . . .	97
4.1.1	Caratterizzazione della Matrice . . . . .	98
4.1.2	Panoramica Impianto . . . . .	98
4.1.3	Sezione di Estrazione . . . . .	100
4.2	Dimensionamento Apparecchi . . . . .	103
4.2.1	Miscelatori (ST-101, ST-102, ST-103) . . . . .	103
4.2.2	Pompe a girante flessibile (P-101, P-106, P-110) . . . . .	104
4.2.3	Estrattore Ultrasonico (WU-101, WU-102, WU-103) . . . . .	105
4.2.4	Decanter (CS-101, CS-102, CS-103) . . . . .	107
4.2.5	Filtri a tamburo rotante (RF-101, RF-102, RF-103) . . . . .	108
4.2.6	Pompe Centrifughe . . . . .	111
4.2.7	Serbatoi . . . . .	111
4.3	Sistema di Controllo . . . . .	113
<b>5</b>	<b>Conclusioni</b> . . . . .	<b>114</b>
5.1	Conclusioni della tesi . . . . .	114
	<b>Bibliografia</b> . . . . .	<b>117</b>
	<b>A Process Flow Diagram</b> . . . . .	<b>120</b>
	<b>B LC-MS</b> . . . . .	<b>122</b>
B.1	Ceylon Orange . . . . .	122
B.1.1	Estrazione Ottimizzata . . . . .	122
B.1.2	Estrazione Convenzionale . . . . .	126
B.2	South Indian . . . . .	128
B.2.1	Estrazione Ottimizzata . . . . .	128
B.2.2	Estrazione Convenzionale . . . . .	130

<b>C HPLC</b>	<b>132</b>
C.1 Ceylon Orange . . . . .	133
C.1.1 Ceylon Orange Ottimizzato . . . . .	133
C.1.2 Ceylon Orange Convenzionale . . . . .	137
C.2 South Indian . . . . .	140
C.2.1 South Indian Ottimizzato . . . . .	140
C.3 South Indian Convenzionale . . . . .	143
C.4 Analisi Qualitativa LC-MS/MS - Institute of Wood Chemistry (IWC, Lettonia), Prof. Telysheva, G. . . . .	145
C.4.1 Ceylon Orange . . . . .	145

# Elenco delle figure

1.1	Struttura Flavonoidi . . . . .	9
1.2	Acronimi <i>Green Chemistry ed Engineering</i> , <i>Immagine modificata da [18]</i> . . . . .	13
1.3	Cicli di Rarefazione e Compressione, <i>Immagine modificata da [26]</i> . . . . .	16
1.4	Step Cavitazione Bolla . . . . .	16
1.5	Cellula Vegetale durante Cavitazione . . . . .	19
1.6	Rottura Parete Cellulare . . . . .	19
2.1	R.E.U.S.S. <i>Immagine modificata da [14]</i> . . . . .	23
2.2	Sistema Convenzionale . . . . .	24
2.3	Campioni per analisi di <i>Folin-Ciocalteu</i> . . . . .	27
2.4	Retta di taratura per analisi di <i>Folin-Ciocalteu</i> . . . . .	27
2.5	Equilibrio in sistema Batch . . . . .	29
2.6	Curve di assorbimento, <i>immagine modificata da [35]</i> . . . . .	31
2.7	Cinetica di Estrazione Solido-Liquido . . . . .	33
2.8	Standard HPLC . . . . .	43
2.9	Standard HPLC . . . . .	44
2.10	Standard HPLC . . . . .	45
3.1	Resa vs Tempo South Indian . . . . .	52
3.2	Linearizzazione . . . . .	53
3.3	Resa vs Tempo . . . . .	54
3.4	Stadi Sezione Estrattiva . . . . .	56
3.5	<i>Step</i> di calandratura della matrice . . . . .	58
3.6	Resa vs Tempo Ceylon Orange . . . . .	61
3.7	Linearizzazione . . . . .	63
3.8	Resa vs Tempo . . . . .	64
3.9	Stadi Sezione Estrattiva . . . . .	66
3.10	Ceylon Orange Ottimizzato, Metodo Acidi Fenolici . . . . .	70
3.11	Ceylon Orange Ottimizzato, Metodo Catechine . . . . .	71
3.12	Ceylon Orange Convenzionale, Metodo Acidi Fenolici . . . . .	72
3.13	Ceylon Orange Convenzionale, Metodo Catechine . . . . .	73
3.14	South Indian Ottimizzato, Metodo Acidi Fenolici . . . . .	75
3.15	South Indian Ottimizzato, Metodo Catechine . . . . .	76
3.16	South Indian Convenzionale, Metodo Acidi Fenolici . . . . .	77
3.17	South Indian Convenzionale, Metodo Catechine . . . . .	78
4.1	Numero di Stadi . . . . .	102

4.2	Divisione in Stadi . . . . .	103
4.3	Punto di Funzionamento . . . . .	105
4.4	Funzionamento Decanter . . . . .	108
4.5	Tempo di lavaggio <i>Tratta da Perry's Chemical Engineers' Handbook</i>	109
4.6	Portata di gas <i>Tratta da Perry's Chemical Engineers' Handbook</i> . . .	110
4.7	Struttura filtro <i>Tratta da Perry's Chemical Engineers' Handbook/fig.18-134</i> . . . . .	110
4.8	Curva caratteristica pompa centrifuga 40-160 <i>Tratta da catalogo FLOWSERVE</i> . . . . .	112
B.1	Ceylon Orange Ottimizzato . . . . .	123
B.2	Ceylon Orange Ottimizzato . . . . .	124
B.3	Ceylon Orange Ottimizzato . . . . .	125
B.4	Ceylon Orange Convenzionale . . . . .	126
B.5	Ceylon Orange Convenzionale . . . . .	127
B.6	South Indian Ottimizzato . . . . .	128
B.7	South Indian Ottimizzato . . . . .	129
B.8	South Indian Convenzionale . . . . .	130
B.9	South Indian Convenzionale . . . . .	131

# Elenco delle tabelle

1.1	Polifenoli contenuti nel Tè nero . . . . .	8
1.2	Contenuto e prezzo composti fenolici . . . . .	11
2.1	Tipologie di tè disponibili . . . . .	21
2.2	Composizione Matrici . . . . .	22
2.3	Potere Calorimetrico . . . . .	24
2.4	Campioni per analisi di <i>Folin-Ciocalteu</i> . . . . .	27
2.5	Metodo: Acidi Fenolici . . . . .	33
2.6	Metodo: Catechine . . . . .	33
2.7	Analisi Qualitativa LC-MS/MS . . . . .	34
2.8	LC/Massa, ST mix 2 . . . . .	35
2.9	LC/Massa, ST mix 3 . . . . .	36
2.10	LC/Massa, ST mix 4 . . . . .	37
2.11	LC/Massa, ST mix 5 . . . . .	38
2.12	LC/Massa, ST mix 6 . . . . .	39
2.13	Determinazione Qualitativa LC-MS/MS . . . . .	46
2.14	Analisi Qualitativa LC-MS/MS . . . . .	47
3.1	Parametri di processo . . . . .	48
3.2	Blend Screening . . . . .	49
3.3	Time Screening . . . . .	49
3.4	Differenze tra R.E.U.S.S. . . . . .	50
3.5	Madhujing . . . . .	50
3.6	Confronto Convenzionali . . . . .	51
3.7	Convenzionale 2 step . . . . .	51
3.8	<i>Time Screening</i> . . . . .	52
3.9	Costanti di Peleg . . . . .	53
3.10	Punto di lavoro ottimale . . . . .	54
3.11	Calcolo $k_{La}$ . . . . .	55
3.12	Simulazione Cross-Flow - Primo Stadio . . . . .	57
3.13	Simulazione Cross-Flow - Secondo Stadio . . . . .	57
3.14	Risultati finali . . . . .	57
3.15	Calandratura . . . . .	58
3.16	Estrazioni in Convenzionale . . . . .	60
3.17	<i>Time Screening</i> . . . . .	61
3.18	Estrazioni Classiche . . . . .	62
3.19	Costanti di Peleg . . . . .	63
3.20	Punto di lavoro ottimale . . . . .	63

3.21	Calcolo $k_L a$ . . . . .	65
3.22	Differenza Volumica . . . . .	65
3.23	Simulazione Cross-Flow - Primo Stadio . . . . .	65
3.24	Simulazione Cross-Flow - Secondo Stadio . . . . .	67
3.25	Simulazione Cross-Flow - Terzo Stadio . . . . .	67
3.26	Risultati finali . . . . .	67
3.27	Parametri Operativi Campione LC/Massa . . . . .	68
3.28	LC/Massa,Ceylon Orange Optimum . . . . .	69
3.29	LC/Massa,Ceylon Orange Convenzionale . . . . .	69
3.30	Parametri Operativi Campione HPLC/DAD . . . . .	80
3.31	Quantificazione HPLC/DAD,South Indian Ottimizzato . . . . .	83
3.32	Quantificazione HPLC/DAD South Indian Convenzionale . . . . .	86
3.33	Quantificazione HPLC/DAD Ceylon Orange Ottimizzato . . . . .	89
3.34	Quantificazione HPLC/DAD Ceylon Orange Convenzionale . . . . .	91
3.35	Identificazione Composti tramite LC-ESI(-)-MS . . . . .	93
3.36	Identificazione Composti tramite LC-ESI(-)-MS . . . . .	94
3.37	Quantificazione Flavonoidi . . . . .	95
3.38	Test ORAC . . . . .	95
3.39	Test DPPH . . . . .	95
4.1	Caratteristiche impianto . . . . .	97
4.2	Composizione Matrice . . . . .	98
4.3	Prodotto Mix Polifenolico . . . . .	99
4.4	Consumi Utilities . . . . .	100
4.5	Consumi Annuì Utilities . . . . .	100
4.6	Costi Utilities . . . . .	101
4.7	Calcolo della costante di equilibrio . . . . .	101
4.8	Parametri Operativi . . . . .	101
4.9	Dimensionamento . . . . .	104
4.10	Parametri . . . . .	105
4.11	Parametri per il calcolo della $K_L a$ . . . . .	106
4.12	Parametri . . . . .	107
4.13	Parametri Decanter . . . . .	107
4.14	Calcolo Volume di Lavaggio . . . . .	109
C.1	Identificazione di composti tramite LC-ESI(-)-MS . . . . .	145

# Capitolo 1

## Introduzione

### 1.1 Valorizzazione Scarti Industriali

Il tè è una bevanda aromatica comunemente ottenuta facendo un infuso con foglie di *Camellia sinensis* L., un arbusto sempreverde di origine asiatica, e rappresenta la seconda bevanda più consumata attualmente al mondo dopo l'acqua. Ad oggi è disponibile in diverse varianti, le quali differiscono per le tecniche di ossidazione e fermentazione applicate su foglie e germogli della pianta; secondo recenti studi, il 78% del tè consumato e prodotto a livello mondiale è quello nero, seguito al 20% dalla varietà verde [1].

Solitamente la pianta viene coltivata in zone tropicali e sub-tropicali [1], poiché la sua crescita è favorita da un clima caldo umido, tuttavia, alcune varietà come quella britannica, possono tollerare il clima marino. La produzione del tè rimane comunque limitata ad alcune aree nel mondo, essendo la sua crescita soggetta a forti modifiche a seconda dei cambiamenti climatici. L'aumento della domanda di tè nel mondo è dovuta non solo ai prezzi contenuti, all'età dei consumatori ed alle sempre più diffuse informazioni su questa bevanda, ma è soprattutto legata alle sue comprovate implicazioni in ambito salutistico. Esso infatti risulta essere ricco in polifenoli, composti aromatici largamente diffusi nel mondo vegetale, che costituiscono uno dei gruppi più importanti di metaboliti secondari delle piante [2]. Tali composti, che sono anche responsabili delle caratteristiche organolettiche del cibo e delle bevande di origine vegetale, rivestono un ruolo molto importante nell'alimentazione grazie alle loro numerose attività benefiche e, non potendo essere sintetizzati dal corpo umano, devono essere assunti tramite la dieta. Le proprietà salutistiche dei polifenoli sono legate soprattutto al loro potere antiossidante, talvolta superiore anche a quello delle vitamine [3]. Possiamo definire antiossidante una sostanza che, quando presente a basse concentrazioni rispetto ad un substrato ossidabile, ne ritarda o inibisce in modo consistente i processi di degradazione [4]. In particolare, gli effetti salutistici ascritti al tè sono coinvolti nella prevenzione di malattie derivanti dall'invecchiamento come quelle cardiovascolari [5]; agendo come stabilizzatori o disattivanti dei radicali liberi, gli antiossidanti proteggono le componenti cellulari dal danneggiamento dovuto a reazioni che coinvolgono queste specie estremamente reattive [4]. Intervendendo i polifenoli anche nella inibizione degli enzimi coinvolti nel metabolismo del carcinoma, il tè risulta avere anche una funzione antimutagena [6].

I polifenoli possono essere suddivisi dal punto di vista chimico-strutturale in funzione della presenza di uno o più anelli aromatici [7], dal numero di gruppi ossidrilici e dalla presenza di pendagli monosaccaridici di diversa natura (glucosio, galattosio, etc.). Nella Tabella 1.1 sono riportati a titolo di esempio i più comuni metaboliti secondari presenti nell'infuso di tè nero [1][8].

Tabella 1.1: Polifenoli contenuti nel Tè nero

Flavonoidi	
Flavanoli	Catechina
	Catechina gallata
	Gallocatechina
	Epicatechina
	Epicatechina gallata
	Epigallocatechina
	Epigallocatechina gallata
	Procianidina
	Prodelphinidina
	Teaflavina
	Teaflavina gallata
Teaflavina digallata	
Flavonoli	Canferolo
	Canferolo galactoside
	Canferolo glucoside
	Quercetina
	Quercetina galattoside
Quercetina glucoside	
Acidi fenolici	
Acidi idrossibenzoici	Acido gallico
	Acido galloilchinico
Acidi idrossicinnamici	Acido clorogenico
	Acido cumaroilchinico
Alcaloidi	
Metilxantine	Caffeina
	Teobromina
	Teofillina

Il tè presenta numerosi componenti appartenenti alla famiglia dei flavonoidi, degli acidi fenolici, delle xantine insieme ad una serie di altri composti fra cui anche tracce di vitamine C K ed A[1]. La famiglia dei flavonoidi è chimicamente costituita da uno scheletro a 15 atomi di carbonio, il quale presenta due anelli fenolici che qui chiameremo A e B, ed un anello eterociclico C [2], e risultano essere degli antiossidanti naturali. Comunemente ci si riferisce a questa struttura con denominazione del framework C6-C3-C6. I flavonoidi sono divisi in diverse categorie a seconda

dello stato di ossidazione dell'anello C e della presenza dei gruppi ossidrilici.

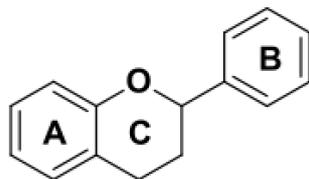
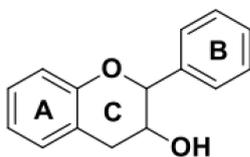


Figura 1.1: Struttura Flavonoidi

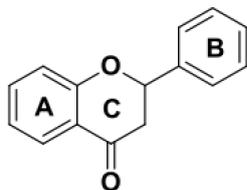
Le diverse categorie possono essere schematizzate come segue:

1. Flavani

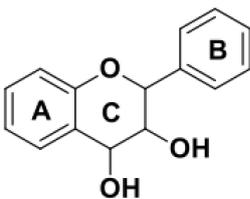
- Flavan-3-oli (ritenuto flavanoli )



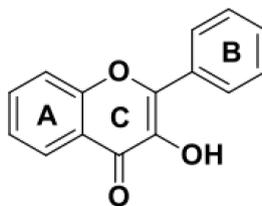
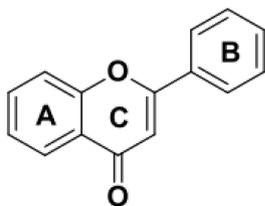
- Flavan-4-oni (ritenuto flavanonoli)



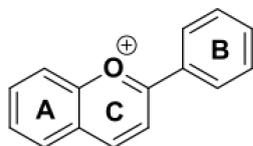
- Flavan-3,4-dioli (ritenuto leucoantocianidine)



- Flavoni e Flavonoli

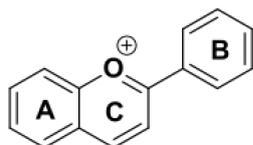


- Antocianidine e Antocianine (Antocianidin-3-glicosidi); derivati dallo ione flavilio, come struttura principale

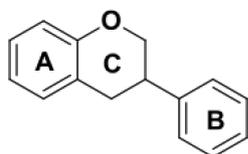


## 2. Isoflavonoidi

- Isoflavani

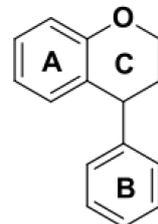


- Isoflavoni

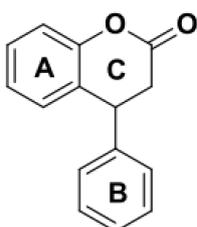


## 3. Neoflavonoidi

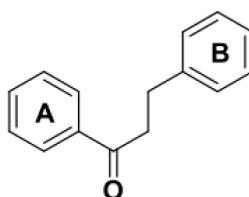
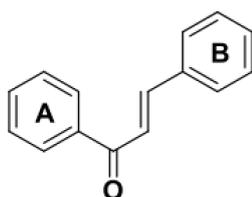
- Neoflavani



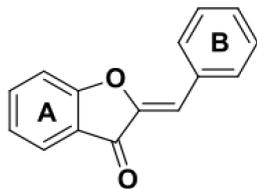
- Neoflavoni



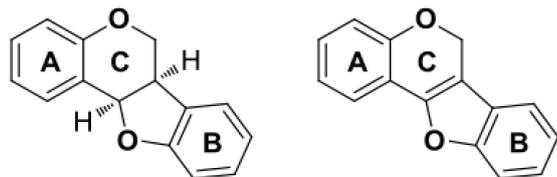
## 4. Calconi e Diidrocalconi



5. Auroni



6. Pterocarpani e 3,4-dideidroderivati



Di particolare interesse risultano essere le catechine, poiché sono quelle maggiormente presenti nel tè [9]. Appartenenti ai flavanoli, una sottofamiglia dei flavonoidi, esse presentano un potere antiossidante molto elevato mostrando anche attività antimicrobiche ed antibatteriche [10] grazie alla loro funzione di agenti riducenti [2]. Le principali catechine sono: l'epigallocatechina, l'epigallocatechina gallata (EGCG), l'epicatechina gallata, la catechina e l'epicatechina [1][9]. Fra queste, la EGCG risulta essere la maggioritaria all'interno della pianta di tè, costituendone dal 10 fino al 50% della composizione totale [9] in catechine, inoltre va sottolineato come studi riportati in letteratura indichino tale struttura come la più efficace del gruppo in termini di attività chemopreventiva [11]. Un'altra classe di componenti importante da considerare è quella degli acidi fenolici, i cui composti principali sono l'acido idrocinnamico e l'acido idrossibenzoico [7]. Nella Tabella 1.2 sono riportate le quantità medie dei principali composti presenti nel tè nero, unitamente alle relative quotazioni economiche attuali.

Tabella 1.2: Contenuto e prezzo composti fenolici

Composto	mg/g <sub>dw</sub> [12]	Euro/mg
(Epi)Catechina	7,3	70
(Epi)Catechina gallata	8,6	33,9
(Epi)Gallocatechina	6,3	21,7
(Epi)Gallocatechina gallata	25,2	1,05
Caffeina	26,3	0,56
Quercetina	3,03	4,12

Alla luce di queste premesse, negli ultimi anni vi sono state molte campagne volte a pubblicizzare gli effetti benefici del tè sull'organismo umano. Uno studio effettuato dalla FAO riporta come la crescita produttiva del tè nero, dopo un breve arresto nella stagione 2008/2009, abbia subito un importante incremento a partire dall'annata 2010/2011. Le proiezioni fino all'anno 2023 stimano una crescita di richiesta e

produzione del 3% annuo, arrivando così a più di 4 milioni di ton/y [13]. Dal punto di vista economico il costo del tè è rimasto costante fino al 2013, quando ha subito una leggera diminuzione, per poi assestarsi invece su una quota maggiore rispetto alla decade precedente [13]. La crescita della richiesta produttiva, soprattutto dai paesi in via di sviluppo come Cina ed India, non ha solo determinato un cambiamento delle strategie agro-culturali e socio-economiche, ma ha ovviamente incrementato in modo esponenziale l'ammontare degli scarti di produzione. Poiché gli attuali processi produttivi non sono stati progettati nell'ottica di una loro massimizzazione [14], si stanno recentemente intraprendendo studi volti allo sviluppo e al design di impianti con prestazioni ed efficienza estrattiva ottimizzate al fine di recuperare dagli scarti di produzione dell'industria del tè non solo le xantine [15], ma anche i composti di tipo fenolico [14][15].

### 1.1.1 GreenChemistry

L'ultimo decennio ha visto da parte di industrie, e delle filiere in generale, un crescente impegno finalizzato alla riduzione gli scarti di produzione ed alla massima valorizzazione di quelli inevitabilmente generati. Si stanno ponendo le basi per un mondo industriale che rivolga una particolare attenzione verso la protezione dell'ambiente e verso la tutela della salute umana [16]. Il condensarsi di questi sforzi ha dato vita al complesso concetto di *Green Chemistry*, concetto complesso e applicabile ad una vastissima gamma di ambiti e discipline. Contestualizzare questo discorso ad industrie di produzione alimentare e farmaceutica equivale ad una visione nuova della chimica e dell'ingegneria chimica, una nuova concezione del progetto, dello sviluppo e della implementazione di prodotti e processi chimici [17]. Negli anni, il numero di chimici ed ingegneri impegnati nell'ambito della *Green Chemistry* sta progressivamente aumentando. In questo contesto, i "12 Principi della *Green Chemistry*" sono diventati una serie di criteri accettati per definire un processo sostenibile, aiutando scienziati ed ingegneri a creare processi migliori, ideando dei modi ecosostenibili di ridurre e recuperare gli scarti, migliorare i consumi energetici, e sviluppare alternative all'utilizzo di sostanze pericolose. Parallelamente trovano spazio i "12 Principi della *Green Engineering*" [17], riassunti unitamente a quelli della *Green Chemistry* nella Figura 1.2. I 24 principi vengono incorporati nelle due parole: *PRODUCTIVELY* (per quanto riguarda la *Green Chemistry*), ed *IMPROVEMENTS* circa la *Green Engineering* [18]. La scelta di condensare tutti questi concetti in due sole parole aiuta a spostare l'attenzione sui benefici che si possono trarre da processi chimici più attenti all'impatto ambientale rispetto a quelli esistenti, promuovendo l'utilizzo di materie prime rinnovabili e sostenibili.

In quest'ottica si può affermare che: *“Un'estrazione green è basata sulla scoperta e sulla progettazione di un processo che riduce il consumo di energia, permette l'utilizzo di solventi alternativi e di prodotti rinnovabili naturali, garantisce un processo sicuro ed un prodotto/estratto di elevata qualità”* [19] Nell'ambito delle *Green Extractions* si sono studiate varie soluzioni atte a dimostrare i vantaggi che queste portano in termini sia economici che di rese ottenute, in quanto risultano in un'ottimizzazione dei processi già esistenti, portando ad un consumo consapevole ed ottimale delle materie prime, tenendo conto delle normative sempre più strin-

Principles of Green Chemistry	Principles of Green Engineering
<b>P</b> - prevent waste	<b>I</b> - inherently non-hazardous and safe
<b>R</b> - renewable materials	<b>M</b> - minimize material diversity
<b>O</b> - omit derivatization steps	<b>P</b> - prevention instead of treatment
<b>D</b> - degradable chemical products	<b>R</b> - renewable material and energy inputs
<b>U</b> - use safe synthetic methods	<b>O</b> - output-led design
<b>C</b> - catalytic reagents	<b>V</b> - very simple
<b>T</b> - temperature, pressure ambient	<b>E</b> - efficiente use of mass, energy, space and time
<b>I</b> - in-process monitoring	<b>M</b> - meet the need
<b>V</b> - very few auxiliary substances	<b>E</b> - easy to separate by design
<b>E</b> - E-factor, maximize feed in product	<b>N</b> - networks for exchange of local mass and energy
<b>L</b> - low toxicity of chemical products	<b>T</b> - test the life cycle of the design
<b>Y</b> - yes it's safe	<b>S</b> - sustainability throughout product life cycle

Figura 1.2: Acronimi *Green Chemistry ed Engineering*, Immagina modificata da [18]

genti sull'utilizzo di solventi pericolosi o tossici, diminuendo al contempo i costi di smaltimento e recupero. Quindi, come definito da Chemat, Cravotto e Vian [19], le tre linee guida principali delle *Green Extractions* possono riassumersi in:

- Miglioramento ed ottimizzazione dei processi già esistenti;
- L'utilizzo di equipaggiamenti non esclusivi per l'estrazione;
- Innovazione nel processo, nelle procedure ed anche nell'individuazione di solventi alternativi.

E' possibile ritrovare richiami a queste idee sviluppando i 12 principi della *Green Engineering* [17]:

1. **Inherent Rather Than Circumstantial**: i progettisti devono impegnarsi per garantire che tutti i materiali e gli input ed output energetici non siano pericolosi;
2. **Minimize Material Diversity**: la diversità dei materiali nei prodotti multicomponenti dovrebbe essere minimizzata in modo tale da favorirne lo smontaggio ed un eventuale riutilizzo;
3. **Prevention Instead of Treatment**: i prodotti di scarico devono essere ridotti al minimo o reinventati durante il processo, in modo tale da snellirne il trattamento a valle;
4. **Renewable rather than Depleting**: le fonti di energia e di materia prima dovrebbero essere rinnovabili piuttosto che volti ad impoverimento nel tempo.
5. **Output-Pulled Versus Input-Pulled**: i processi devono essere rivolti al prodotto finale, senza guardare troppo agli input iniziali;

6. **Conserve Complexity**: la progettazione di un impianto deve tener conto dell'entropia e della complessità del sito, in modo tale da ottimizzare le scelte riguardanti eventuali ricicli o riusi;
7. **Efficiency**: per qualsiasi processo o prodotto chimico i sistemi devono essere progettati in modo tale da massimizzare l'efficienza sotto ogni aspetto (massa, energia, spazio, tempo);
8. **Meet Need, Minimize Excess**: durante la progettazione ogni apparecchiatura deve essere consona ai volumi che incontrerà, in modo tale da non appesantire inutilmente il sito d'impianto;
9. **Design for Separation**: le operazioni unitarie di separazione e purificazione dovrebbero essere progettate in modo tale da minimizzare sia i consumi energetici che i materiali utilizzati;
10. **Integrate Material and Energy Flows**: il design del processo deve includere un'integrazione energetica, facendo sì che nulla vada sprecato, ed una connessione fra i flussi di materiali;
11. **Design for Commercial 'Afterlife'**: bisogna far sì che al fine vita dell'impianto questo possa essere riutilizzato per nuovi processi;
12. **Sustainability; Durability rather than Immortality**: il prodotto deve poter essere reinventato nel tempo, in modo tale da garantirne la competitività sul mercato.

Bisogna quindi focalizzare l'attenzione sul design di impianti che prevedano il fine ultimo del prodotto e la valorizzazione degli scarti di produzione sfruttando vecchie e nuove tecnologie, rileggendo in chiave più sostenibile sistemi ed impianti ad oggi dati per consolidati, vincendo l'iniziale inerzia e la resistenza al rinnovamento.

## 1.2 Tecniche di Intensificazione di Processo

### 1.2.1 Estrazione Assistita da Ultrasuoni

Le tecnologie ed i metodi di estrazione rivestono un ruolo cruciale nella sostenibilità di processi già esistenti o per recuperare in modo efficiente i sottoprodotti derivanti da scarti dell'industria alimentare farmaceutica e cosmetica [20]; per questo sembra essere di rilevante importanza rendere il processo più *green* per quanto concerne la sostenibilità e la competitività del processo nel mercato globale. Finora il processo estrattivo ha generalmente previsto l'impiego di solventi organici convenzionali quali alcoli (o soluzioni idroalcoliche), idrocarburi, eteri e clorurati. Questi però presentano diversi svantaggi sia dal punto di vista dei rischi per la salute umana, sia perché una parte del solvente potrebbe rimanere come residuo nel prodotto finale [9], rendendo quindi necessari ulteriori passaggi di purificazione. Diventa quindi di rilevante importanza rendere il processo più *Green* per quanto concerne la sua sostenibilità e la sua competitività nel mercato globale. In quest'ottica si collocano le tecnologie ad ultrasuoni(UAE, *Ultrasound Assisted Extraction*),

le quali in diversi casi sono risultate essere le più efficienti tra le così dette tecnologie abilitanti che comprendono anche le estrazioni assistite da microonde (MAE, *Microwave Assisted Extraction*), e quelle con i fluidi supercritici (SFE, *Supercritical Fluid Extraction*) [16]. La UAE costituisce una tecnologia ormai conosciuta a livello accademico ed emergente nei processi industriali [21]. La possibilità che la tecnica offre di poter aumentare significativamente il recupero di componenti naturali, implementare le rese estrattive riducendo contemporaneamente al minimo la degradazione dei prodotti, diminuendo non ultimo tempi e temperature di processo, rende vantaggiose anche estrazioni fatte a temperatura ambiente. Queste considerazioni possono essere particolarmente apprezzate in ambito alimentare, se si considera che molti prodotti di tale industria possono risultare vulnerabili alle alte temperature e sensibili ai cambiamenti fisici e chimici. I composti fenolici, ad esempio, solitamente si degradano a temperature superiori ai 70 °C, per questo il range operativo ottimale per la loro estrazione risulta essere fra i 20 °C ed i 50 °C [9]. L'impiego degli ultrasuoni consente non solo di ridurre i costi di processo, ma anche di lavorare utilizzando solventi come l'acqua, atossici e sostenibili dal punto di vista ambientale. I trattamenti post-produzione dei reflui di processo vengono snelliti consumando solo una frazione del tempo e dell'energia richiesti dai sistemi estrattivi convenzionali [22], mantenendo però al contempo invariata la qualità (e.g. le caratteristiche organolettiche) dei prodotti ottenuti [23]. Gli impianti di estrazione ad ultrasuoni offrono anche il vantaggio, molto apprezzato dall'industria, di richiedere equipaggiamenti semplici e pratici, che consentono un rapido *start-up* ed un aumento della produzione, riducendo di pari passo i costi grazie all'eliminazione di molti passaggi di processo. Non ultimo, va sottolineato che queste tecniche hanno prestazioni che risultano essere molto riproducibili [16] e presentano un ampio range di applicabilità.

### 1.2.2 Cavitazione

Il grande vantaggio nell'uso degli ultrasuoni è dato dal fenomeno della cavitazione, influenzato dalla scelta del solvente (bassa tensione di vapore e viscosità), dalla dimensione delle particelle (se troppo piccole tenderebbero a galleggiare sulla superficie del solvente[20]) e dal tempo di trattamento che, se troppo prolungato, potrebbe portare alla degradazione delle sostanze d'interesse.

Importante è anche la scelta del rapporto solido/liquido e della temperatura di processo, oltre al controllo dell'andamento della cinetica di estrazione con il variare dei parametri sopra citati; va considerato che al diminuire della velocità di diffusione del solvente nella matrice, si arriva ad una condizione di equilibrio che comporta una perdita di efficienza nel trasferimento di massa (*mass transfer*).

Il fenomeno della cavitazione può essere indesiderato a causa delle temperature e pressioni che si vengono a creare nella soluzione. Tuttavia, nel caso in cui sia controllato, esso può essere sfruttato a vantaggio del processo effettuato. Si genera la cavitazione nel momento in cui, alla temperatura di lavoro, la pressione locale del liquido raggiunge un livello inferiore alla propria pressione di vapore [24][21].

Tipicamente questo fenomeno viene suddiviso in [25]:

- **Cavitazione Idrodinamica:** La cavitazione idrodinamica viene generata tramite il passaggio di un liquido attraverso costrizioni quali ad esempio pia-

stre forate o valvole si strozzamento. Quando il liquido attraversa l'impedimento, la sua velocità aumenta a scapito della pressione. Se il frenamento è sufficiente a far diminuire la pressione sotto il valore soglia (normalmente coincidente con la tensione di vapore del mezzo utilizzato, alla temperatura di esercizio), si ha la generazione di cavità. Una volta che la pressione torna alla normalità, le cavità collassano, cedendo elevate quantità di energia all'intorno. L'intensità del calo di pressione, e quindi dell'energia generata, dipende strettamente dalla geometria della costrizione imposta nel sistema;

- **Cavitazione Acustica:** le bolle di cavitazione vengono generate grazie ad onde acustiche di compressione/rarefazione che agiscono direttamente sul liquido. Questa tecnica verrà approfondita di seguito.

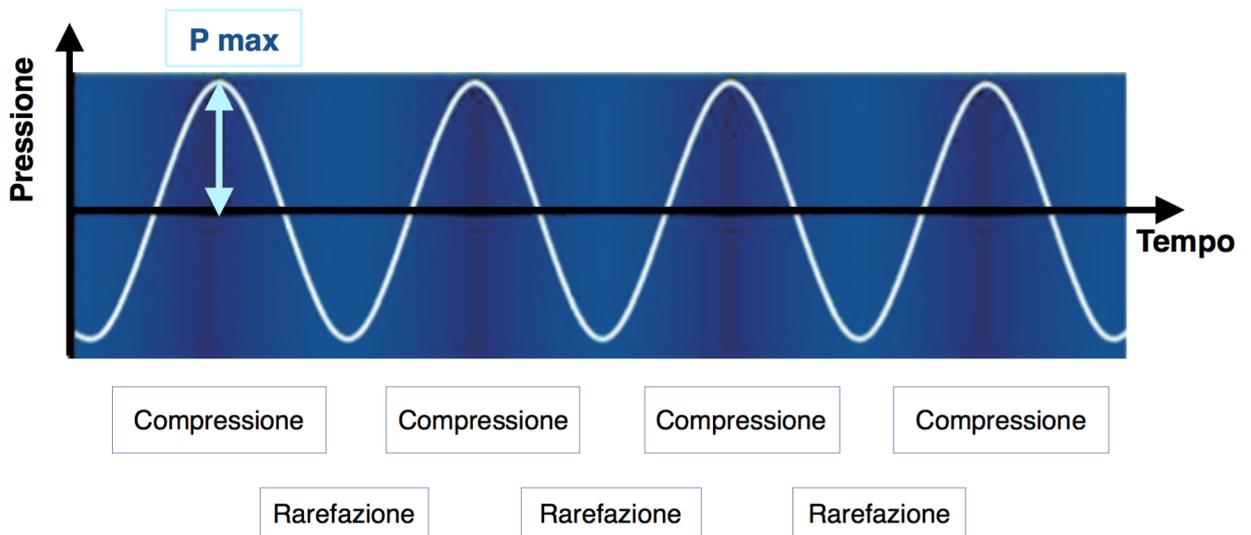


Figura 1.3: Cicli di Rarefazione e Compressione, *Immagine modificata da [26]*

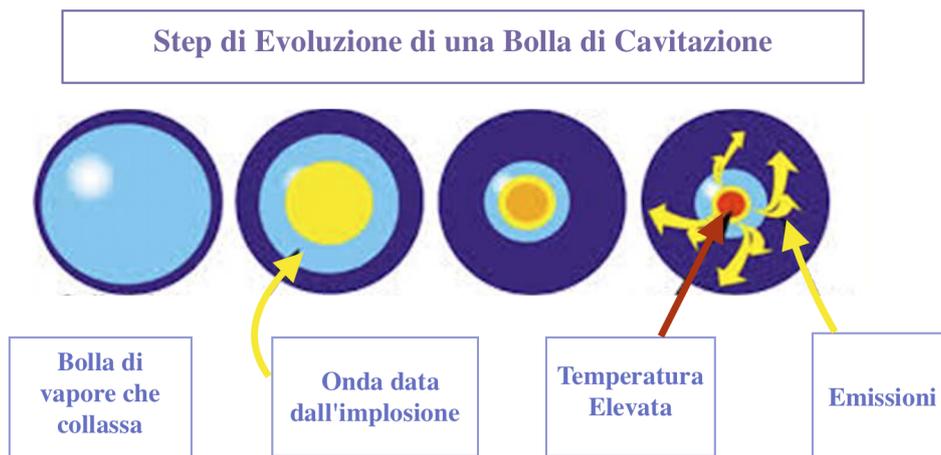


Figura 1.4: Step Cavitazione Bolla

Gli ultrasuoni utilizzano frequenze oltre l'udibile umano, più basse delle microonde (da 20 kHz a 10 MHz)[22]. Le onde sonore causano una successione di compressioni (alta pressione) e rarefazioni (bassa pressione) nel mezzo [27], il quale presenta una propria distanza molecolare, la quale viene alterata da questo meccanismo (come in Figura 1.4).

Al di sotto di questa distanza critica il liquido rimane intatto, al di sopra si iniziano a creare dei vuoti, le bolle di cavitazione. Una volta generate esse aumentano la loro dimensione durante le fasi di rarefazione e la diminuiscono durante i cicli di compressione. L'applicazione degli ultrasuoni processa delle onde sinusoidali all'interno del mezzo liquido, che portano le bolle a crescere fino alla loro dimensione critica [21]. Quando questa viene raggiunta esse collassano, implodendo durante un ciclo di compressione e portando ad un ingente aumento di energia Figura 1.3. Il collasso solitamente avviene in condizioni vicine all'adiabaticità[28], grazie alla conversione in energia termica (calore) dell'energia cinetica data dall'onda sonora a contatto con il mezzo liquido in condizioni di turbolenza [21]. Il fenomeno genera temperature e pressioni molto elevate, arrivando fino a 5000 K e 1000 bar nel climax di implosione [28]. Questo aumento repentino di temperatura e pressione porta alla formazione di *hot spots*, i quali vengono utilizzati per accelerare la reattività all'interno del sistema o per esercitare effetti fisici su una matrice all'interno del mezzo.

Gli ultrasuoni sfruttano quindi vibrazioni meccaniche trasmesse al liquido con frequenze ultrasoniche[28], generando bolle di implosione di diverse dimensioni e conseguenti *jet streams*, i quali trasferiscono energia al sistema (su una matrice da estrarre, ad esempio) favorendo il trasporto di massa. Si possono ottenere effetti "fisici" o di generazione di radicali a seconda della frequenza selezionata. [16]: frequenze molto elevate (ca. 1MHz) fanno sì che la bolla abbia un tempo di crescita molto breve, circa 5  $\mu$ s, un tempo non sufficiente affinché il fenomeno di cavitazione avvenga correttamente; al contrario frequenze inferiori (ca. 20 kHz) portano la bolla ad avere a disposizione circa 25  $\mu$ s per la fase di crescita durante i cicli di rarefazione [32].

Questo si traduce, ad elevati valori di frequenza nell'ordine dei Mhertz, in piccoli e frequenti fenomeni di cavitazione, generati da bolle di piccola dimensione, mentre a frequenze più modeste si avranno fenomeni meno frequenti ma più energetici [30]. Ad alte frequenze inoltre vengono accentuati i fenomeni dissociativi del solvente, in grado di generare radicali liberi (es.  $\cdot$ OH in acqua) che possono minare la stabilità di eventuali composti sensibili (molecole facilmente ossidabili, come i polifenoli). Per l'estrazione di composti fenolici, pertanto, come per la grande maggioranza delle UAE, si lavora a basse frequenze (intorno ai 20 kHz generalmente), in cui è possibile limitare la degradazione radicalica e massimizzare l'effetto fisico della cavitazione e quindi l'azione sulle membrane vegetali della matrice.

Quando le bolle collassano sulla superficie di un materiale solido, le alte pressioni e temperature generate risultano in elevati sforzi tangenziali, i quali aumentano la superficie solida esposta della matrice [25]. Applicando ai processi estrattivi gli ultrasuoni, questi portano a macerazione e rottura della parete cellulare da parte di microgetti diretti sulla superficie del solido aumentando notevolmente anche il trasferimento di massa [21]. La cavitazione fa in modo di focalizzare puntualmente

intense energie per danneggiare fisicamente le strutture vegetali [31], portando ad una migliore penetrazione del solvente nella matrice e ad un più semplice rilascio dei componenti d'interesse (Figura 1.5 1.6). I *microjets* sono il fattore preponderante del fenomeno cavitazionale, poiché recano danni strutturali alla cellula favorendo il rilascio dei composti target.

La presenza di *hot spots* dispersi in un *bulk* a temperatura ambiente, permette di ottenere gli effetti sopra citati tamponando l'aumento di temperatura complessivo del sistema, riducendo la degradazione termica nel processo. Di particolare interesse risulta quindi l'utilizzo di questo metodo non convenzionale per l'estrazione di prodotti naturali e composti vegetali.

### 1.3 Scopo della Tesi

Lo scopo di questa tesi è stato quello di definire e progettare un processo estrattivo sostenibile, applicabile al recupero degli scarti di lavorazione dell'industria del tè. L'obiettivo è stato sfruttare la tecnologia degli ultrasuoni per ottenere un estratto acquoso ad elevato tenore di polifenoli. Nel campo alimentare, solitamente le estrazioni vengono eseguite grazie all'impiego di solventi che, per quanto necessariamente identificati come utilizzabili in tale ambito, sono comunque di natura organica e possono avere implicazioni negative di tossicità e inquinamento ambientale. Nell'ottica di un processo innovativo e sostenibile si è scelto di utilizzare come solvente l'acqua, sfruttando reattori ad ultrasuoni per incrementare il potere estrattivo del sistema. L'acqua infatti non presenta caratteristiche chimico/fisiche particolarmente affini ai composti di tipo fenolico e non consente quindi di ottenere delle buone rese estrattive, se non applicando temperature operative elevate, con il conseguente aumento dei costi di processo e con il rischio di determinare una degradazione termica dei bioattivi di interesse. La messa a punto di un simile sistema operativo può soddisfare i requisiti della *Green Chemistry* e della *Green Engineering* ed essere condotto a temperatura ambiente, portando al contempo all'ottenimento di rese elevate. Lo scopo finale del processo estrattivo è un prodotto costituito da una miscela di composti polifenolici, per i quali l'interesse di mercato è in continua crescita ed espansione. Un processo di questo genere è in grado di riconvertire materiali di scarto in prodotti dall'elevato valore aggiunto, richiedendo spese di gestione minime per l'impianto e per le *utilities* necessarie, considerata l'assenza di solventi (se non acqua) e di elevate temperature.

Il lavoro è stato suddiviso in due parti:

- la prima, condotta in laboratorio, ha previsto la raccolta diretta di dati, necessaria per definire un modello cinetico che descriva al meglio il processo di estrazione;
- la seconda è stata invece finalizzata alla progettazione di un impianto estrattivo, sulla base dei dati ottenuti nella fase preliminare. I modelli che ne sono derivati sono stati riprocessati ed impiegati in modo da ottenere un progetto il più possibile aderente ai dati sperimentali.

Durante la fase di *plant design* è stata considerata la sola sezione di estrazione, poiché non sono state effettuate prove dirette di purificazione del prodotto, per le

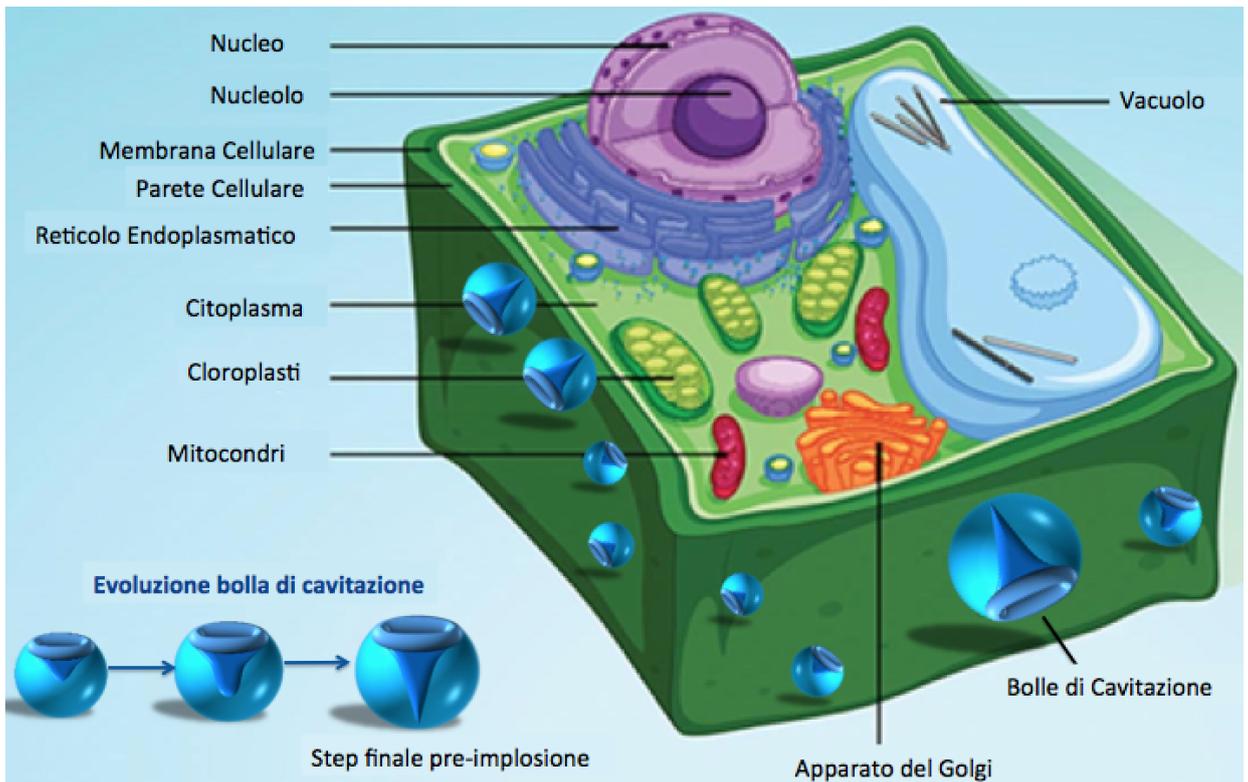


Figura 1.5: Cellula Vegetale durante Cavitazione

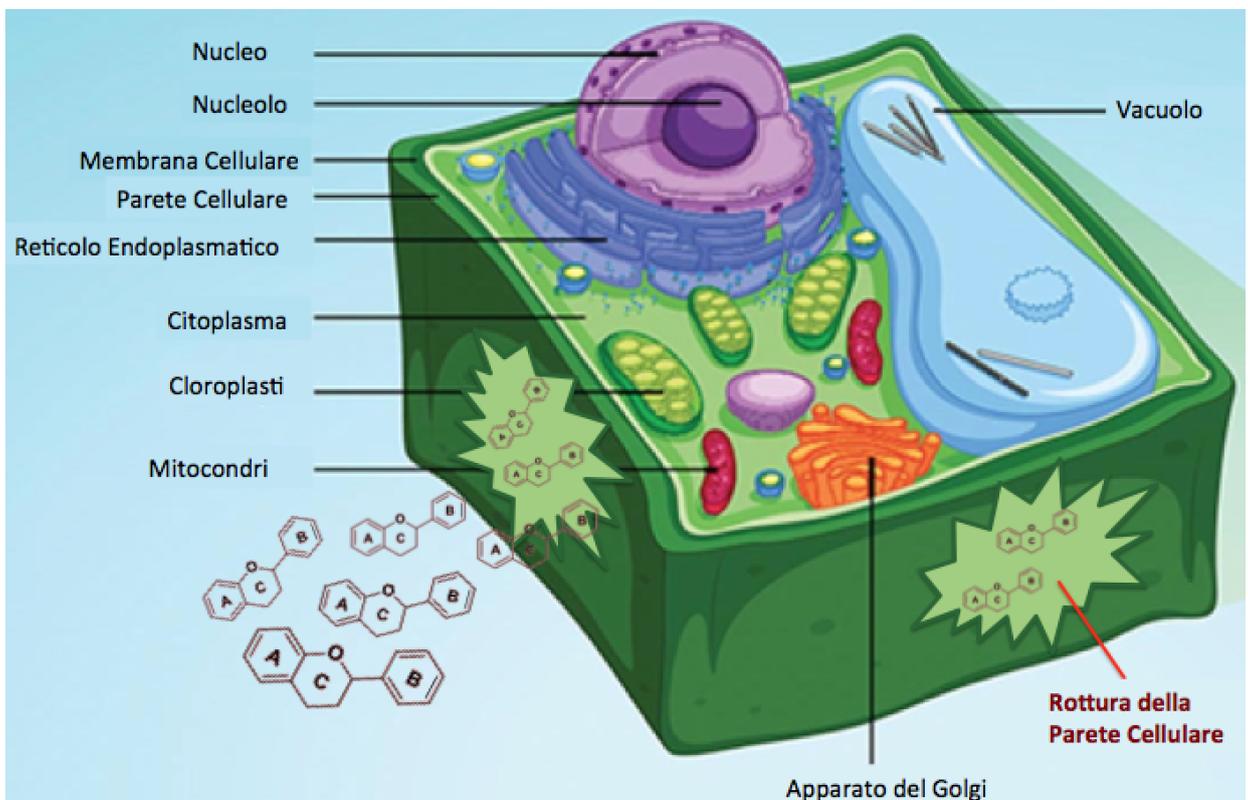


Figura 1.6: Rottura Parete Cellulare

quali si fa riferimento ai dati riportati in letteratura, e che sono comunque facilitate dalla presenza di sola acqua. Con l'obiettivo di ridurre al minimo i costi di approvvigionamento mantenendo un elevato afflusso di materia prima, per la collocazione dell'impianto si è scelta la regione di Assam, in India, in modo tale da massimizzare il bacino di raccolta dei flussi di scarto dell'industria del tè, per un raggio di 20 km. Nella sezione riguardante lo studio in laboratorio, sono state sfruttate tecniche e strumentazioni dedicate per la caratterizzazione chimica e fisica sia della matrice che dell'estratto. Per quanto concerne il processo estrattivo è stato effettuato un accurato screening dei parametri più influenti nel processo di estrazione, quali tempi, temperature, rapporti matrice/solvente e passaggi estrattivi. Una volta raggiunte le condizioni ottimali, si è proceduto alla definizione di un modello cinetico per i diversi sistemi considerati. A questo scopo si è utilizzato il Modello di Peleg, necessario inoltre per la definizione della  $k_{La}$  e dei parametri fluidodinamici influenti la diffusione dei polifenoli nel mezzo solvente, essenziali per la sezione progettuale.

## Capitolo 2

# Descrizione Attività Sperimentale

### 2.1 Caratterizzazione Matrice

Durante questo progetto di tesi si è partiti da un primo *screening* di diversi *blend* di tè commercialmente disponibili per verificare quale delle tipologie presentasse il più alto contenuto di polifenoli. In Tabella 2.1 sono elencati i campioni di tè nero investigati.

Tabella 2.1: Tipologie di tè disponibili

Tè nero	Provenienza	Grade
Madhujing	Assam, India	Orthodox Bulk
Bamadur	Assam, India	CTC Bulk
South Indian	Assam, India	GBOP
Kavuzi	Malawi	CTC Bulk
Nilgiri	Assam, India	CTC (BPS)
Chisunga	Malawi	CTC Bulk

Qui di seguito sono elencati gli acronimi utilizzati per distinguere i *blend* per composizione e trattamento delle foglie.

- GBOP, *Golden Broken Orange Pekoe* tipologia di tè a foglia spezzata. Individua un tè nero con una specifica dimensione delle foglie secche lavorate;
- CTC, *Crush, Tear and Curl* rappresenta il metodo più diffuso di trattamento del tè, nel quale le foglie vengono rotte e fatte passare attraverso dei rulli cilindrici fino alla formazione di particelle sferiche di tè piccole e resistenti;
- Orthodox: è il metodo più tradizionale di processare le foglie di tè, le quali rimangono sfuse o tagliate a strisce;
- BPS, *Broken Pekoe Souchong*.

I tè di taglio commerciale sono stati forniti dalla ditta *Dunsheri Tea Industries Ltd.*

Una volta individuata la matrice più idonea a questo tipo di studio, si è proseguito ad un dettagliato *screening* estrattivo. L'approfondimento è avvenuto sia sul taglio commerciale che sul relativo residuo di produzione industriale, in modo da poter effettuare un confronto e validare il riutilizzo di una matrice di scarto secondo i principi di sostenibilità e *circular economy*. Il *blend* individuato per il più alto contenuto in polifenoli (tè nero), è stato innanzitutto caratterizzato secondo composizione ponderale e granulometria, sia per il taglio tisana (South Indian, India) che per lo scarto di produzione (Ceylon Orange BP, *Broken Pekoe*). Si dettagliano di seguito procedure e caratteristiche delle due matrici:

### Vagliatura

La stima del diametro delle matrici è avvenuta tramite un processo di vagliatura, ossia una quantità nota di ogni campione (8 g) è stata fatta passare attraverso setacci in serie (Giuliani) con pori ad ordine decrescente di diametro. Si è operato pesando la frazione di solido che viene trattenuta da ciascun livello, in modo da ottenere una stima della dimensione media ponderata. Dall'analisi, il taglio tisana si presenta in forma di grani grossolani, con un diametro medio superiore a 1000 ( $\mu\text{m}$ ). La seconda matrice invece, derivante dallo scarto di produzione industriale, è risultata di aspetto simile ad una polvere e dal diametro medio inferiore a 200 ( $\mu\text{m}$ ).

### Analisi Ponderale

Una volta definita la granulometria, si è passati alla caratterizzazione del tenore di umidità e del contenuto di materiale organico della matrice, tramite il metodo termo-gravimetrico ponderale, articolato in 2 passaggi. Un'adeguata quantità di campione (200 mg ca) è stata pesata in un crogiolo, il quale viene inserito in una muffola (Gelman Instrument) preriscaldata a 100°C. Il campione viene lasciato in temperatura per 12 ore, risalendo poi alla quantità d'acqua eliminata tramite valutazione del peso di campione secco. Il secondo passaggio prevede il trattamento del medesimo campione essiccato a 650°C, temperatura alla quale viene esposto per 4 ore al fine di ottenere un residuo composto esclusivamente da sali inorganici (ceneri). Registrando la relativa perdita in peso è possibile valutare il contenuto di materiale organico totale, eliminato durante l'ultima parte della procedura.

Nella sottostante Tabella 2.2 sono visibili le composizioni percentuali di entrambe le matrici.

Tabella 2.2: Composizione Matrici

Tè nero	Umidità	Organico	Ceneri
South Indian (Taglio Tisana)	7,59%	87,26%	5,14%
Ceylon Orange (Residuo di Produzione)	10,30%	83,89%	5,81%

## Pretrattamento - Calandratura

La calandratura è un processo meccanico solitamente utilizzato nell'ambito dei materiali plastici. Degli studi hanno evidenziato come il passaggio della matrice attraverso i rulli della calandra aumentasse la resa finale delle estrazioni. È stato quindi valutato *una tantum* l'effetto di questo pretrattamento, processando un quantitativo di matrice di tipo "taglio tisana" (*South Indian*) tramite questo metodo attraverso diversi passaggi e adeguando la posizione dei rulli anche ai tagli più piccoli della matrice. L'apparecchiatura (KonMix , km-s65) si presenta composta da tre rulli dotati di coltelli raschianti alle estremità, utili allo sminuzzamento della matrice; i tre rulli svolgono la funzione di spremitura dei materiali muovendosi a diverse velocità, in modo da accrescere l'efficienza del trattamento.

## 2.2 Apparecchiature Estrattive

### 2.2.1 Cup-Horn

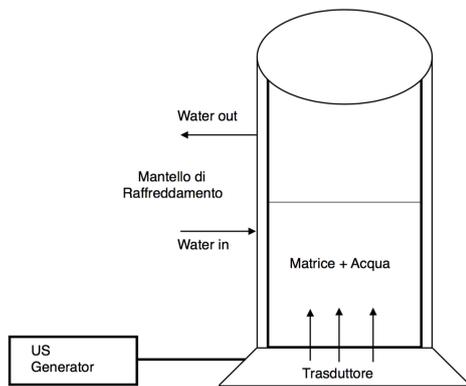


Figura 2.1: R.E.U.S.S. *Immagine modificata da [14]*

contenuta nel reattore. Il generatore opera ad una frequenza fissa di 25 kHz e con 200 W di potenza. La regolazione del tempo di sonicazione viene effettuata tramite un timer posto sul generatore che può essere impostato da 1 a 60 minuti (visibile in Figura 2.1).

La potenza fornita dall'US alla soluzione di estrazione porta alla generazione di calore che si dissipa all'interno dell'apparecchiatura, portando ad un aumento della temperatura. Questo fenomeno viene mitigato dalla presenza di una camicia di raffreddamento esterna alimentata tramite acqua di rete; Con lo scopo di caratterizzare efficacemente il sistema estrattivo è stata effettuata una stima del potere calorimetrico scambiato a diverse portate, sia di soluzione processata che di acqua di raffreddamento. Questo dato è stato fondamentale anche per definire l'effettiva potenza fornita dagli ultrasuoni alla soluzione che viene calcolata tramite l'equazione 2.1 sottostante.

L'estrazione è stata effettuata con un reattore ad ultrasuoni di tipo PEX1 (R.E.U.S.S., Contes, France), avente dimensioni interne pari a 14x10 cm, e capacità massima pari ad 1L [14]. In fase preliminare è stata anche utilizzata un'apparecchiatura analoga in forma e funzionamento, ma di dimensioni ridotte, e di seguito definita come "R.E.U.S.S.1".

Questo estrattore è equipaggiato con un trasduttore piezoelettrico alla base della cavità, il quale riceve un segnale modulato dal generatore US e lo traduce in cicli di compressione/espansione meccanica, generando cavitazione all'interno della soluzione

$$P = m * c_p * \frac{dT}{dt} \quad (2.1)$$

L'equazione è caratterizzata dalla massa del solvente utilizzato per le misure, dal calore specifico di esso  $c_p$ , ed infine dal rapporto  $dT/dt$ , il quale rappresenta l'aumento della temperatura nell'unità di tempo considerata. Come tempo di processo si è scelto di procedere per 30 minuti. In Tabella 2.3 si riportano i risultati ottenuti al variare della portata di acqua di raffreddamento, i quali evidenziano i benefici dati dalla presenza del mantello refrigerante e il miglioramento della dispersione del calore prodotto all'aumentare della portata di acqua refrigerante.

Tabella 2.3: Potere Calorimetrico

$\Delta T$	Portata acqua	Q(W)
38,4	-	13,4
23,5	0,1 (l/s)	8,19
19,8	0,2 (l/s)	6,9

## 2.2.2 Sistema Convenzionale



Figura 2.2: Sistema Convenzionale

Le estrazioni effettuate con metodi convenzionali sono state utilizzate come confronto, sia per determinare il contenuto polifenolico totale della matrice, sia per riprodurre estrazioni alla temperatura di esercizio del sistema US (inferiore ai 40°C), valutando il fenomeno della cavitazione escludendo l'effetto del riscaldamento. La quantificazione totale di polifenoli è necessaria per poter effettuare dei confronti in termini di resa ed esaurimento della matrice, nonché per i calcoli di progettazione dell'impianto estrattivo ( $k_{L,a}$ ).

Ai fini di simulare un reattore perfettamente miscelato (CSTR), la matrice viene inserita insieme all'adeguato volume di solvente (per rispettare il rapporto S/L) in un pallone in vetro pyrex da 100 mL dotato di ancoretta magnetica. Per raggiungere la temperatura di esercizio vengono utilizzati una piastra riscaldante magnetica ed un bagno di olio siliconico preriscaldato (alla temperatura di ebollizione del solvente scelto, nel caso di estrazioni "a ricadere"). Il pallone viene collegato tramite pinza e ritto ad un condensatore a bolle refrigerato ad acqua, che assicura la ricaduta del solvente eva-

porato. Il sistema è visibile in Figura 2.2.

### 2.2.3 Estrazioni

In funzione a dati precedentemente raccolti dai ricercatori del laboratorio per le estrazioni US assistite, si è scelto di utilizzare un rapporto L/S pari a 15, in modo da ottenere una soluzione con una viscosità accettabile, che non impedisca il fenomeno cavitativo e riduca al contempo il surriscaldamento e la sedimentazione della matrice, il tutto minimizzando la quantità di solvente necessario. L'innovazione di questa attività di laboratorio risiede, inoltre, nel mantenimento di una temperatura operativa prossima a quella ambiente, o che comunque non superi i 45° C, in modo tale da massimizzare la cavitazione (inefficiente a temperature superiori) senza incorrere nella degradazione dei composti fenolici che può avvenire attorno agli 80°C. Per la quantificazione di polifenoli contenuti nella matrice, avvenuta tramite estrazioni convenzionali, ci si è affidati a metodiche disponibili in letteratura.

#### Estrazione con Cup-Horn

Un'adeguata aliquota di tè nero (10.0 g) è stata addizionata della relativa quantità d'acqua (150 mL di acqua di rete) mantenendo un rapporto liquido/solido pari a 15, miscelando il tutto direttamente nella cavità del reattore della R.E.U.S.S. . Una volta collegate le tubazioni siliconiche del mantello raffreddante si regola un flusso d'acqua tale da mantenere la temperatura nel range adeguato. Tramite l'attivazione del timer posto sul generatore l'estrazione ha inizio e la temperatura viene monitorata ogni 5 minuti per mezzo di una termocoppia.

Fra le prove effettuate si evidenziano:

- Estrazioni in 15 minuti (in R.E.U.S.S.1) volte a trovare il *blend* con il quantitativo maggiore di polifenoli;
- Estrazioni di diversa durata per entrambe le matrici (taglio tisana ottimizzato e scarto industriale) per trovare il tempo ottimale da utilizzare;
- Riestrazioni di solido e liquido esausto sul tempo ottimizzato nell'ottica di simulazione di un impianto *cross-flow*.

#### Estrazione Convenzionali

Un'adeguata aliquota di tè nero (3.0 g) è stata addizionata della relativa quantità dell'opportuno solvente (150 mL o 300 mL), mantenendo un rapporto liquido/solido pari a 15 o 30. Si sono anche effettuate delle estrazioni con identica impostazione in due *step* successivi e a lunga durata, al fine di verificare i dati ottenibili da un completo esaurimento della matrice come di seguito elencato:

- Quantificazione in etanolo in 2 step (ciascuno da 3 ore) con L/S 30;
- Quantificazione in etanolo in 2 step, con L/S a 15;
- Quantificazione in acqua a ricadere in 2 step (ciascuno da 3 ore) con L/S 30;

- Estrazioni over night sia in acqua che in etanolo a temperatura ambiente;
- Quantificazione idroalcolica (50% acqua 50% etanolo)[33];
- Confronto tecnologico utilizzando in convenzionale i parametri dell'estrazione ottimizzata.

#### 2.2.4 *Work up* post-estrazione

Al termine di ogni estrazione, la soluzione è stata filtrata con un sistema a vuoto composto da beuta codata e filtro sinterizzato (da 16 a 40  $\mu\text{m}$ ) e il residuo solido ulteriormente lavato con il relativo solvente fresco. La frazione liquida viene raccolta, unita e quantificata. Nella maggior parte delle prove effettuate, un'aliquota della fase liquida (ca. 75 mL) è stata sottoposta a centrifugazione (4000 rpm per 30 min) per rimuovere eventuali residui solidi che falserebbero le rese di estrazione. Il surnatante è stato 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  $-60^\circ\text{C}$ ). Questo processo permette di essiccare l'estratto preservandolo da fenomeni degradativi, arrivando a raggiungere un tenore di umidità residua inferiore all'1%. L'estratto è stato quindi convertito in una polvere disidratata alla quale, tramite aggiunta successiva di acqua, si possono restituire le caratteristiche precedenti[34]. Il solido ottenuto costituisce l'estratto finale, che viene pesato e conservato a  $4^\circ\text{C}$ . Nel caso in cui l'estrazione in esame preveda l'utilizzo di solventi diversi dall'acqua (etanolo o miscela idroalcolica), la frazione alcolica deve essere eliminata prima della liofilizzazione tramite sistema evaporativo sotto vuoto (Rotavapor LabTech, pompa Heidolph).

### 2.3 Analisi dei Dati

#### 2.3.1 Quantificazione polifenoli totali - TPC

La quantificazione del contenuto totale di polifenoli è stata effettuata tramite il metodo di *Folin-Ciocalteu*. Questo metodo si basa sull'utilizzo di un reattivo costituito principalmente da eteropolifosforato-molibdato, in grado di reagire in presenza di composti polifenolici e dare una colorazione blu. Si procede preparando, per ogni campione da analizzare, una soluzione madre di 0,25 mg/mL portando a volume con acqua deionizzata 25 mg di estratto in un matraccio da 100 mL; se la soluzione ottenuta non si presenta limpida ma con particelle di estratto in sospensione, la solubilizzazione è aiutata tramite un bagno ad ultrasuoni. Si passa quindi alla preparazione dei campioni analitici, partendo dalla soluzione madre e prelevandone aliquote diverse in modo da ottenere concentrazioni crescenti da 0 a 250  $\mu\text{L}$ , utili per ottenere una stima dell'accuratezza della misura: il primo campione viene utilizzato come bianco, mentre l'ultimo sarà quello utilizzato per il calcolo del TPC. Ogni campione deve avere volume finale pari a 250  $\mu\text{L}$ , mantenuto tramite l'aggiunta di DMSO (in rapporto 1:1 con  $\text{H}_2\text{O}$  deionizzata) come in Tabella 2.4. Ad ogni campione vengono aggiunti 4 mL di acqua deionizzata, 500  $\mu\text{L}$  di  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 10 % in peso, e 250  $\mu\text{L}$  di reattivo di *Folin-Ciocalteu* (in rapporto 1:1 con  $\text{H}_2\text{O}$  deionizzata).

Tabella 2.4: Campioni per analisi di *Folin-Ciocalteu*

	CAMPIONI						
	0	1	2	3	4	5	6
Sol.Madre ( $\mu\text{L}$ )	0	25	50	100	150	200	250
DMSO ( $\mu\text{L}$ )	250	225	200	150	100	50	0
H <sub>2</sub> O <sub>dist</sub> (mL)	4						
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ( $\mu\text{L}$ )	500						
Folin-Ciocalteu ( $\mu\text{L}$ )	250						

Le provette vengono agitate per favorire la miscelazione e poi vengono lasciate a reagire per 25 minuti. I composti fenolici reagiscono con il reagente di *Folin-Ciocalteu* facendo sì che i campioni si colorino dal verde al blu a seconda delle concentrazioni in essi contenute.

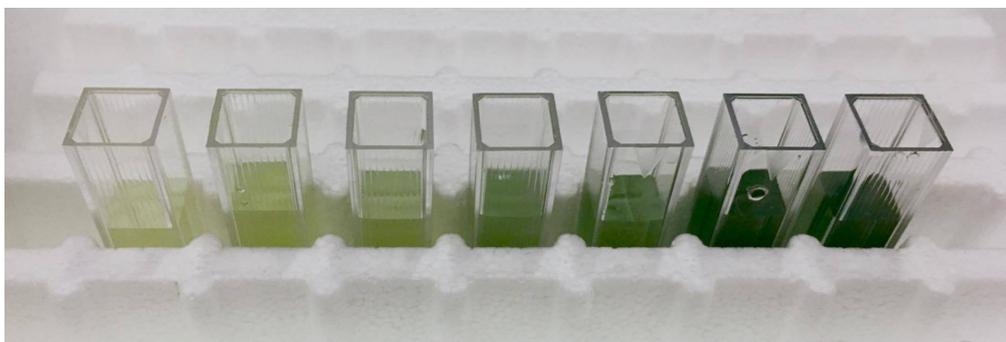


Figura 2.3: Campioni per analisi di *Folin-Ciocalteu*

Il contenuto di polifenoli viene determinato usando una quantificazione colorimetrica ad una lunghezza d'onda pari a 725 nm, tramite uno spettrofotometro UV-Vis (Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies). I risultati sono stati interpretati confrontando le assorbanze registrate con una retta di taratura precedentemente preparata, basata sulle assorbanze dell'acido gallico. Essa viene costruita secondo

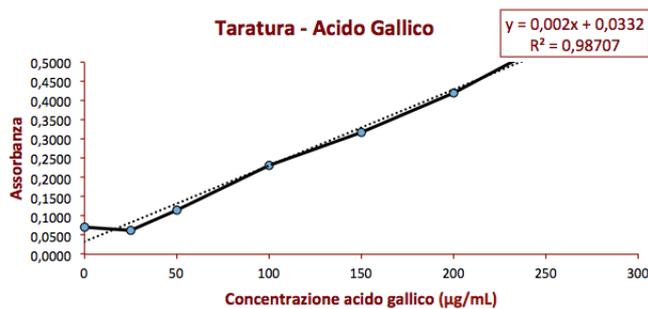


Figura 2.4: Retta di taratura per analisi di *Folin-Ciocalteu*

il metodo sopra descritto, utilizzando come soluzione madre una soluzione a titolo noto dello standard. I risultati vengono perciò espressi come equivalenti di acido gallico. La retta di taratura ottenuta è riportata in Figura 2.4.

Tutti i campioni della serie vengono analizzati e le assorbanze plottate in funzione della diluizione: in questo modo è possibile verificare, tramite una retta di regressione e il relativo  $R^2$ , la correttezza delle analisi eseguite. Si illustrano di seguito i calcoli necessari per ottenere il TPC finale:

- Si calcolano i  $\mu\text{g/mL}$  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 ( $250 \mu\text{g/mL}$ ).
- Per ottenere il quantitativo di estratto secco ottenibile dall'estrazione in analisi, si opera utilizzando il rapporto tra il volume di soluzione totale ottenuta e l'aliquota liofilizzata, come segue in 2.2:

$$Estratto_{\text{Secco}} = Secco_{\text{Liofilizzato}}(g) * \frac{mL_{\text{totali}}}{mL_{\text{Liofilizzati}}} \quad (2.2)$$

- Da cui si estrapolano i polifenoli totali nell'estratto:

$$Polifenoli_{\text{Tot}} = Estratto_{\text{Secco}} * \frac{GAE_{\text{Soluzione madre}}}{Concentrazione_{\text{Soluzione madre}}} \quad (2.3)$$

- Si trova quindi il TPC espresso come  $\text{mg}$  di acido gallico equivalenti su grammi di matrice estratta:

$$TPC(\text{mg/g}) = \frac{Polifenoli_{\text{Tot}}}{Matrice_{\text{Estratta}}(g)} \quad (2.4)$$

### 2.3.2 Fluidodinamica e Caratterizzazione della Cinetica Estrattiva: Il Modello di Peleg

La fluidodinamica delle estrazioni solido-liquido riconosce ai fenomeni di diffusione un ruolo di primaria importanza, regolati dalla legge di Fick (equazione 2.5).

$$J_{Az} = -D_A \frac{dC_A}{dz} \quad (2.5)$$

Risolvendo l'equazione differenziale si ottiene:

$$J_{Az} = \frac{D_A}{b} * (C_{A,s} - C_A(t)) * S \quad (2.6)$$

Nell'equazione 2.6  $b$  rappresenta lo spessore del film, mentre la  $S$  è la superficie di scambio. Il flusso viene definito in  $\text{kmol/m}^2\text{s}$ .

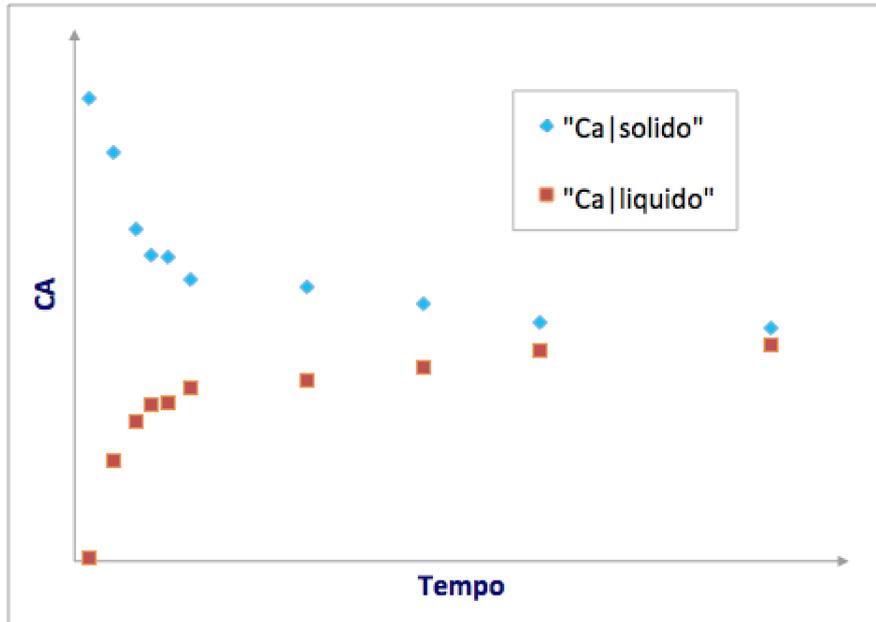


Figura 2.5: Equilibrio in sistema Batch

Le estrazioni portate avanti in laboratorio sono di tipo batch, vengono quindi ben descritte dalla legge di Fick, la quale definisce il flusso tramite il gradiente di concentrazione all'interfaccia, supponendo il raggiungimento dell'equilibrio fra la concentrazione nel solido e nel liquido, come visibile in figura 2.5.

Nello studio dei fenomeni di trasporto controllanti la fluidodinamica delle estrazioni, risulta di fondamentale importanza la determinazione del coefficiente di trasporto volumetrico  $k_L$ , il quale è in proporzionalità diretta nell'espressione del flusso. Suddetto coefficiente di scambio risulta essere proporzionale alla diffusività del componente che si trasferisce, ed inversamente proporzionale allo spessore  $b$ . Man mano che aumenta la turbolenza nel fluido, si osserva un incremento nel coefficiente di scambio di materia, unita ad un decremento dello spessore del film, rendendo più performante la diffusione del componente dalla fase solida alla fase liquida.

Si ricava quindi ora l'espressione per determinare il  $k_L a$  a partire dalla legge di Fick (2.5); le ipotesi effettuate sono:

- Volume costante;
- $C_A$ , in  $z=0$  è pari a  $C_{A_s}$ , ossia la concentrazione massima estraibile;
- $C_A$  in  $z=\delta$  è pari a  $C_A$ , ossia la concentrazione del componente d'interesse nel medium.

Essendo noto che il flusso è costante, la derivata prima si annulla:

$$J_{Az} = cost \quad (2.7)$$

$$\frac{dJ_{Az}}{dz} = 0 \quad (2.8)$$

Allora sostituendo la 2.5 nella 2.8 si ottiene:

$$-D_A \frac{d^2 C_A}{dz^2} = 0 \quad (2.9)$$

Si integra quindi una volta la 2.9:

$$-D_A \frac{dC_A}{dz} = C_1 \quad (2.10)$$

Si può notare che la 2.5 si presenta uguale alle 2.10, eguagliando le due equazioni si definisce  $C_1$  come:  $J_A = C_1$ . Tramite integrazione è possibile trovare il valore di  $C_1$ :

$$\int dC_A = \int_0^\delta -\frac{C_1}{D_A} dz \quad (2.11)$$

$$C_A = -\frac{C_1}{D_A} z + C_2 \quad (2.12)$$

Per trovare le due costanti  $C_1$  e  $C_2$  si sfruttano le condizioni al contorno definite all'inizio di questa trattazione. Sostituendo si ottengono due equazioni, le quali risolte danno il valore delle due costanti d'integrazione. Si trova dunque:

$$C_2 = C_{AS} \quad (2.13)$$

$$C_1 = \frac{D_A}{\delta} (C_{AS} - C_{A\delta}) \quad (2.14)$$

$$C_1 = k_L (C_{AS} - C_{A\delta}) \quad (2.15)$$

$$J_A = k_L (C_{AS} - C_{A\delta}) \quad (2.16)$$

Si definisce infine il flusso all'interfaccia come:  $J_{A, z=0} = k_L a (C_{AS} - C_{A\delta})$ , il quale si presenta uguale alla variazione nel tempo; si arriva quindi alla 2.17

$$J_{A, z=0} = k_L a (C_{AS} - C_{A\delta}) = \frac{dC_A}{dt} \quad (2.17)$$

e conseguentemente

$$k_L a (C_{AS} - C_A(t)) = \frac{dC_A}{dt} \quad (2.18)$$

$$k_L a dt = \frac{dC_A}{(C_{AS} - C_A(t))} \quad (2.19)$$

$$\int_0^t k_L a dt = \int_0^{C_A} \frac{1}{(C_{AS} - C_A(t))} dC_A \quad (2.20)$$

Integrando la 2.20 si ottiene:

$$k_L a t = -\ln\left(\frac{C_{AS} - C_A}{C_{AS}}\right) \quad (2.21)$$

Si ricava dunque  $k_L a$  tramite l'equazione 2.21, ottenendo:

$$k_L a = -\frac{\ln\left(\frac{C_{AS} - C_A}{C_{AS}}\right)}{t} \quad (2.22)$$

Affinchè il calcolo sia sensato occorre conoscere al tempo  $t$  (tempo ottimale di estrazione) il valore della concentrazione  $C_A$ , ed il valore di saturazione  $C_{A_S}$ . E' necessario che questi dati vengano acquisiti ad un tempo conveniente per un processo estrattivo industriale, ovvero ad un tempo in cui si ha sufficiente prodotto, ma anche sufficiente forza spingente a guidare l'estrazione. Graficamente (Conc. Estratto vs. tempo) questo punto viene individuato tramite il cosiddetto "punto di ginocchio" di un modello fisico che descriva in modo esaustivo il processo estrattivo in esame. A questo scopo, si è scelto di utilizzare il modello di Peleg per descrivere la cinetica di estrazione e, di conseguenza i valori utili di  $C_A$ .

Il modello di Peleg si presenta come un classico modello iperbolico per descrivere le curve di assorbimento dell'umidità, la formulazione originale determina l'andamento del contenuto di umidità nel tempo. Nel grafico 2.6 si può notare una rappresentazione di questo andamento, tenendo conto che:

- $M(t)$  rappresenta il quantitativo di umidità in funzione del tempo;
- $M_0$  è la quantità di acqua contenuta nella matrice al tempo  $t=0$ ;
- $k_1$  e  $k_2$  definiscono le costanti che descrivono il sistema fisico.

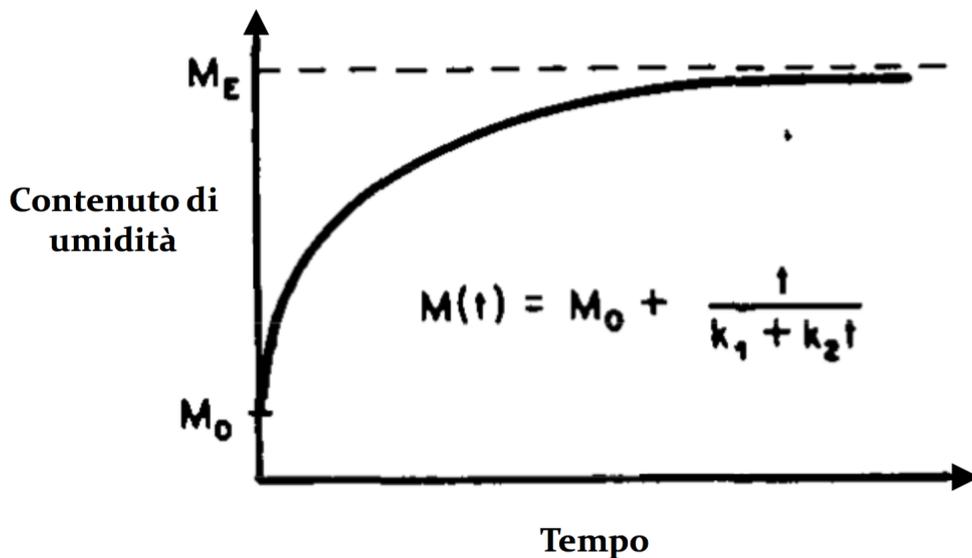


Figura 2.6: Curve di assorbimento, *immagine modificata da [35]*

L'andamento delle curve Resa vs Tempo ottenute dalle estrazioni si presentano simili alle suddette curve di assorbimento, permettendo l'utilizzo di questo modello matematico per la determinazione dei parametri cinetici di estrazione. Si linearizza quindi il modello adattandolo al caso in esame, sostituendo all'umidità la resa dell'estratto considerato, ottenendo un'equazione del tipo 2.23 nella quale  $k_1$  rappresenta l'intercetta della retta con l'asse delle ordinate, mentre  $k_2$  ne è il coefficiente angolare. Una volta ottenuto il modello linearizzato si può procedere alla costruzione

della curva teorica.

$$c(t) = c_0 + \frac{t}{K_1 + K_2 * t} \quad (2.23)$$

Si definiscono ora i parametri:

- $c(t)$ : concentrazione di polifenoli al tempo  $t$  ( $\text{mg}_{\text{GAE}}/\text{g}_{\text{db}}$  matrice estratta);
- $t$ : tempo di estrazione (min);
- $k_1$ : Costante di velocità di Peleg ( $\text{min g}_{\text{db}}/\text{mg}_{\text{GAE}}$ ) "*Initial extraction rate*";
- $k_2$ : Costante di capacità di Peleg ( $\text{g}_{\text{db}}/\text{mg}_{\text{GAE}}$ ) "*Capacity constant*".

La costante  $k_1$  è correlata alla velocità iniziale di estrazione tramite l'equazione 2.24, la quale restituisce i  $\text{mg}_{\text{GAE}}/(\text{g}_{\text{db}}*\text{min})$ .

$$B_0 = \frac{1}{k_1} \quad (2.24)$$

$$B_0(t) = \frac{1}{k_1(t)} \quad (2.25)$$

$B_0$ , ossia la "*Rate constant*", è un parametro che può essere valutato a tempi diversi ( $B(t)$ ) in modo tale da descrivere l'efficienza dell'estrazione in ogni istante del processo. Tramite l'equazione 2.26 si riesce a legare la costante  $k_2$  alla massima resa d'estrazione, ossia alla concentrazione d'equilibrio al quale tende la curva per  $t$  che tende ad infinito.

$$c_\infty = c_{\text{eq}} = Y_S = \frac{1}{k_2} \quad (2.26)$$

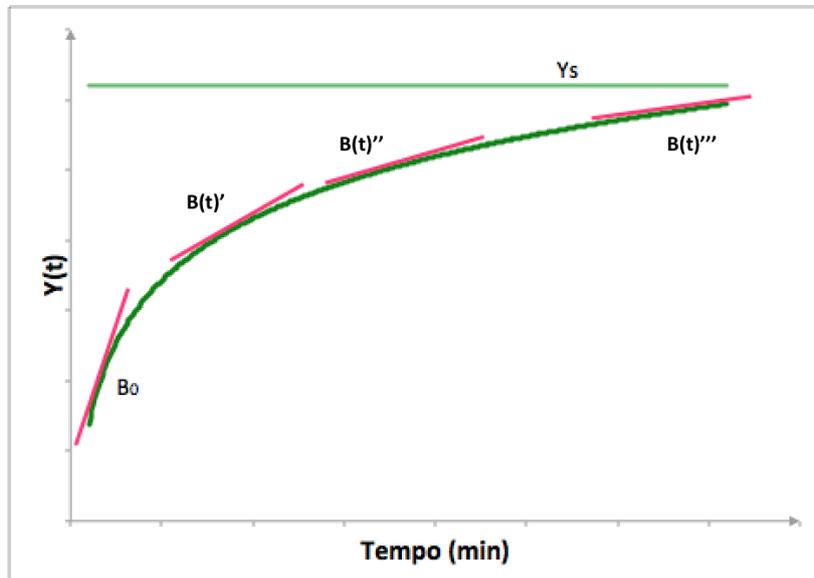


Figura 2.7: Cinetica di Estrazione Solido-Liquido

Considerando che la  $c_{\text{eq}}$  non varia se non varia la dimensione delle particelle, tramite questo studio si può determinare l'efficienza dei diversi tipi di estrazione

tramite i parametri di Peleg. L'andamento della resa, ottenuta grazie alla linearizzazione in funzione del tempo, è visibile in Figura 2.7, nella quale sono evidenziati i parametri  $B_0$ , pendenza della curva, e  $Y_S$ .

Ovviamente  $B_0$  varia con l'andamento della curva, portando ad una relazione del tipo:  $B_0 > B(t) > B(t) > B(t)$ . Ciò suggerisce che il vantaggio risieda nella scelta di operare sul ginocchio della curva piuttosto che sull'asintoto, nonostante la resa sia maggiore, poiché diminuisce la forza spingente.

Sulle prove eseguite con i parametri ottimizzati, si è scelto di effettuare una determinazione quali-quantitativa dei composti organici contenuti negli estratti.

## 2.4 Caratterizzazione Qualitativa

### 2.4.1 LC/Massa

Sulle prove eseguite con i parametri ottimizzati, si è scelto di effettuare una determinazione quali-quantitativa dei composti organici contenuti negli estratti.

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 ionizzazione è stata condotta sia in modalità positiva che in negativa (*mass detector* con  $\Delta=100-600$ ). La colonna utilizzata è del tipo *Sinergy 4 $\mu$ m 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).

Sono stati utilizzati due diversi metodi a gradiente per l'analisi degli acidi fenolici e delle catechine. Entrambi prevedono un volume di iniezione di 20  $\mu$ L e con un flusso di 1 mL/min. Di seguito le Tabelle 2.5 e 2.6 riportano i gradienti di ciascun metodo, mentre in Tabella 2.7 si rappresentano i parametri operativi dell'apparecchiatura.

Acidi fenolici		
Tempo min	%(A)	%B
0	100	0
6.50	100	0
30.0	50	50
36.0	0	100
42.0	0	100

Tabella 2.5: Metodo: Acidi Fenolici

Catechine		
Tempo min	%(A)	%B
0	92	8
3.0	92	8
21.0	50	50
33.0	0	100
45	0	100

Tabella 2.6: Metodo: Catechine

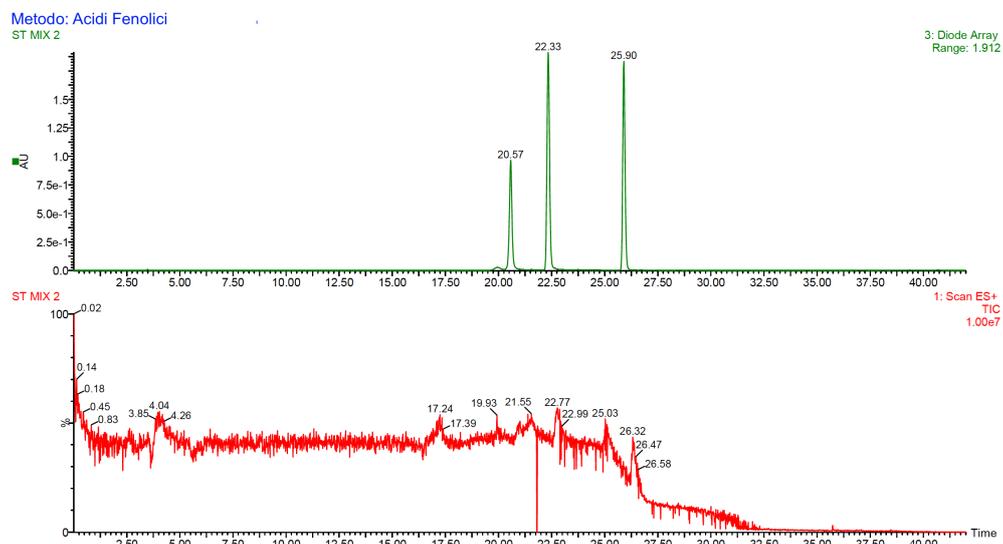
Inizialmente sono stati analizzati dei campioni contenenti una miscela di sostanze standard, visibili nelle tabelle: 2.8, 2.9, 2.10, 2.11, 2.12, 2.4.1 dove sono riportati: i tracciati cromatografici, i tempi di ritenzione ( $R_t$ ) al detector UV e alla MS e il peso molecolare  $[M+1]$  dei composti in esame. Laddove sono presenti due tempi di ritenzione ci si riferisce ai due picchi che identificano lo standard.

Tabella 2.7: Analisi Qualitativa LC-MS/MS

Parametro	Valore	Unità di Misura
Tensione capillare	2,5	kV
Tensione del cono	24	V
Tensione dell'estrattore	3	V
Tensione lenti RF	0,5	V
Flusso di gas a cono	35	L/h
Flusso di gas di desolvatazione	250	L/h
Temperatura della sorgente	110	°C
Temperatura di Desolvatazione	220	° C
Gas di Desolvatazione: Azoto		
Modalità di ionizzazione: ESI(+)		

# ST mix 2

## Metodo: Acidi Fenolici

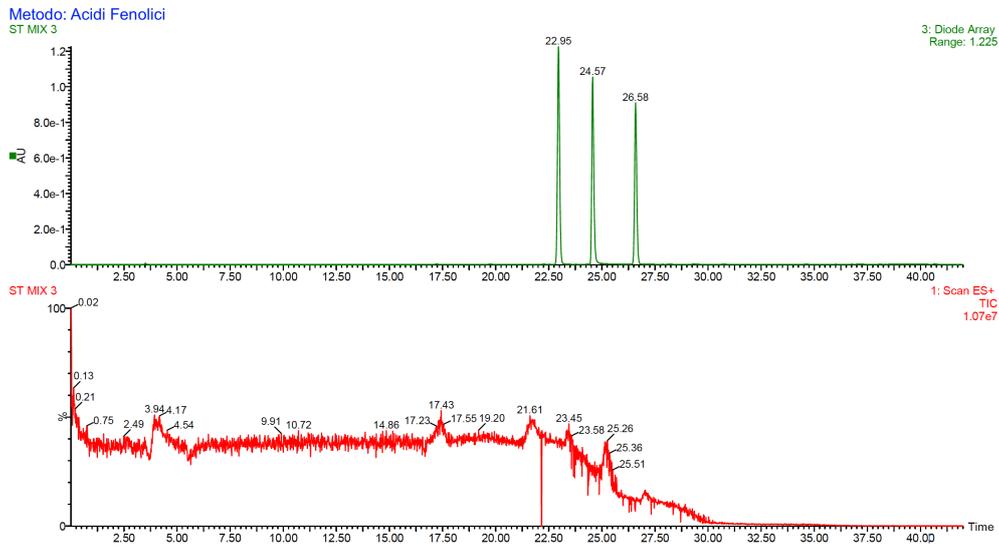


Composto	R <sub>t</sub> UV [min]	R <sub>t</sub> Massa [min]	[M-H] <sup>+</sup> [uma]	Cromatogramma
Acido Clorogenico	20,57	20,97	355	
Acido Caffeico	22,33	22,75	181	
Acido Ferulico	25,90	26,43	195	

Tabella 2.8: LC/Massa, ST mix 2

# ST mix 3

## Metodo: Acidi Fenolici



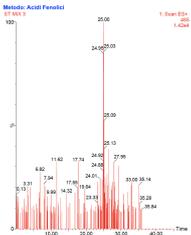
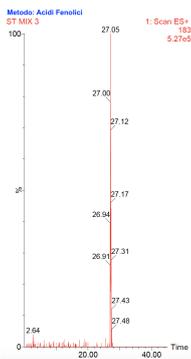
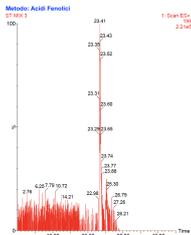
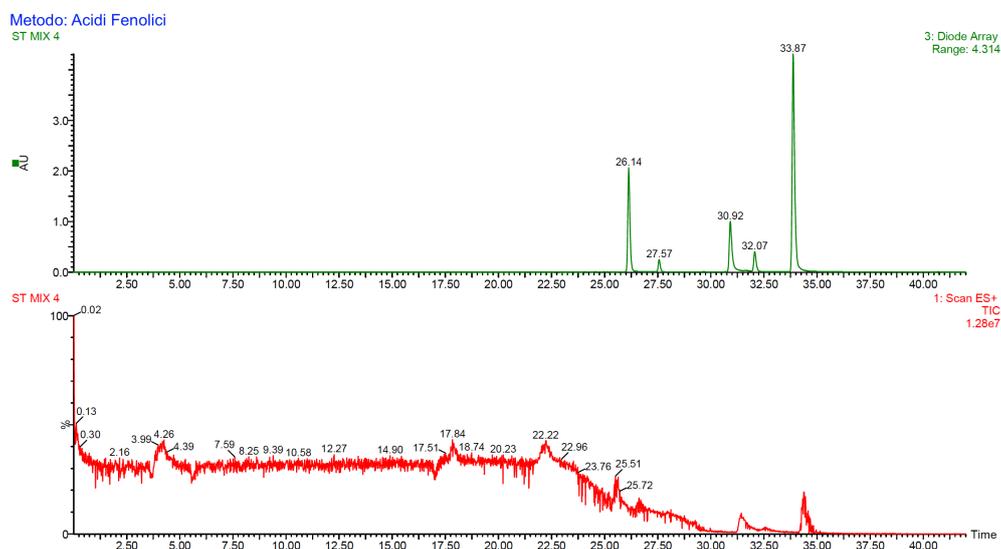
Composto	R <sub>t</sub> UV [min]	R <sub>t</sub> Massa [min]	[M-H] <sup>+</sup> [uma]	Cromatogramma
Quercetina-3-Glc	24,59	25,03	465	
Acido Veratrico	26,58	27,05	183	
Acido Siringico	22,95	23,41	199	

Tabella 2.9: LC/Massa, ST mix 3

# ST mix 4

Metodo: Acidi Fenolici

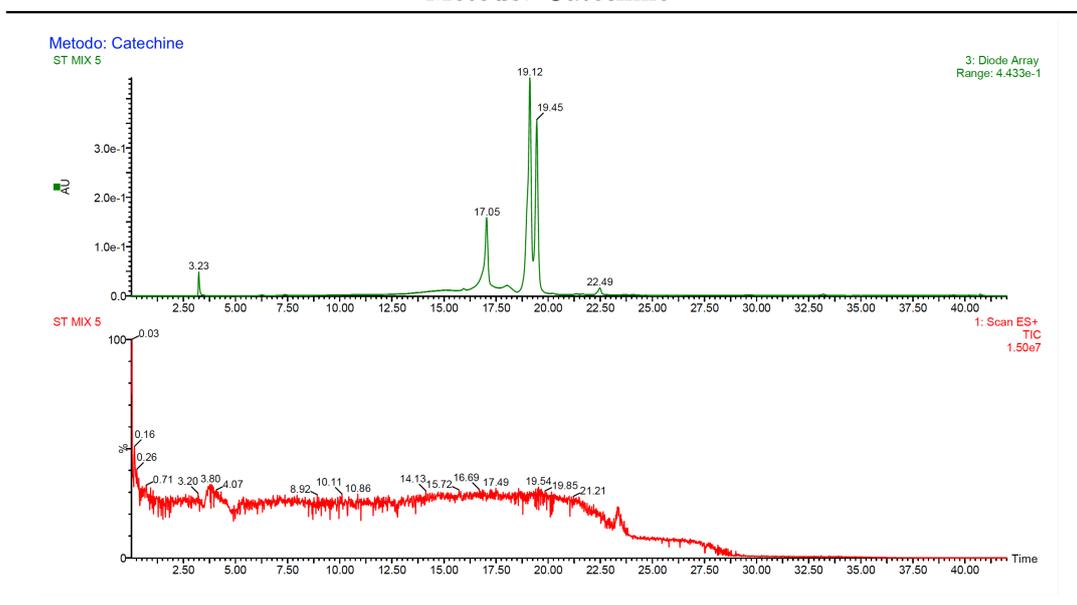


Composto	R <sub>t</sub> UV [min]	R <sub>t</sub> Massa [min]	[M-H] <sup>+</sup> [uma]	Cromatogramma
Quercetina	26,14/30,92	26,62/31,43	303	
Viniferina	32,07	32,54	455	
Canferolo	27,57/33,87	28,10/34,39	199	

Tabella 2.10: LC/Massa, ST mix 4

# ST mix 5

Metodo: Catechine

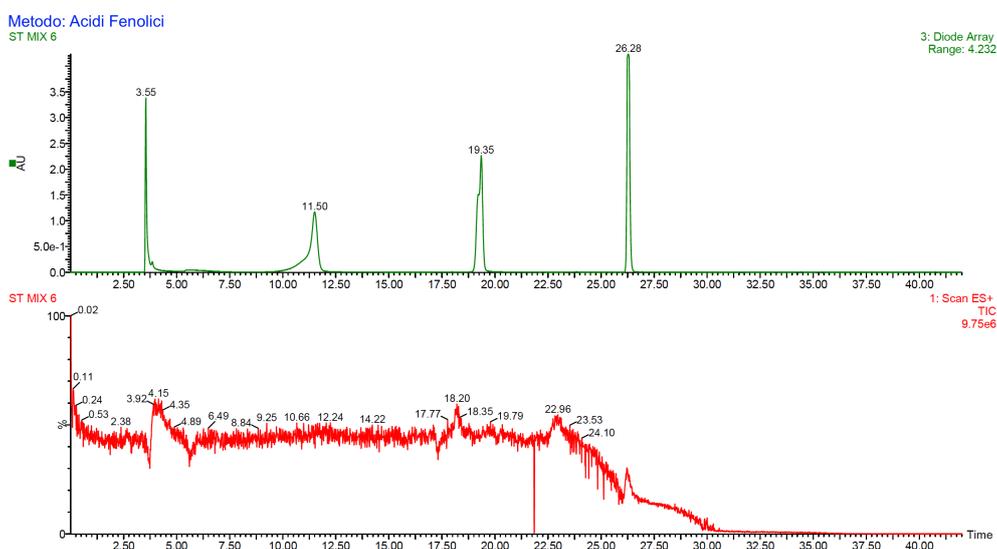


Composto	R <sub>t</sub> UV [min]	R <sub>t</sub> Massa [min]	[M-H] <sup>+</sup> [uma]	Cromatogramma
Epicatechina	19,12	19,58	291	
Catechina	17,05	17,45	291	
Epigallocatechina Gallata	19,45	19,89	457	

Tabella 2.11: LC/Massa, ST mix 5

# ST mix 6

## Metodo: Acidi Fenolici

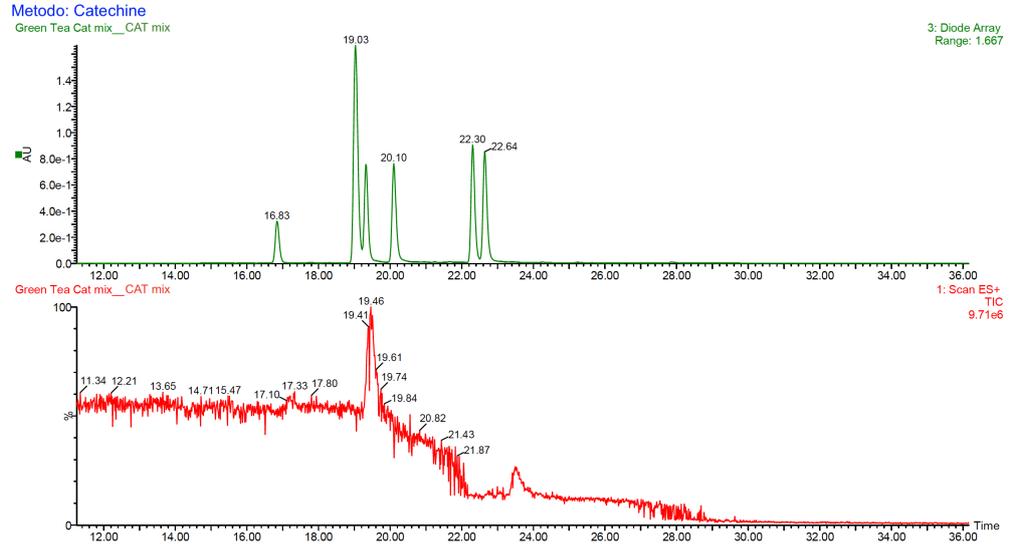


Composto	R <sub>t</sub> UV [min]	R <sub>t</sub> Massa [min]	[M-H] <sup>+</sup> [uma]	Cromatogramma
Acido Gallico	11,50	11,88	171	
Acido Protocatecuico	19,35	19,71	155	
Acido Para-Cumarico	26,28	26,69	165	

Tabella 2.12: LC/Massa, ST mix 6

# GTC Green Tea Cat mix

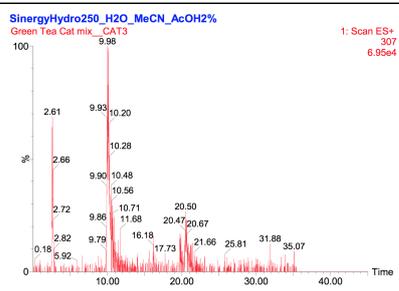
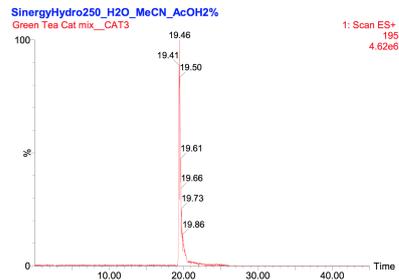
Metodo: Catechine



Composto	R <sub>t</sub> UV [min]	R <sub>t</sub> Massa [min]	[M-H] <sup>+</sup> [uma]	Cromatogramma
(Epi)Catechina	16,83/19,03	17,2/19,46	291	<p>SinergyHydro250_H2O_MeCN_AcOH Green Tea Cat mix_CAT3 1: Scan ES+ 291 1.85e5</p>
Epigallocatechina gallata	20,10	20,54	459	<p>SinergyHydro250_H2O_MeCN_AcOH2% Green Tea Cat mix_CAT3 1: Scan ES+ 459 1.45e5</p>
(Epi)Catechina-3-gallata	22,3	22,74	443	<p>SinergyHydro250_H2O_MeCN_AcOH2% Green Tea Cat mix_CAT3 1: Scan ES+ 443 1.89e5</p>

Continua nella prossima pagina

## GTC *Green Tea Cat* mix

Composto	R <sub>t</sub> UV [min]	R <sub>t</sub> Massa [min]	[M-H] <sup>+</sup> [uma]	Cromatogramma
Galocatechina	20,1	20,5	307	 <p style="font-size: small; margin-top: 5px;">SinergyHydro250_H2O_MeCN_AcOH2% Green Tea Cat mix_CAT3 1: Scan ES+ 307 6.95e4</p>
Caffeina	19,03	19,46	195	 <p style="font-size: small; margin-top: 5px;">SinergyHydro250_H2O_MeCN_AcOH2% Green Tea Cat mix_CAT3 1: Scan ES+ 195 4.62e6</p>

*Si conclude dalla pagina precedente*

## 2.5 Caratterizzazione Quantitativa

### 2.5.1 HPLC

Una procedura analoga a quella per l'analisi qualitativa di LC-MS è stata seguita anche per le analisi quantitative di HPLC-DAD. È stata impiegata un '*Waters binary pump 1525*' abbinato ad un '*2998 photodiode array (PDA) detector*'. La colonna utilizzata è del tipo *Sinergy 4 $\mu$ 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.2.4.1) e si ricordano le Tabelle 2.5 e 2.6 che riportano le percentuali dei gradienti di ciascun metodo. Anche in questo caso, volume di iniezione di 20  $\mu$ L con un flusso di 1 mL/min.

Prima dei campioni, sono stati analizzati i diversi standard per poter ottenere tutte le informazioni necessarie al riconoscimento del singolo componente nei campioni di interesse. Le seguenti illustrazioni riportano i parametri necessari alla caratterizzazione, inclusi quelli della regressione lineare utili poi all'analisi quantitativa.

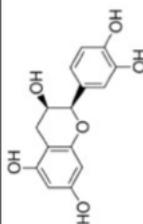
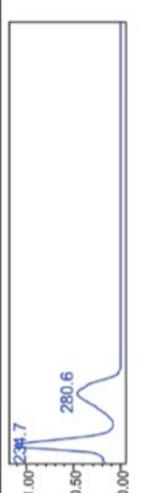
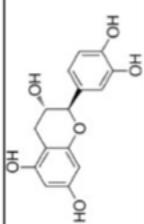
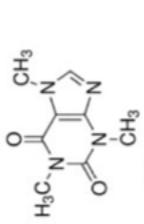
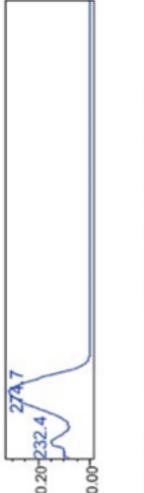
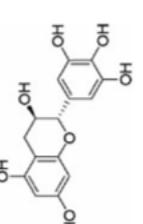
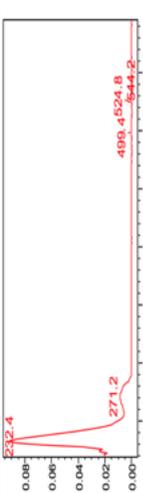
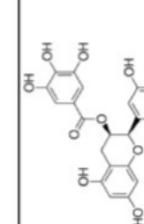
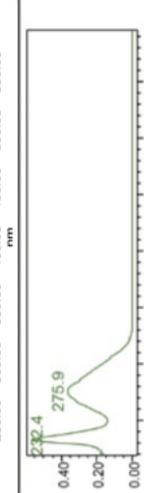
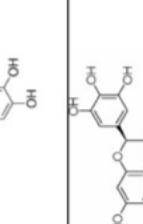
Composto	Formula	MW	UV spectrum	Metodo HPLC	λ (nm) area HPLC	R <sub>t</sub> [min]	Regressione lineare		
							a	b	R2
(-)-Epicatechin >=90%		290.27		Acidi Fenolici Catechine	280	26,28 20,99	19.246.401,9 18.168.594,3*	197.966,6 -18.248,6*	0,996 1,000
(-)-Epicatechin (from Green Tea Cat mix Cerilliant 0.1001 mg/ml)				Catechine		21,10	15.822.086,1*	3.730,1*	1,000
(+)-Catechin >=99%		290.27		Catechine	280	16,4			
(+)-Catechin (from Green Tea Cat mix Cerilliant 0.1000 mg/ml)				Catechine		16,56	16.097.740,8	566,7	0,999
Caffeine (from Green Tea Cat mix Cerilliant 0.1000 mg/ml)		194.19		Catechine	280	20,4	57.002.093,9	55.390,3	0,999
(-)-Galocatechin (from Green Tea Cat mix Cerilliant 0.1000 mg/ml)		306.27		Catechine	280	7,65	4.693,475,5	- 3.263,9	0,999
(-)-Epigallocatechin 3- gallate >=80%		458.37		Catechine	280	21,6	33.967.761,0	-78.132,4	0,998
(-)-Epigallocatechin 3- gallate (from Green Tea Cat mix Cerilliant 0.1000 mg/ml)				Catechine		280	27.969.516,3	- 81.311,7	1,000
(-)-Galocatechin 3-gallate (from Green Tea Cat mix Cerilliant 0.1001 mg/ml)		458.37		Catechine	280	23,4	30.435.268,8	- 92.381,2	1,000

Figura 2.8: Standard HPLC

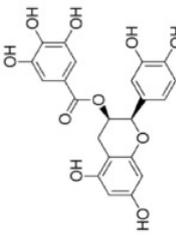
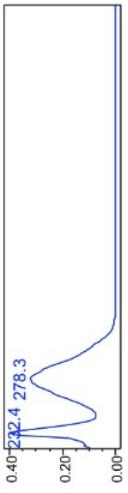
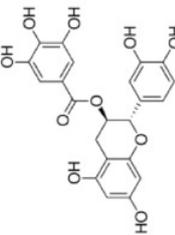
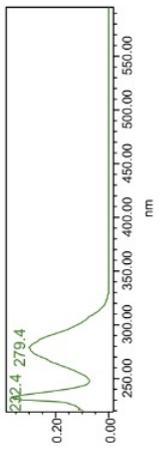
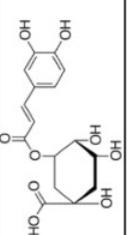
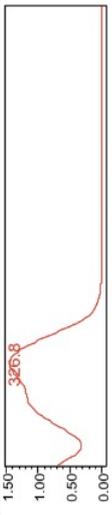
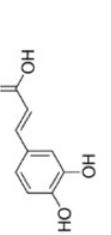
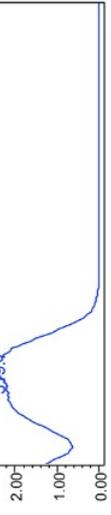
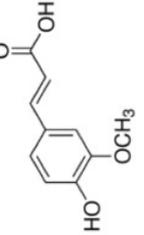
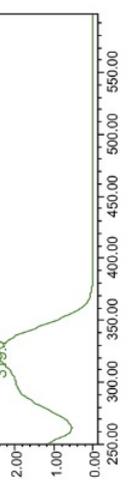
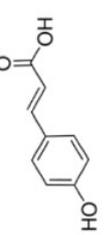
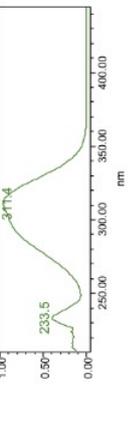
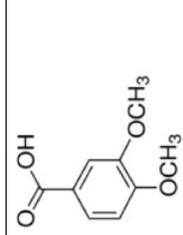
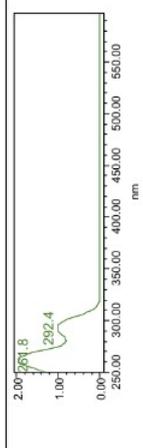
(-)-Epicatechin 3-gallate (from Green Tea Cat mix Cerilliant 0.1000 mg/ml)		442.37		Catechine	280	27.4	37.738.725,5	1.550,1	1,000
(-)-Catechin 3-gallate (from Green Tea Cat mix Cerilliant 0.09998 mg/ml)		442.37		Catechine	280	28.16	38.103.747,3	- 103.741,7	1,000
Chlorogenic acid		354,31		Acidi Fenolici	340	24.8	54.804.533,4	- 2.738,6	0,999
Caffeic acid		180.16		Acidi Fenolici	340	26.5	90.220.998,2	114.048,4	0,999
Ferulic acid		194.18		Acidi Fenolici	340	30.02	91.718.218,1	61.329,6	1,000
<i>p</i> -Cumaric acid		164.16		Acidi Fenolici	340	29.5	36.055.298,9	159.980,5	0,998
Veratric acid		182.17		Acidi Fenolici	280	30.7	35.018.911,0	42.935,9	1,000

Figura 2.9: Standard HPLC

Gallic acid		170.12		Acidi Fenolici	280	10.7	57.392.414,2	80.505,2	1,000
Siringic acid		198.17		Acidi Fenolici	280	27.1	70.765.832,6	116.551,4	1,000
Protocatechuic acid		154.12		Acidi Fenolici	280	21.4	30.605.510,8	94.935,4	0,999
Epsilon-viniferin >=95%		454.47		Acidi Fenolici	340	35.54	78.147.121,4	- 31.237,5	1,000
Apigenin-7-glucoside >=97%		432.38		Acidi Fenolici	340	30.01	62.637.283,9	235.107,5	0,993
Quercetin-3-glucoside >=98%		464,38		Acidi Fenolici	340	28.7	40.890.369,5	- 14.146,1	1,000
Quercetin (to be repeated)		302.23		Acidi Fenolici	340	??	??	??	??
Kaemferol (to be repeated)		286,23		Acidi Fenolici	340	??	??	??	??

Figura 2.10: Standard HPLC

### 2.5.2 Determinazione del contenuto di Flavonoidi - Institute of Wood Chemistry (IWC, Lettonia), Prof. Telysheva, G.

Per quanto concerne il contenuto totale di flavonoidi è stata seguita la procedura di Zhou *et al.* **2011** [36] a base di ossicloruro di zirconio. È stata prelevata un'aliquota pari ad 1 ml per ogni campione allo 0,01% in metanolo, e collocata in due provette. Nelle provette sono stati rispettivamente aggiunti 7ml di metanolo e 1 ml di 2% ZrOCl<sub>2</sub>-8-H<sub>2</sub>O più 6 ml di metanolo. Le soluzioni sono state miscelate e dopo 1 h se n'è misurata l'assorbanza a 436 nm, tramite spettrofotometro UV-VIS (Perkin Elmer Lambda 650). La quantità totale di flavonoidi è stata quindi stimata in termini di equivalenti di Rutina (attraverso la simulazione di una retta di taratura) ed espressa come mg<sub>rutina</sub>/g<sub>estratto</sub>.

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

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 stata del tipo U-HPLC (2.1mm x 50mm i.d., 1.7 μm, BEHC18) (Waters Acquity) con una portata di 0.35 mL\*min<sup>-1</sup>. Come eluente è stato impiegato acido formico allo 0,1%, acqua (A) e acetonitrile (B).

Il gradiente di eluizione è riportato in Tabella 2.13.

Tabella 2.13: Determinazione Qualitativa LC-MS/MS

Tempo (min)	%(A)
0-1	95-80 %
1-5	80-75 %
5-6	75-25 %
6-7	25-20 %

Volume Iniezione: 1 μL

I principali parametri operativi per la Q-TOF MS sono stati impostati come segue in Tabella 2.14.

### 2.5.4 Caratterizzazione delle proprietà antiossidanti

Per valutare l'attività antiossidante degli estratti ottenuti sono stati utilizzati due diversi metodi: **DPPH •** e **ORAC**. Il primo test prevede la misurazione della capacità riducente delle molecole nei confronti del radicale libero DPPH • (2,2-difenil-1-picrilidrazile). I risultati vengono espressi in termini di IC<sub>50</sub>, ossia in base alla concentrazione richiesta per ottenere il 50% di inibizione del radicale libero. Più basso è il valore IC<sub>50</sub>, maggiore è l'attività antiossidante.

Tabella 2.14: Analisi Qualitativa LC-MS/MS

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	°C
Temperatura di Desolvatazione	400	°C
Portata	600(-); 750 (+)	L/h
Gas di Collisione: Argon		
Gas di Desolvatazione: Azoto		
Modalità di ionizzazione: Positiva e Negativa		

Il test cinetico **ORAC** (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) consente di caratterizzare la capacità inibente dell'antiossidante durante l'ossidazione della fluoresceina, ossia dei radicali perossilici ROO•. Per effettuare questo tipo di misurazione, non si ha bisogno di particolari condizioni fisiche o di impiegare sostanze pericolose, per questo risulta perfettamente compatibile con matrici di tipo vegetale [37]. I valori ORAC sono stati infine calcolati tramite un'equazione di regressione basata sul Trolox (50 - 100  $\mu$ M in PBS), la quale correla la concentrazione di Trolox con l'area netta al di sotto della curva di decadimento della fluoresceina. Il potere antiossidante, espresso tramite la capacità di assorbimento del radicale, viene espresso come equivalente a Trolox (TE), mmol per grammo di campione. Maggiore si presenta il valore di TE, più elevata sarà l'attività antiossidante corrispondente.

## Capitolo 3

# Risultati

### 3.1 Blend Screening

L'attività di laboratorio ha avuto inizio con le prove effettuate sul tè nero taglio tisana, ossia sotto forma di prodotto volto alla vendita. I test sono stati effettuati su 6 tipologie comunemente diffuse (riportate in Tabella2.1), al fine di individuare la più ricca in polifenoli. Il rapporto matrice/solvente scelto è un valore medio comunemente utilizzato nelle estrazioni assistite da US; in questo modo si conserva sufficiente fluidità nel sistema per garantire sonicazione e scambio termico efficienti, senza volumi eccessivi di solvente. Tenendo contemporaneamente conto della termolabilità dei composti fenolici d'interesse, della sostenibilità di processo e dei limiti imposti dalla tecnica degli US, sono stati scelti i parametri indicati in Tabella3.1:

Tabella 3.1: Parametri di processo

Parametro	Valore	Unità di Misura
L/S	15	
Matrice	10	g
Solvente	150	mL
Tempo	15	min
Temperatura massima	50	°C

Un tempo di 15 minuti ha consentito di snellire lo studio preliminare, senza rischiare di incorrere in fenomeni degradativi o di raggiungimento di equilibrio nel caso di matrici particolarmente povere di polifenoli. Per il medesimo motivo è stato utilizzato un reattore a cavitazione di dimensioni ridotte (R.E.U.S.S.1) rispetto a quello impiegato per tutte le prove successive. I risultati sono visibili in Tabella3.2.

Al fine di verificare l'attendibilità dei risultati, è stata effettuata su due dei tè a minor contenuto di polifenoli (*Bamadur* e *Nilgiri*), un'estrazione della durata di 30 minuti, la quale è stata poi confrontata con l'estrazione in 30 minuti di uno dei due *blend* ad elevato TPC (*Madhujing*). Il fine è stato quello di assicurare il prosieguo del lavoro sul giusto *blend*, escludendo l'influenza del tempo di estrazione sui risultati ottenuti. Si accetta quindi il metodo scelto come rappresentativo della

Tabella 3.2: Blend Screening

Tech: R.E.U.S.S 1				
Estrazione	Matrice	t (min)	Estratto secco (mg/g)	TPC (mg/g)
BTE01-TA-001	MADHUJING	15	227,21	41,65
BTE01-TA-002	BAMADUR	15	187,75	15,63
BTE01-TA-003	SOUTH INDIAN	15	223,01	42,71
BTE01-TA-004	KAVUZI	15	237,60	28,71
BTE01-TA-005	NILGIRI	15	273,8	34,61
BTE01-TA-006	CHISUNGA	15	151,04	12,52

relativa ricchezza in specie fenoliche. Come visibile in tabella 3.3 questi due blend continuano a presentare un valore di TPC inferiore rispetto al *Madhujing*.

Tabella 3.3: Time Screening

Tech: R.E.U.S.S. 2				
Estrazione	Matrice	t (min)	Estratto secco (mg/g)	TPC (mg/g)
BTE01-TA-0012	MADHUJING	30	233,4	59,33
BTE01-TA-013	BAMADUR	30	260,6	47,69
BTE01-TA-005	NILGIRI	30	213,41	30,78

Si è identificato quindi nelle tipologie *Madhujing* e *South Indian* le due matrici d'interesse, che sono quindi state sottoposte ad ulteriori prove volte alla comprensione del comportamento della matrice al variare dei parametri di processo. Innanzitutto è stato investigato il passaggio ad un'apparecchiatura estrattiva ad ultrasuoni (R.E.U.S.S.) di dimensioni maggiori che, mantenendo invariati i 15 minuti di estrazione, è risultata essere maggiormente performante come mostrato in tabella Tabella3.4. Viene ipotizzata una miglior miscelazione della soluzione da parte degli US in funzione della geometria della camera di cavitazione; l'apparecchiatura risulta offrire una superficie maggiore di trasduzione rispetto alla colonna di liquido.

Sul primo blend di tè scelto, il *Madhujing*, si sono attuate ulteriori prove (Tabella3.5) prendendo in considerazione il variare della granulometria, il rapporto liquido/solido e l'influenza della temperatura. Si può notare come una granulometria inferiore sembri non portare benefici alla resa finale, riducendo l'efficienza dell'estrazione. Verosimilmente questo dato, in contrasto con i principi dell'estrazione (minor granulometria coincide con maggior superficie d'interfaccia con il solvente), è dovuto ad un *work-up* difficoltoso dovuto alla comminazione della matrice. Considerato lo scopo di mettere a punto un processo il più sostenibile possibile, si è scelto di non proseguire nella definizione di un protocollo di recupero più efficiente ma sicuramente più dispendioso in termini di tempi e tecnologie. Ci si riserva comunque in futuro di approfondire questo aspetto, dirimendone l'applicabilità. L'aumento del rappor-

Tabella 3.4: Differenze tra R.E.U.S.S.

Time: 15 min					
Estrazione	Matrice	Tech	Estratto secco (mg/g)	TPC (mg/g)	
BTE01-TA-001	MADHUJING	R.E.U.S.S 1	227,21	41.65	
BTE01-TA-009	MADHUJING	R.E.U.S.S 2	167,5	54.37	
BTE01-TA-003	SOUTH INDIAN	R.E.U.S.S 1	223,01	42.71	
BTE01-TA-0015	SOUTH INDIAN	R.E.U.S.S 2	197,66	47.95	

to L/S invece, risulta ininfluyente. Per quanto concerne l'effetto della temperatura, si può notare come l'estrazione convenzionale in acqua a 100°C porti dei benefici limitati al TPC, probabilmente la cinetica estrattiva in convenzionale favorisce solo leggermente l'estrazione, portando ad un aumento di circa il 13%.

Tabella 3.5: Madhujing

MADHUJING						
Estrazione	t (min)	Note	Tech	Estratto secco (mg/g)	TPC (mg/g)	
BTE01-TA-001	15	-	R.E.U.S.S. 1	227,21	41.65	
BTE01-TA-002	15	Milling	R.E.U.S.S. 1	107,89	22,59	
BTE01-TA-009	15	L/S 15	R.E.U.S.S. 2	167,5	54.37	
BTE01-TA-004	15	L/S 20	R.E.U.S.S. 2	239,8	53,67	
BTE01-TA-003	15	Convenzionale	Acqua a ricadere	153,34	61,53	

## 3.2 South Indian

Si è scelto di procedere con il *blend South Indian* visto il tenore totale polifenolico più elevato rispetto al *Madhujing* emerso dal confronto fra le estrazioni convenzionali. Inoltre tale *blend South Indian* risulta essere un tipo di tè commercialmente più diffuso vista la sua lavorazione industriale, mentre il *Madhujing*, appartenendo alla categoria Orthodox, è una tipologia più dispendiosa e meno comune poiché coltivata e raccolta manualmente.

### 3.2.1 Estrazioni in Convenzionale

Per l'impostazione di questo lavoro e per la validazione dell'efficacia estrattiva degli US su questa matrice, è stato svolto uno studio comparativo con metodi convenzionali, utilizzando come in precedenza la determinazione del TPC come parametro chiave.

Tabella 3.6: Confronto Convenzionali

<i>Blend</i>	t (min)	Note	Estratto secco (mg/g)	TPC (mg/g)
Madhujing	180	Convenzionale	153,34	61,53
South Indian	180	Convenzionale 2 step	176,5	119,74

Tabella 3.7: Convenzionale 2 step

SOUTH INDIAN						
Estrazione	Solvente	t (min)	T (°C)	Estratto secco (mg/g)	TPC (mg/g)	
BTE01-TA-057	Acqua	180	100	176,5	119,74	
BTE01-TA-027	EtOH	180	80	221,22	61,4	

Come si può notare, l'esaurimento della matrice estratta con acqua a ricadere porta al maggior contenuto in polifenoli totali. Questo dato è utile per una quantificazione totale e come parametro di confronto, trattandosi del medesimo solvente selezionato per le estrazioni assistite dalla cavitazione. Il valore totale preso come riferimento è  $119,74$  (mg/g).

### 3.2.2 Time Screening

Una volta individuati tutti i parametri di granulometria, rapporto liquido/solido e temperatura ottimali, si è valutato il tempo di estrazione tramite diverse prove a tempi crescenti, i cui risultati sono riportati nella Tabella 3.8. Sono state inoltre selezionate delle prove puntuali a tempi minori di 15 minuti, inefficienti per le rese estrattive, ma indispensabili per infittire la curva di estrazione in prossimità dell'origine, in modo tale che l'extrapolazione della cinetica estrattiva di Peleg fosse più accurata possibile.

Le estrazioni sono effettuate con cup-horn di tipo R.E.U.S.S. 2.

L'andamento della resa in TPC rispetto al tempo è riportato in Figura 3.1.

Nel medesimo grafico (asintoti, quantità massima estratta) vengono poste a confronto le due quantificazioni effettuate in convenzionale: la retta inferiore appartiene all'etanolo, quella superiore all'acqua. La distribuzione dei punti sperimentali suggerisce un andamento logaritmico, indice del raggiungimento di uno stato d'equilibrio nell'estrazione. Questi dati sono stati la base della costruzione di un modello fisico che descrivesse la cinetica a cui il sistema è sottoposto.

Tabella 3.8: *Time Screening*

SOUTH INDIAN			
Estrazione	t (min)	Estratto secco (mg/g)	TPC (mg/g)
BTE01-TA-028	5	150,43	35,64
BTE01-TA-029	8	163,98	37,37
BTE01-TA-030	10	197,28	37,92
BTE01-TA-031	12	167,06	39,21
BTE01-TA-015	15	197,66	47,97
BTE01-TA-020	30	213,41	53,17
BTE01-TA-016	45	243,21	66,26
BTE01-TA-017	60	308,51	75,26
BTE01-TA-018	90	452,78	87,7

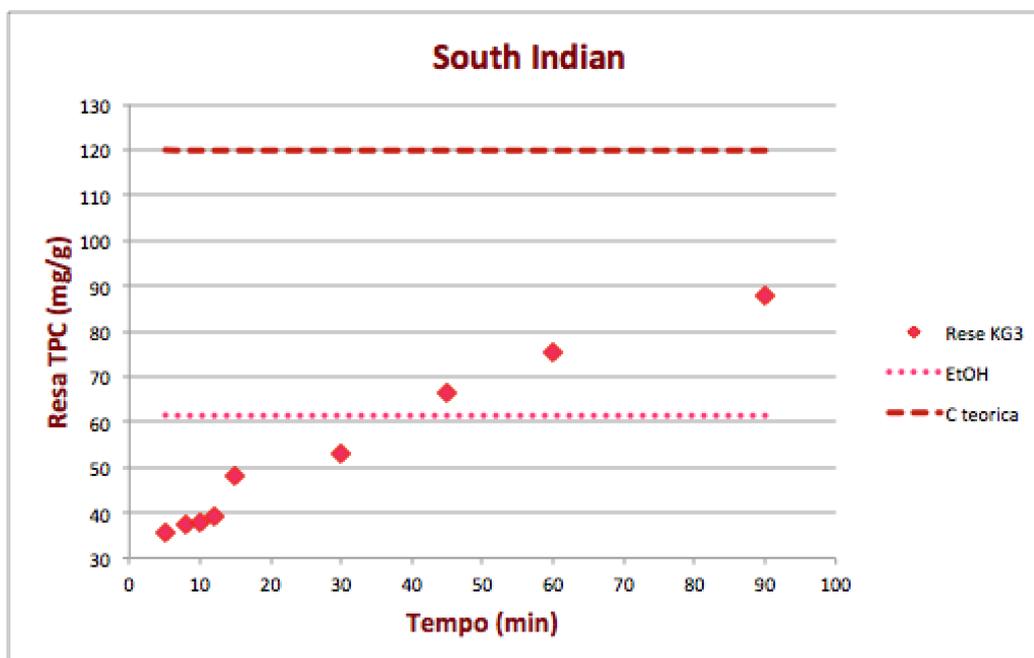


Figura 3.1: Resa vs Tempo South Indian

### 3.2.3 Cinetica di Peleg

La trattazione cinetica ha come punto di partenza la linearizzazione del grafico rese/tempo ottenuto precedentemente (Figura3.1). Sull'asse delle ascisse figura il tempo in ore, mentre sull'asse delle ordinate i valori sono invece calcolati come segue:

$$Y = \frac{Resa}{Tempo} \quad (3.1)$$

In Figura3.2 è visibile il risultato di questa operazione.

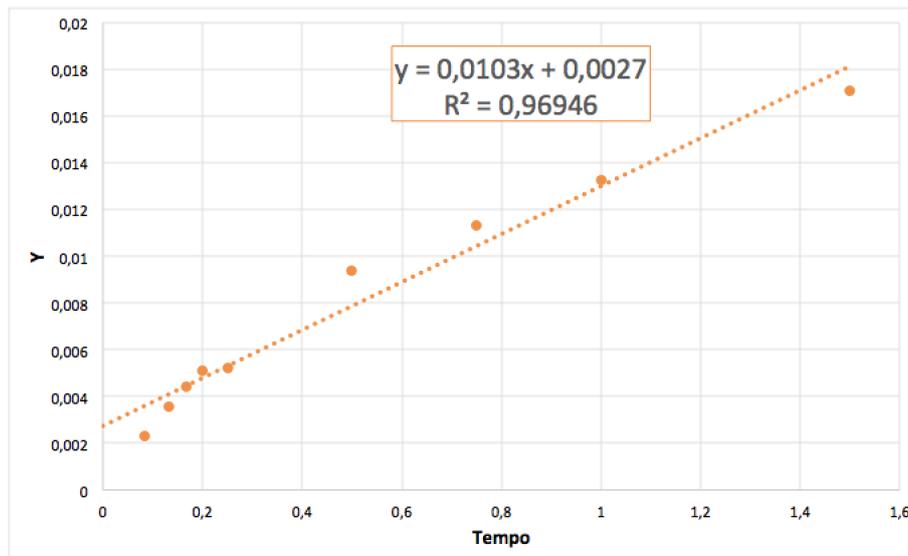


Figura 3.2: Linearizzazione

Una volta linearizzato il sistema, si ricavano le due costanti di Peleg  $k_1$  e  $k_2$  rispettivamente come pendenza ed intercetta della retta con l'asse y.

Tabella 3.9: Costanti di Peleg

$k_1$	$k_2$
0,0027	0,0103

Determinate le costanti è possibile diagrammare la curva Resa vs Tempo utilizzando il modello di Peleg, tramite l'equazione 3.2.

$$C(t) = \frac{t}{0,0027 + 0,0103 * t} \quad (3.2)$$

Oltre che dal valore di  $R^2$  della retta di regressione in Fig.3.2, la validità della curva estrapolata è definita anche dalla sovrapposizione di quest'ultima con i punti sperimentali ricavati in laboratorio. In figura 3.3 è visibile il risultato di questa operazione.

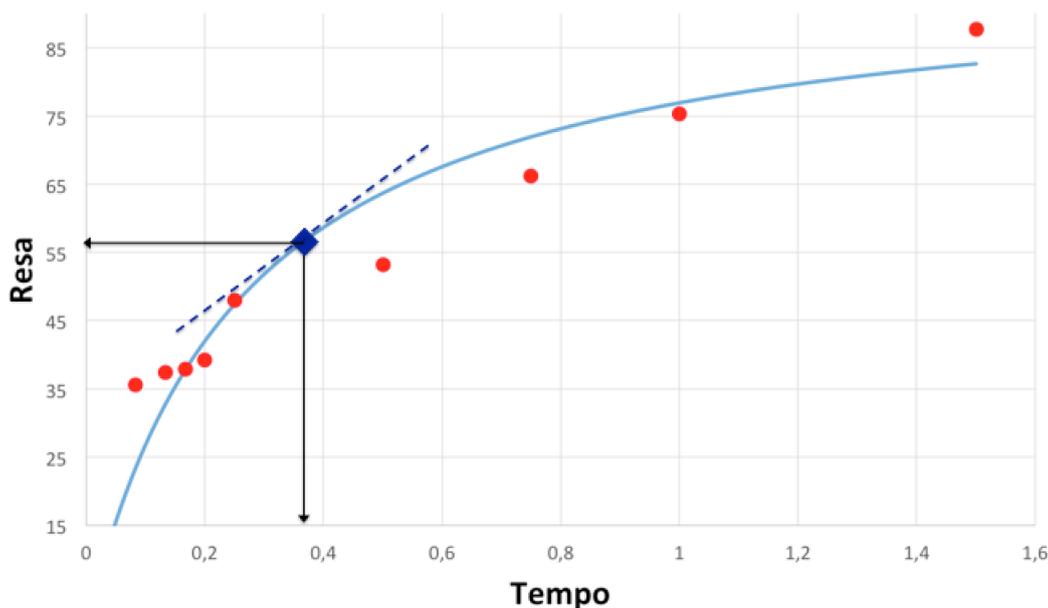


Figura 3.3: Resa vs Tempo

I valori ottenuti sono con buona approssimazione assimilabili alla curva ottenuta dal modello matematico. Questo significa che la cinetica estrattiva del sistema è descritta in maniera sufficiente dal modello di Peleg, rendendo più semplice la trattazione fluidodinamica ed il calcolo dei parametri estrattivi fondamentali per uno *scale-up* di processo. In questo modo è possibile individuare il punto di lavoro ottimale lungo il tracciato, scegliendo come tempo di estrazione uno dei tempi che cadono sul ginocchio della curva, in modo tale da avere il miglior compromesso tra forza spingente e prodotto ottenuto. Si procede dunque al calcolo della  $k_{La}$  per ognuna delle estrazioni effettuate, come riportato in tabella 3.11.

Tabella 3.10: Punto di lavoro ottimale

Tempo (h)	0,38
Concentrazione teorica	57,66
B(t) ( <i>Rate constant</i> )	2,51

Come atteso il valore di  $k_{La}$  decresce con il proseguire dell'estrazione a causa della diminuzione della forza spingente, che tende a raggiungere un asintoto orizzontale raggiunto l'equilibrio. Dando uno sguardo alla tabella 3.8 si individua come tempo ottimizzato 45 minuti. Tale scelta è motivata dal fatto che aumentando ulteriormente la durata del processo non è stato riscontrato un significativo aumento nel valore di TPC estratti; difatti, nel passaggio da 30 a 45 minuti, infatti, vi è un aumento nella resa di estrazione pari a circa il 25%, mentre andando da 45 a 60 minuti il guadagno scende a circa il 14 %. Inoltre, confrontando il dato empirico

Tabella 3.11: Calcolo  $k_{La}$

SOUTH INDIAN			
Estrazione	t(min)	$C_A$ (mg/g)	$K_{La}$
BTE01-TA-035	5	35,64	0,07
BTE01-TA-047	8	37,37	0,05
BTE01-TA-048	10	37,92	0,04
BTE01-TA-049	12	39,21	0,03
BTE01-TA-036	15	47,94	0,03
BTE01-TA-037	30	53,17	0,02
BTE01-TA-038	45	66,26	0,02
BTE01-TA-039	60	75,26	0,02
BTE01-TA-040	90	90,51	0,01

ottenuto con il corrispettivo sviluppato tramite modello cinetico si ottiene un incremento di circa il 10%, avendo trovato tramite il modello di *Peleg* un TPC pari a circa 72 mg/g. Considerando che la resa massima ottenibile in un'estrazione risulta essere intorno ai 96 mg/g, un'estrazione della durata di 45 minuti sembra quindi essere un compromesso vantaggioso sia per quanto concerne la resa ottenuta, sia per il tempo di estrazione. In questo punto della curva si va verso l'asintoto ma non si è ancora arrivati a saturare il solvente. Bisogna inoltre considerare che, a differenza delle tempistiche richieste per uno *scale-up* industriale, in scala laboratoriale è permesso prolungare maggiormente i tempi per incrementare il più possibile le rese. Per quanto riguarda il design impiantistico si è dunque scelto per questo *blend* un punto di lavoro compreso fra 20 e 30 minuti (23 ca.) per il quale, a conferma della diminuzione delle tempistiche per gli impianti, si evidenzia come la resa teorica ottenuta sia confrontabile (di poco superiore) con l'estrazione in 30 minuti in R.E.U.S.S. .

### 3.2.4 Cross-Flow

Considerando come obiettivo finale la progettazione di una sezione di estrazione a livello industriale, si è simulata in batch una approssimazione di estrazione controcorrente. A tal fine, della matrice fresca è stata estratta riutilizzando il liquido risultante da uno step precedente. In questo modo ci si è posti nelle condizioni di massima forza spingente disponibile (matrice con pieno contenuto di polifenoli e liquido solo parzialmente esausto). Secondo i criteri già esposti, si è mantenuto il tempo estrattivo ottimale di 45 minuti (0,75 h); l'eventuale scelta di tempi minori avrebbero comportato un numero di passaggi estrattivi in batch troppo elevato per raggiungere l'esaurimento della matrice. Dai dati riportati in tabella 3.12 si evince che l'arricchimento della frazione liquida  $L_2$  (35%) non è sufficiente per giustificare ulteriori test di simulazione controcorrente. In scala di laboratorio, non potendo sfruttare un sistema estrattivo a flusso al fine di ridurre tempi e utilizzare un numero di stadi teorici più efficiente, si è scelto di proseguire dal sistema controcorrente con una simulazione di processo di tipo *cross-flow*. Liquido e solido esausti sono

stati recuperati e reimpiegati rispettivamente con solido e liquido freschi, secondo lo schema in due stadi riportato in Figura 3.4.

La prima prova è stata effettuata con 10.0 g di tè in 150 mL di acqua, mentre per le fasi seguenti i quantitativi sono stati tarati in funzione della perdita di solido e di liquido, dovute alle operazioni di recupero (perdita per filtrazione e impregnazione). Il solido recuperato viene lavato separatamente dal liquido d'estrazione calcolando su un'aliquota la quantità d'acqua residua, in modo da adeguare l'aggiunta di solvente per l'estrazione successiva. Il rapporto liquido/solido viene mantenuto pari a 15.

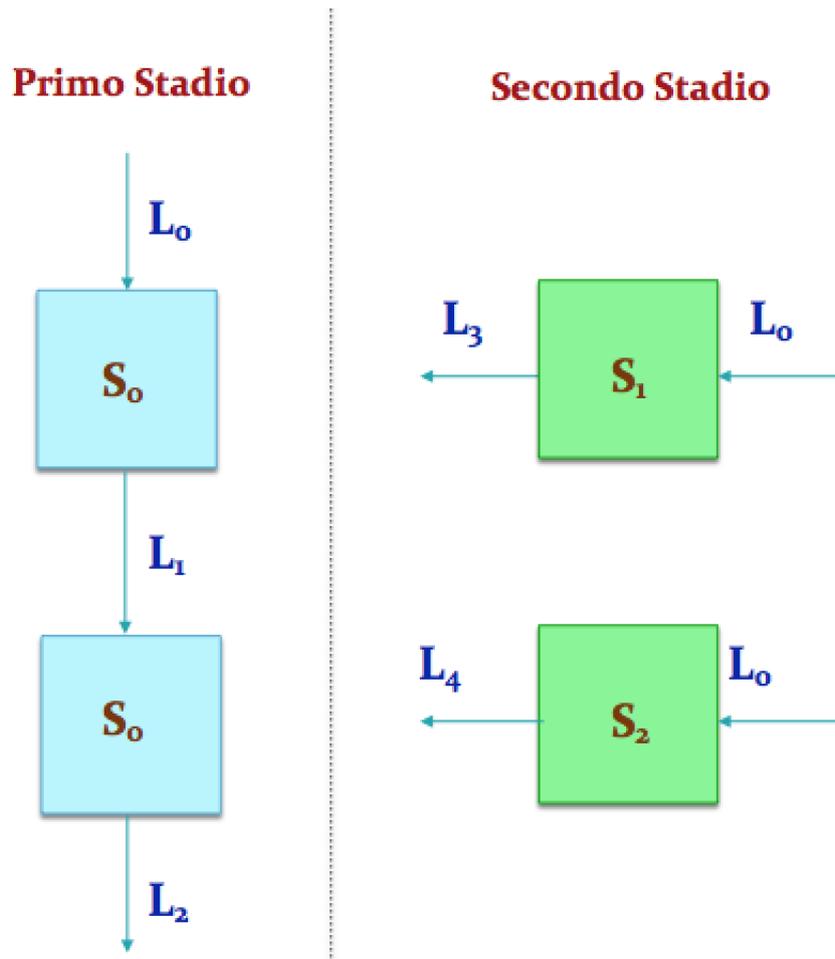


Figura 3.4: Stadi Sezione Estrattiva

Il primo stadio, effettuato per la simulazione del controcorrente, è caratterizzato dal passaggio del liquido fresco  $L_0$  sul solido fresco  $S_0$ , e dalla successiva estrazione con liquido esausto  $L_1$  di ulteriore solido  $S_0$ , effettuato per la simulazione del controcorrente. La riproducibilità del processo è stata verificata conducendo i test in doppio. I risultati vengono riportati nella tabella 3.12.

Il solido fresco estratto tramite  $L_1$  viene esaurito per circa il 20%, prendendo la denominazione  $S_2$ . Partendo dalla quantificazione totale effettuata sulla matrice,

Tabella 3.12: Simulazione Cross-Flow - Primo Stadio

SOUTH INDIAN						
Estrazione	t(min)	Corrente	Note	Estratto secco (mg/g)	TPC (mg/g)	
BTE01-TA-016	45	L <sub>1</sub>	solvente fresco	97,08	66,26	
BTE01-TA-023	45	L <sub>2</sub>	liquido esausto	341,51	90,51	

il contenuto residuo di polifenoli in S<sub>2</sub> è stato stimato sottraendo al risultato dato dalla BTEA-TA-023 quello ottenuto dall'estrazione BTEA-TA-016, partendo dalla quantificazione totale effettuata sulla matrice. Similmente, viene calcolato che l'S<sub>1</sub> risulta esaurito per circa il 56%. Si procede quindi con un secondo stadio nel quale entrambi i solidi esausti incontreranno solvente fresco di tipo L<sub>0</sub>.

Tabella 3.13: Simulazione Cross-Flow - Secondo Stadio

SOUTH INDIAN						
Estrazione	t(min)	Corrente	Note	Estratto secco (mg/g)	TPC (mg/g)	
BTE01-TA-024	45	L <sub>3</sub>	solvente fresco	97,08	29,62	
BTE01-TA-062	45	L <sub>4</sub>	solvente fresco	391,00	52,48	

Alla luce di questi risultati si può notare come tramite una seconda estrazione del solido esausto si raggiunga un valore di TPC pari a circa 96 (mg/g), dato dalla somma dell'estrazione madre a 45 minuti (BTEA-TA-016) con il risultato ottenuto dalla BTEA-TA-024 (3.13). Il solido vede quindi esaurirsi l'80% del suo tenore polifenolico di partenza. Sul solido di tipo S<sub>2</sub> il vantaggio della soluzione in due *step* è ancora più evidente, poiché è stato esaurito per un totale di circa il 64% del suo potenziale.

Tabella 3.14: Risultati finali

		Stadi <i>cross-flow</i>			
Solido	Quantitativa (mg/g)	Stadio 1 (mg/g)	Stadio 2 (mg/g)	Totale (mg/g)	% Esaurimento (mg/g)
S <sub>1</sub>	119,74	66,26	29,62	95,88	80%
S <sub>2</sub>		24,25	52,48	76,73	64%
TPC mix correnti polifenoliche= 172,61 (mg/g)					72%

Al fine di incrementare la resa totale del sistema impiegato, è applicato un pre-

trattamento di calandratura, in modo da potersi avvicinare all'esaurimento totale della matrice. Si è definito l'eventuale aumento di efficienza confrontandosi sulla procedura ritenuta finora ottimale. In Figura 3.5 viene mostrata la procedura effettuata sulla matrice di studio.

Tabella 3.15: Calandratura

Estrazione	Matrice	t (min)	Tech	Estratto secco (mg/g)	TPC (mg/g)
BTE01-TA-038	SOUTH INDIAN	45	Reus 2	243,21	66,26
BTE01-TA-019	SOUTH INDIAN	45	Reus 2	291,33	70,89



Figura 3.5: Step di calandratura della matrice

La calandratura può essere considerabile ai fini del processo industriale, attendendosi con un aumento di resa estrattiva di circa il 7%. L'aumento in TPC non è tuttavia sufficiente per motivare una ripetizione del modello *cross-flow* per ulteriori studi.

### 3.3 Ceylon Orange

L'industria del tè risulta essere particolarmente fiorente per quanto riguarda la produzione di tè nero per infusione. L'innovazione che si prova ad introdurre tramite questo lavoro consiste nella valorizzazione degli scarti derivanti dalla produzione. Questi risultano essere egualmente ricchi in polifenoli rispetto al taglio tisana, ma la granulometria con la quale si presentano porta ad un'elevata concentrazione di antiossidanti, dando un sapore troppo amaro se utilizzati per uso alimentare. Diventa quindi importante ridurre la quantità finale di scarto solido prodotto, reindirizzandolo verso nuove destinazioni, interessanti sia per l'eventuale ritorno economico che dal punto di vista dell'ecosostenibilità. Gli scarti utilizzati sono stati forniti dalla ditta Giotti (Firenze).

#### 3.3.1 Estrazioni in Convenzionale

Così come per la matrice precedente, anche in questo caso sono state effettuate delle estrazioni in convenzionale per quantificare il contenuto totale polifenolico della matrice. Le estrazioni effettuate sono:

- Quantificazione in acqua a ricadere in 2 step;
- Quantificazione in etanolo in 2 step;
- Quantificazione in etanolo *over night* a temperatura ambiente;
- Quantificazione idroalcolica (da letteratura [33]) con solvente composto da 50% acqua e 50% etanolo;

Tutte le estrazioni sono state fatte su 3.0 (g) di solido, il quantitativo di solvente utilizzato viene variato fra 45 a 90 (mL) a seconda del rapporto con la matrice scelto (visibile nella sezione Note della tabella 3.16).

Si può notare come la diversità nel rapporto L/S non influenzi l'estrazione in etanolo a ricadere, mentre l'aumento del solvente fa sì che raddoppi il valore finale dell'estrazione *over night*; questa variazione può essere spiegata ipotizzando un incremento di trasferimento di massa causato da una agitazione più efficace, aiutata nei test a ricadere dai moti convettivi nel pallone. È evidente come un confronto riflusso/RT evidenzia l'ovvia dipendenza del trasporto di massa dalla temperatura. Risulta essere interessante anche il valore ottenuto tramite estrazione idroalcolica, che si presenta come il più elevato. A scopo di confronto con il sistema estrattivo ad US, è stata adottata la quantificazione in acqua a riflusso, in modo da mantenere il medesimo solvente e definirne la variazione di affinità verso i polifenoli nei diversi sistemi. Come quantificazione finale è stata quindi adottata la prova BTE01-TA-044, la quale si presenta maggiormente performante anche rispetto all'etanolo puro, restituendo un valore di TPC pari a  $138,20$  (mg/g).

Tabella 3.16: Estrazioni in Convenzionale

CEYLON ORANGE						TPC (mg/g)		
L/S	Estrazione	Solvente	T (°C)	t (min)	Note	Estratto secco (mg/g)	Parziale	Totale
15	BTE01-TA-032	EtOH	80	180	I step	250,91	73,71	82,45
	BTE01-TA-033	EtOH	80	180	II step	47,16	8,74	
	BTE01-TA-034	EtOH	80	ON	-	134,08	-	
30	BTE01-TA-035	EtOH	80	180	I step	290,6	70,78	78,73
	BTE01-TA-036	EtOH	80	180	II step	55,96	7,96	
	BTE01-TA-037	EtOH	80	ON	-	147,79	-	
30	BTE01-TA-046	Acqua	100	180	I step	597,56	117,39	138,20
	BTE01-TA-062	Acqua	100	180	II step	122,4	20,82	
30	BTE01-TA-058	H <sub>2</sub> O/EtOH	80	120	R: 50/50	538,31	-	154,38

### 3.3.2 Time Screening

In funzione dei risultati precedentemente ottenuti si è proceduto, come illustrato Tabella3.17, con delle estrazioni fin tempi compresi fra 2 e 90 minuti.

Rispetto al *South Indian*, in questo caso si è raggiunto molto prima un *plateaux* nei risultati ottenuti. Difatti, fra i 10 ed i 90 minuti le rese vengono incrementate di solo 20 punti percentuali, mentre per la matrice precedente l'aumento superava il 130%. Per definire il tempo ottimizzato si è valutato il guadagno in TPC fra 30 e 45 minuti, pari al 4.3%ca., che si presenta molto simile a quello fra 45 e 60, corrispondente al 4.9%. Per continuità con il lavoro svolto precedentemente, insieme alla necessità di non allungare troppo i tempi di processo a fronte di un guadagno irrisorio, anche in questo caso l'ottimizzazione viene individuata nei 45 minuti. Come per il taglio tisana, anche in questo caso considerando il quantitativo di polifenoli ottenuto una volta raggiunto lo stadio stazionario dell'estrazione, si rivela necessario valutare un protocollo estrattivo a stadi multipli. L'obiettivo è stato quello di raggiungere una percentuale sufficiente di esaurimento della matrice.

Viene di seguito riportato un grafico esplicativo di come vari la resa in funzione del tempo in Figura3.6.

Tabella 3.17: *Time Screening*

CEYLON ORANGE			
Estrazione	t (min)	Estratto secco (mg/g)	TPC (mg/g)
BTE01-TA-048	2	131,15	20,4
BTE01-TA-038	5	192,1	33,26
BTE01-TA-049	8	188,12	38,47
BTE01-TA-050	10	239,58	40,7
BTE01-TA-051	12	214,88	40,86
BTE01-TA-039	15	261,61	42,85
BTE01-TA-040	30	272,59	43,67
BTE01-TA-041	45	197,49	45,53
BTE01-TA-042	60	217,85	47,76
BTE01-TA-043	90	214,40	48,39

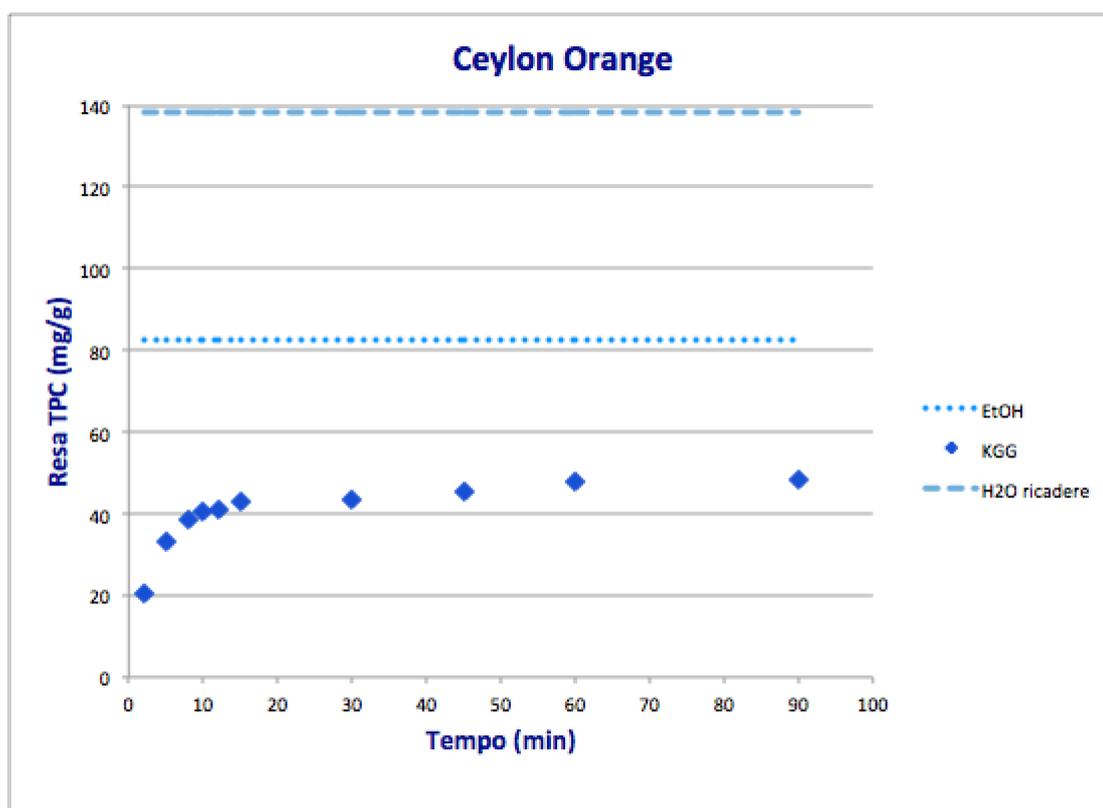


Figura 3.6: Resa vs Tempo Ceylon Orange

## Estrazioni Classiche

Si procede con due estrazioni classiche (Tabella 3.18), ossia:

- Estrazione per infusione.

Si procede portando ad ebollizione l'acqua e aggiungendo la matrice che viene lasciata in infusione per 3h; si utilizza l'agitazione in modo tale che non si formino sedimenti. Dal confronto con l'estrazione in acqua a ricadere (svolta mantenendo la temperatura costante a 100°C), l'infusione risulta portare a rese di circa 5 volte inferiori, rivelando come la temperatura non porti a degradazione termica i polifenoli e dando quindi prova della stabilità degli stessi.

- Trasposizione dei parametri ottimizzati per US in un sistema in agitazione magnetica.

Si utilizzano per un'estrazione in agitazione magnetica, quindi senza l'utilizzo della cavitazione, i medesimi tempi e temperature utilizzati per le estrazioni assistite da US. Dal confronto fra i due sistemi, si evidenzia l'efficienza del fenomeno della cavitazione sull'estrazione dei composti target grazie ad un incremento della resa del 25%.

Tabella 3.18: Estrazioni Classiche

CEYLON ORANGE				
Estrazione	t (min)	Note	Estratto secco (mg/g)	TPC
BTE01-TA-039	180	Infusione	111,32	29,8
BTE01-TA-054	45	NO US	203,22	34,56

### 3.3.3 Cinetica di Peleg

La trattazione cinetica vede nuovamente come punto di partenza la linearizzazione del grafico rese/tempo ottenuto precedentemente (Figura 3.6). Anche in questo caso si è scelto di utilizzare il tempo in ore. Si riporta nuovamente per completezza l'equazione utilizzata per il calcolo delle y.

$$Y = \frac{Resa}{Tempo} \quad (3.3)$$

In Figura 3.7 è visibile il risultato di questa operazione.

Una volta linearizzato il sistema si ricavano le due costanti di Peleg  $k_1$  e  $k_2$  come pendenza ed intercetta della retta con l'asse y.

Si diagramma quindi la curva Resa vs Tempo utilizzando il modello di Peleg, tramite l'equazione 3.4.

$$C(t) = \frac{t}{0,0009 + 0,0202 * t} \quad (3.4)$$

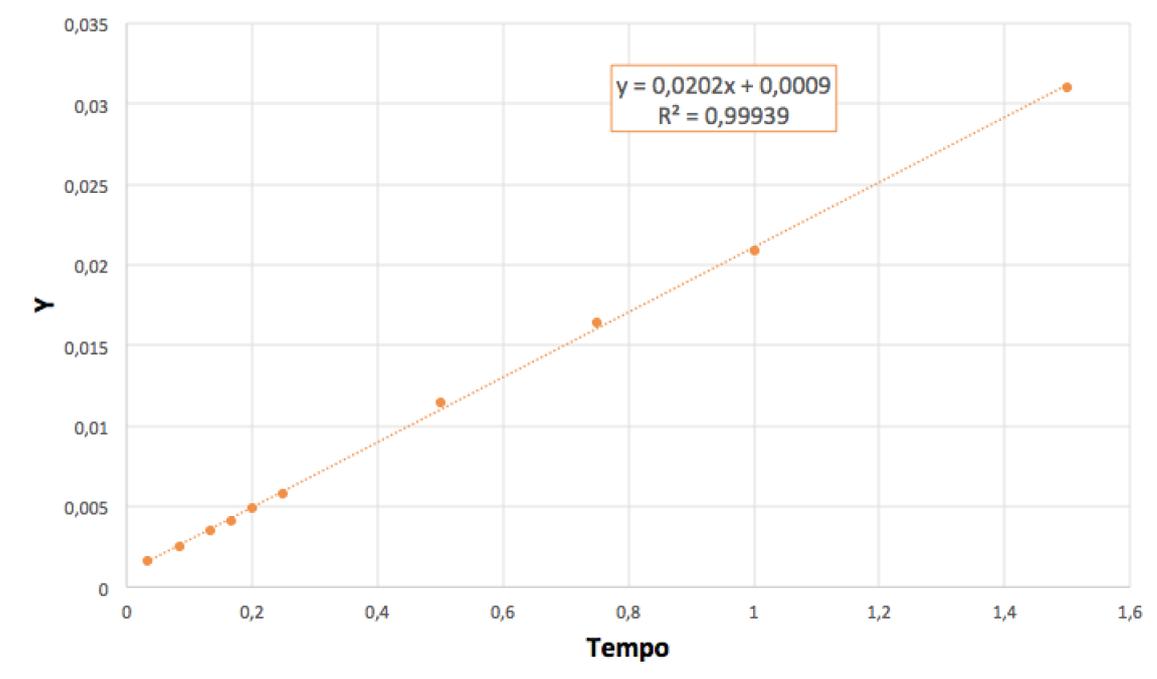


Figura 3.7: Linearizzazione

Tabella 3.19: Costanti di Peleg

$k_1$	$k_2$
0,0009	0,0202

Come visibile in figura 3.8 in questo caso il modello di Peleg approssima ancora meglio i risultati ottenuti in laboratorio. Questo risultato è proficuo dal punto di vista dell'intensificazione di processo, poiché la biomassa da valorizzare è uno scarto di produzione, non un taglio commerciale.

Anche in questo caso si seleziona un punto di lavoro ottimale per quanto riguarda la progettazione delle unità estrattive impiantistiche. Si sceglie un punto di lavoro compreso fra 0 e 12 minuti (10 ca.), per il quale si evidenzia come la resa teorica ottenuta sia confrontabile con l'estrazione in 10 minuti in R.E.U.S.S., risultato positivo considerando i tempi brevi di processo (Tabella3.20).

Tabella 3.20: Punto di lavoro ottimale

Tempo (h)	0,17
Concentrazione teorica	39,06
B(t) ( <i>Rate constant</i> )	3,91

La massima resa ottenibile in un'estrazione all'equilibrio secondo il modello cine-

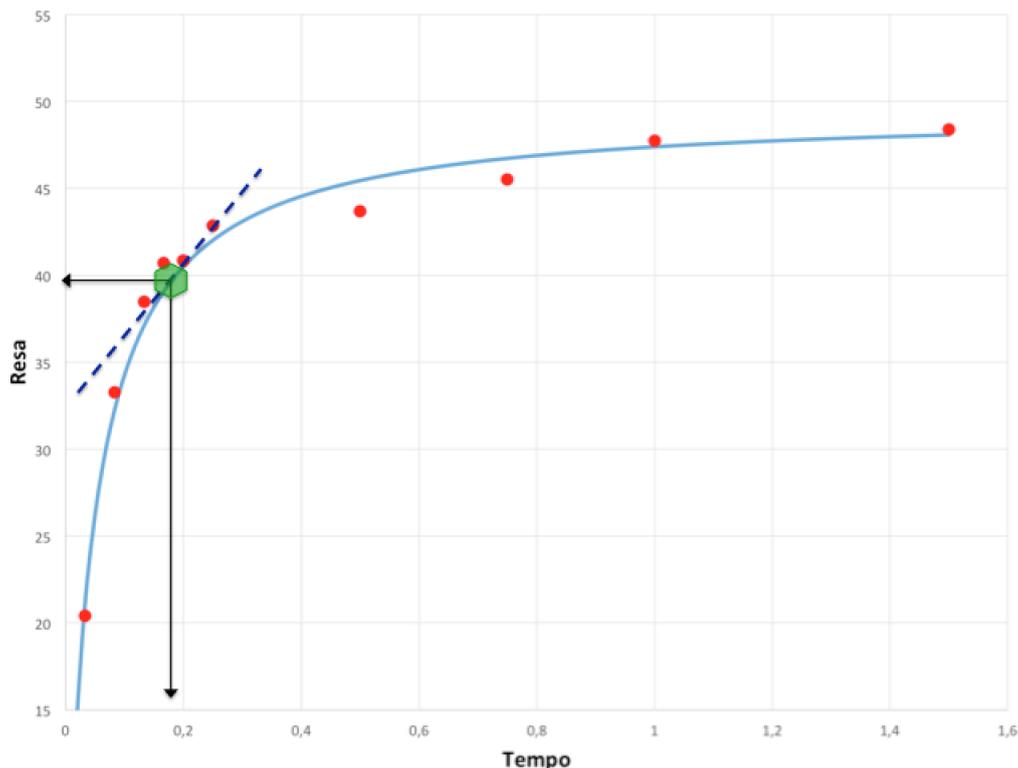


Figura 3.8: Resa vs Tempo

tico risulta essere decisamente inferiore rispetto a quanto rinvenuto con la matrice di taglio commerciale, rimanendo lontana anche dalla quantificazione totale. Lavorare sul ginocchio della curva risulta una scelta favorevole poiché si riescono a snellire i tempi di processo mantenendo rese adeguate; ottenendo 39,06 mg/g sul massimo di 49 mg/g.

Si procede dunque al calcolo della  $k_{L,a}$  per ognuna delle estrazioni effettuate, come visibile in tabella 3.21. Il calcolo è avvenuto utilizzando come  $C_{A,S}$  il valore restituito dalla quantificazione in acqua a ricadere. La scelta è stata dettata dalla necessità di confrontare sistemi con il medesimo solvente, tuttavia la quantificazione tramite estrazione idroalcolica viene utilizzata come confronto empirico nella sezione 3.3.4.

### 3.3.4 Cross-Flow

Alla luce di quanto discusso finora è risultato interessante indagare il comportamento della matrice attraverso degli stadi *cross-flow*. In questo caso si procede con due modalità diverse; la prima effettuata, come in precedenza, con 10.0 g in 150 mL, mentre nella è stato raddoppiato il volume, mantenendo però costante il rapporto liquido/solido (20.0 (g) in 300 (mL)). Questa scelta è stata dettata dalla necessità di abbassare la temperatura di processo per mantenere temperature di lavoro che massimizzino l'efficacia della cavitazione e che permettano di considerare

Tabella 3.21: Calcolo  $k_{La}$

CEYLON ORANGE			
Estrazione	t(min)	$C_A$ (mg/g)	$K_{La}$
BTE01-TA-048	2	20,4	0,08
BTE01-TA-038	5	33,26	0,06
BTE01-TA-049	8	38,47	0,04
BTE01-TA-050	10	40,7	0,03
BTE01-TA-051	12	40,86	0,03
BTE01-TA-039	15	42,85	0,02
BTE01-TA-040	30	43,67	0,01
BTE01-TA-041	45	45,53	0,01
BTE01-TA-042	60	47,76	0,01
BTE01-TA-043	90	48,39	0,005

trascurabile il trasferimento di massa dovuto ad effetti termici. L'estrazione a doppio volume fa sì che la fase *slurry* contenuta nel *cup-horn* non si surriscaldi, offrendo una maggior superficie di contatto con il mantello di raffreddamento, consentendo di condurre l'estrazione a temperature inferiori. Si può notare in Tabella3.22 come il valore di TPC finale non vari in modo sostanziale, validando quindi questo protocollo estrattivo.

Tabella 3.22: Differenza Volumica

CEYLON ORANGE				
VOL (mL)	Estrazione	t (min)	Note	Totale
150	BTE01-TA-039	45	-	45,53
300	BTE01-TA-054	45	-	44,67

La lettura dei risultati viene esemplificata tramite uno schema a blocchi relativo ai vari stadi di estrazione. In questo caso si procede tramite tre diversi stadi estrattivi: di seguito si affronta il commento dei risultati ottenuti.

Il primo stadio è costituito dall'estrazione "madre" con solido e liquido freschi, e dal passaggio del liquido esausto  $L_1$  su del solido fresco  $S_0$ . L' $S_0$  che incontra  $L_0$  diviene quindi un  $S_1$ , mentre l' $S_0$  che incontra  $L_1$  diviene un  $S_2$ .

Visti i risultati sperimentali esposti in Tabella3.23, e viste le quantificazioni effettuate (esposte precedentemente nella Tabella3.16), è evidente come la matrice non esaurisca il suo tenore polifenolico in queste due estrazioni. L' $S_1$  viene esaurito per il 33% circa, che si abbassa al 30% considerando il TPC ottenuto da estrazione idroalcolica. Per quanto riguarda la corrente liquida  $L_1$  si può notare come essa abbia un limitato potere estraente, l' $S_2$  di fatti si esaurisce solamente del 20%, arrivando al 15% con acqua ed etanolo (quindi meno che dimezzato). Sembra ragionevole quindi procedere con un secondo stadio. Sia la matrice di tipo  $S_1$  che

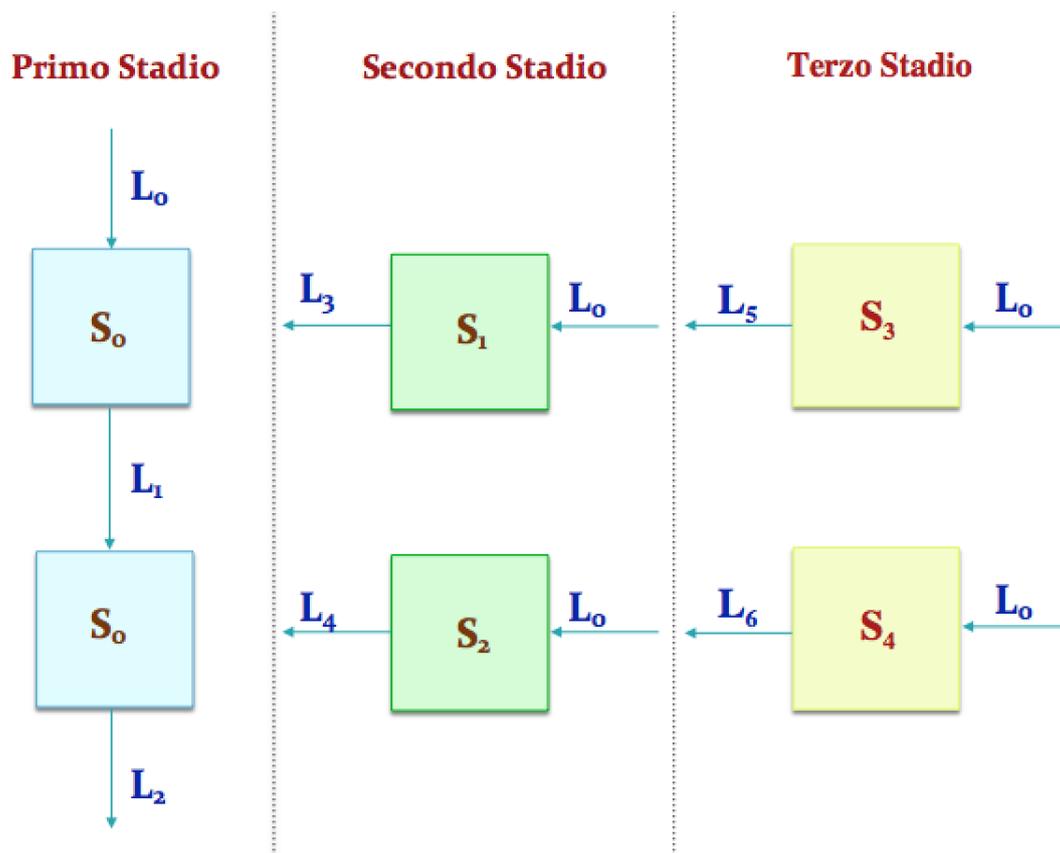


Figura 3.9: Stadi Sezione Estrattiva

Tabella 3.23: Simulazione Cross-Flow - Primo Stadio

CEYLON ORANGE						
Estrazione	t (min)	Corrente	$S_n$	Risultante	Estratto secco (mg/g)	TPC (mg/g)
BTE01-TA-054	45	$L_1$	$S_1$		288,54	49,80
BTE01-TA-055	45	$L_2$	$S_2$		571,91	75,84

quella di tipo  $S_2$  vengono quindi riestratte tramite liquido fresco. I risultati sono presentati nella Tabella 3.24.

Si può notare come entrambe le estrazioni portino a valori di TPC estremamente simili all'estrazione iniziale. Questo significa che la forza spingente del sistema è praticamente invariata, verosimilmente a causa della quantità di polifenoli residui nella matrice e sul protratto effetto fisico operato dagli US sugli scarti del tè. Alla luce di queste conclusioni, risulta ragionevole procedere ad un terzo stadio, trovandoci in condizioni di elevata efficienza estrattiva.

Tabella 3.24: Simulazione Cross-Flow - Secondo Stadio

CEYLON ORANGE						
Estrazione	t (min)	Corrente	S <sub>n</sub>	Risultante	Estratto secco (mg/g)	TPC (mg/g)
BTE01-TA-045	45	L <sub>3</sub>		S <sub>3</sub>	79,84	44,23
BTE01-TA-045	45	L <sub>4</sub>		S <sub>4</sub>	39,42	46,41

Tabella 3.25: Simulazione Cross-Flow - Terzo Stadio

CEYLON ORANGE			
Estrazione	t (min)	Corrente	TPC (mg/g)
BTE01-TA-058	45	L <sub>5</sub>	18,30
BTE01-TA-061	45	L <sub>6</sub>	16,40

Le ultime due prove dimostrano come una terza estrazione del solido riesca ad esaurire la matrice per quasi il 82% del totale, mentre il solido fresco che aveva incontrato liquido esausto riesce ad esprimere la sua potenzialità esaurendosi per circa il 64% del totale, dando un notevole contributo al prodotto finale. Nel confronto con la soluzione idroalcolica in realtà questi valori si abbassano, fermandosi al 73% per il solido di tipo S<sub>1</sub> e assestandosi sul 58% del totale sul solido di tipo S<sub>2</sub>. Bisogna però tenere in considerazione che le estrazioni sono state effettuate in acqua e, rispetto ai numerosi vantaggi legati all'utilizzo di questo solvente, i risultati ottenuti si presentano eccellenti.

Tabella 3.26: Risultati finali

		Stadi <i>cross-flow</i>				
Solido	Quantitativa (mg/g)	Stadio 1 (mg/g)	Stadio 2 (mg/g)	Stadio 3 (mg/g)	Totale (mg/g)	% Esaurimento Solido
S <sub>3</sub>	138,2	49,80	44,23	18,30	112,33	82%
S <sub>4</sub>		26,03	46,41	16,40	80,84	64%
TPC mix correnti polifenoliche=					201,17 (mg/g)	74%

## 3.4 Analisi dei dati

### 3.4.1 Analisi Qualitativa LC/MS

Per procedere ad un'analisi qualitativa dei contenuti polifenolici degli estratti sono state effettuate diverse prove all'LC/MS. La scelta dei campioni da analizzare è

ricaduta sulle estrazioni ottimizzate e sulle quantificazioni in convenzionale sia della matrice commerciale che dello scarto di lavorazione. Dopo una prima iniezione, si è potuto notare come la caffeina restituisse un picco molto elevato per entrambi i campioni, causando l'abbattimento degli altri picchi rendendoli di conseguenza poco risolti. Dunque si è scelto di effettuare una procedura di concentrazione del campione, in modo da aumentare le intensità dei componenti. Si solubilizzano 100 mg di estratto in 5 mL metanolo/acqua (50/50), separando il surnatante ed evaporandone in seguito il solvente. Il solido secco viene quindi ridisciolti secondo i parametri operativi scelti per la preparazione del campione riportati in Tabella 3.27.

Tabella 3.27: Parametri Operativi Campione LC/Massa

Componente	Peso	Unità di misura
Estratto	100	mg
Metanolo	1	mL
Acqua	1	mL

Ogni campione viene analizzato tramite due diversi metodi analitici, ciascuno riportante il nome per la categoria meglio risolta:

- Acidi Fenolici;
- Catechine.

Prima di procedere con lo studio degli standard è stata effettuata un'indagine circa le masse ottenute in funzione della composizione attesa, come previsto da letteratura. Una volta identificati sommariamente i composti principali, si sono utilizzati i riferimenti commerciali disponibili come descritto nella sezione (2.4.1)

### Ceylon Orange

Si espone in Tabella 3.28 una panoramica sui composti riconosciuti nell'estratto ottimizzato confrontati con quelli presenti nell'estrazione convenzionale in acqua a ricadere. Il *retention time* viene espresso in minuti; laddove sono presenti due valori (quercetina e canferolo), sono stati riportati i tempi di ritenzione di entrambi i picchi riscontrati. Si è ipotizzato trattarsi di effetti degradativi dei composti in questione, essendo stato osservato il medesimo tracciato anche per gli standard. Dalle Tabella 3.28; 3.29 si può notare come nell'estratto ottimizzato non solo si ritrovano tutti i composti estratti tramite metodo convenzionale, ma si ottengono anche rese in gallocatechina ed in acido galloilchinico, i quali non risultano essere presenti nell'estrazione classica.

Si riportano di seguito gli spettri UV e MS relativi ai due campioni analizzati e secondo entrambi i metodi; nell'Appendice sono presenti i cromatogrammi relativi ad ogni componente.

Tabella 3.28: LC/Massa, Ceylon Orange Optimum

Metodo LC/Massa				
Ceylon Orange Ottimizzato				
Composto	Tempo di Ritenzione UV	Tempo di Ritenzione Massa	[M-H] <sup>+</sup>	Metodo
Acido gallico	11.37	11.71	171	Acidi Fenolici
Teobromina	19.90	20.40	181	Acidi Fenolici
Caffeina	20.40	19.90	195	Catechine
Quercetina-3-glucoside	24.90	25.34	465	Acidi Fenolici
Quercetina	25.85/-	26.26/31.75	303	Catechine
Canferolo	26.85/34.37	27.20/34.89	287	Acidi Fenolici
Catechina	18.39	18.58	291	Catechine
Epicatechina	20.4	20.63	291	Catechine
EGCG	20.55	20.90	459	Catechine
EC-3-gallata	23.32	23.76	443	Catechine
Gallocatechina	17.43	16.93	307	Catechine
Acido galloilchinico	17.14	17.37	345	Acidi Fenolici
Vitexina-O-glucoside	24.33	24.78	595	Acidi Fenolici

Tabella 3.29: LC/Massa, Ceylon Orange Convenzionale

Metodo LC/Massa				
Ceylon Orange Acqua a ricadere				
Composto	Tempo di Ritenzione Massa	Tempo di Ritenzione UV	[M-H] <sup>+</sup>	Metodo
Acido gallico	11.47	11.81	171	Acidi Fenolici
Teobromina	20.07	20.43	181	Acidi Fenolici
Caffeina	23.49	23.91	195	Acidi Fenolici
Quercetina-3-glucoside	25.62	25.96	465	Acidi Fenolici
Quercetina	25.82/-	26.12/32.24	303	Acidi Fenolici
Canferolo	26.68/-	27.10/31.93	287	Acidi Fenolici
Vitexina-O-glucoside	24.33	24.78	595	Acidi Fenolici
Catechina	17.77	18.17	291	Catechine
Epicatechina	19.65	20.18	291	Catechine
EGCG	20.82	21.18	459	Catechine
EC-3-gallata	23.08	23.50	443	Catechine

**Metodo: Acidi Fenolici**  
 Ceylon Orange Ottimizzato\_45 min

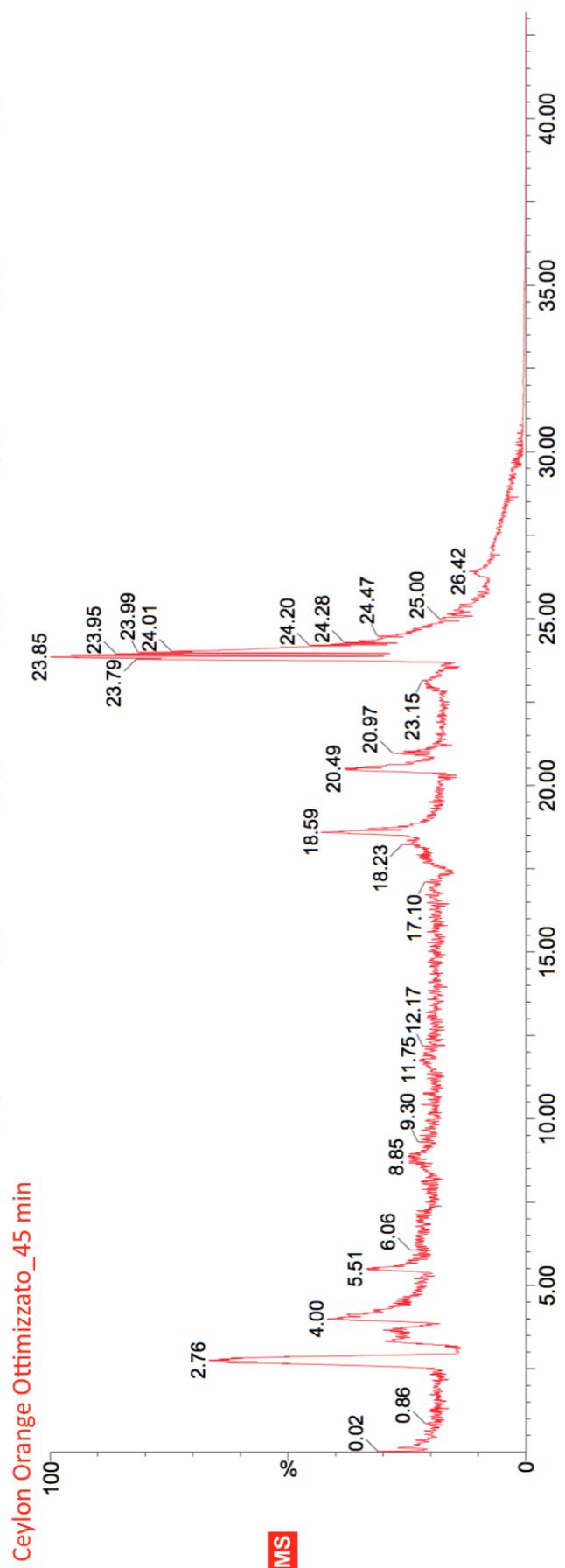
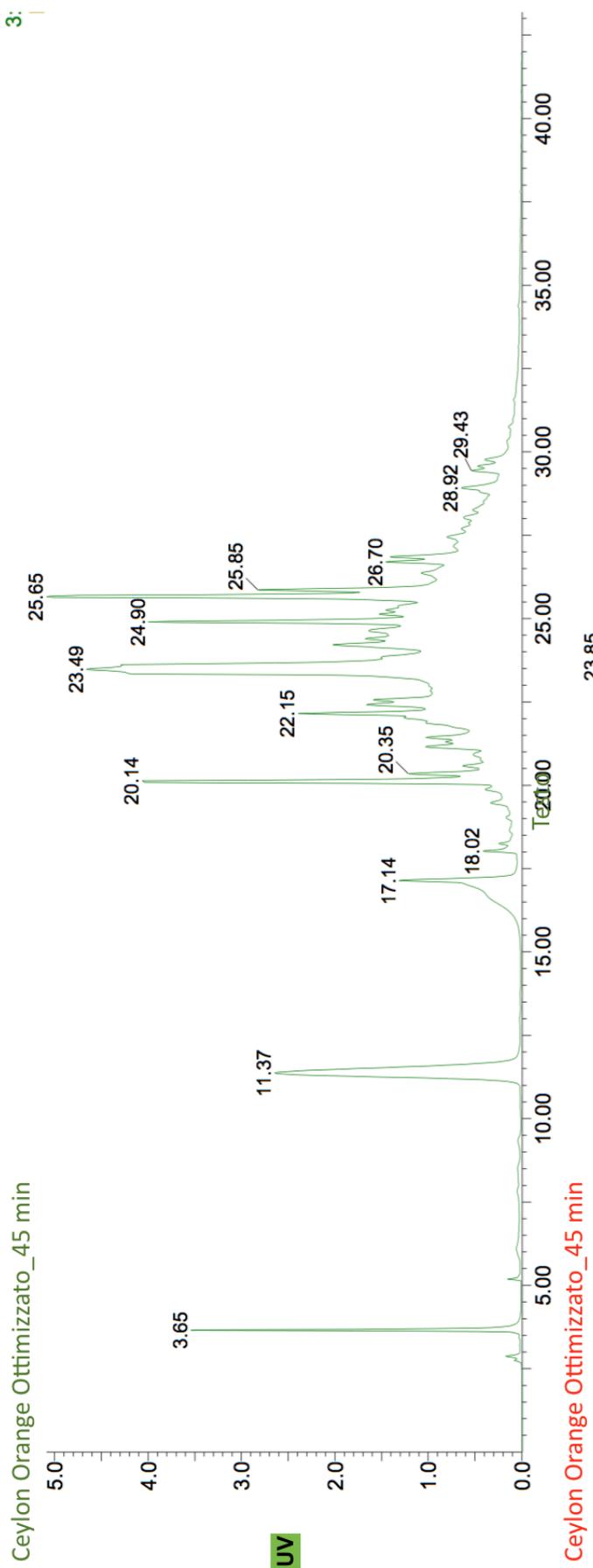


Figura 3.10: Ceylon Orange Ottimizzato, Metodo Acidi Fenolici

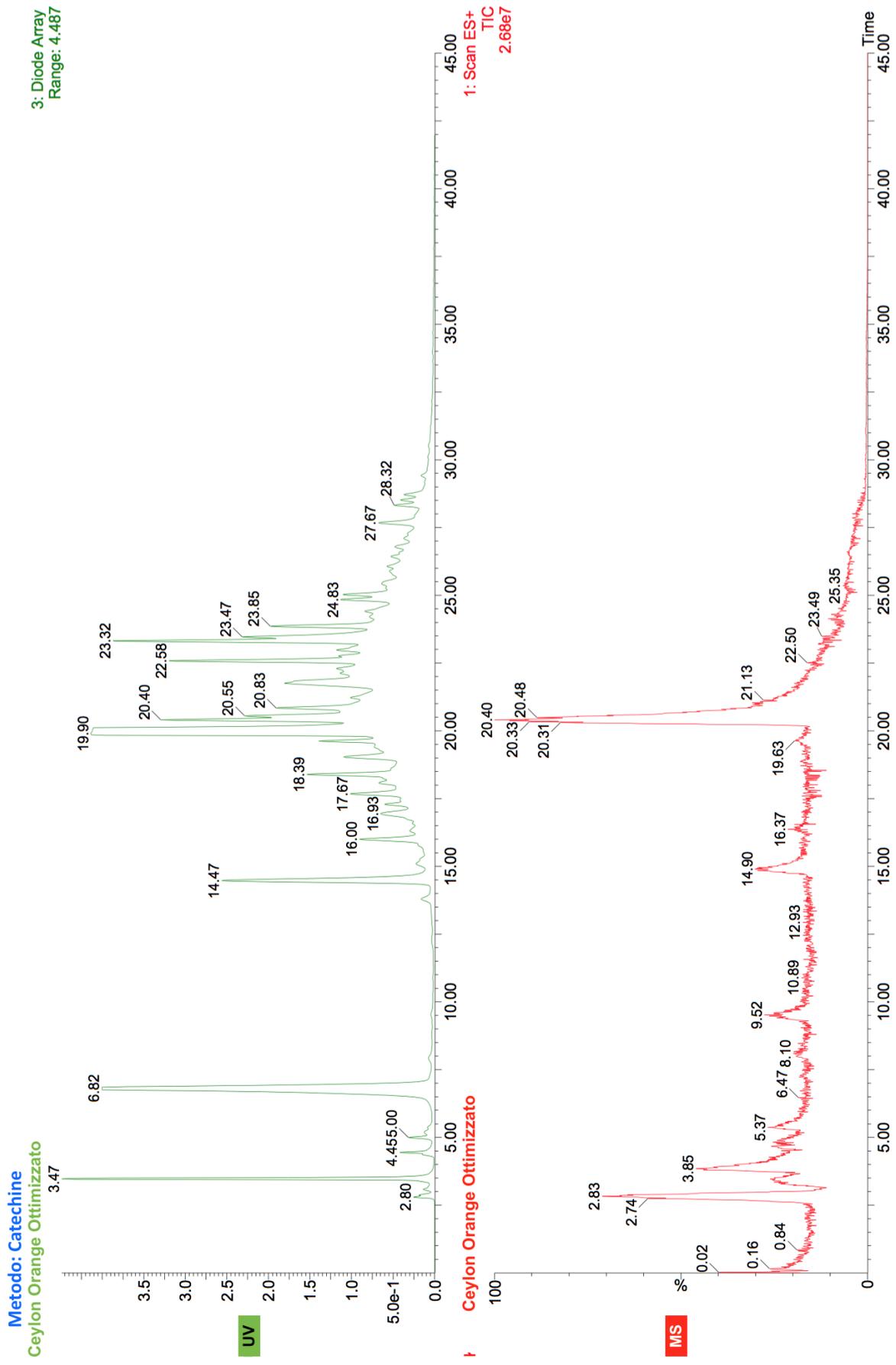


Figura 3.11: Ceylon Orange Ottimizzato, Metodo Catechine

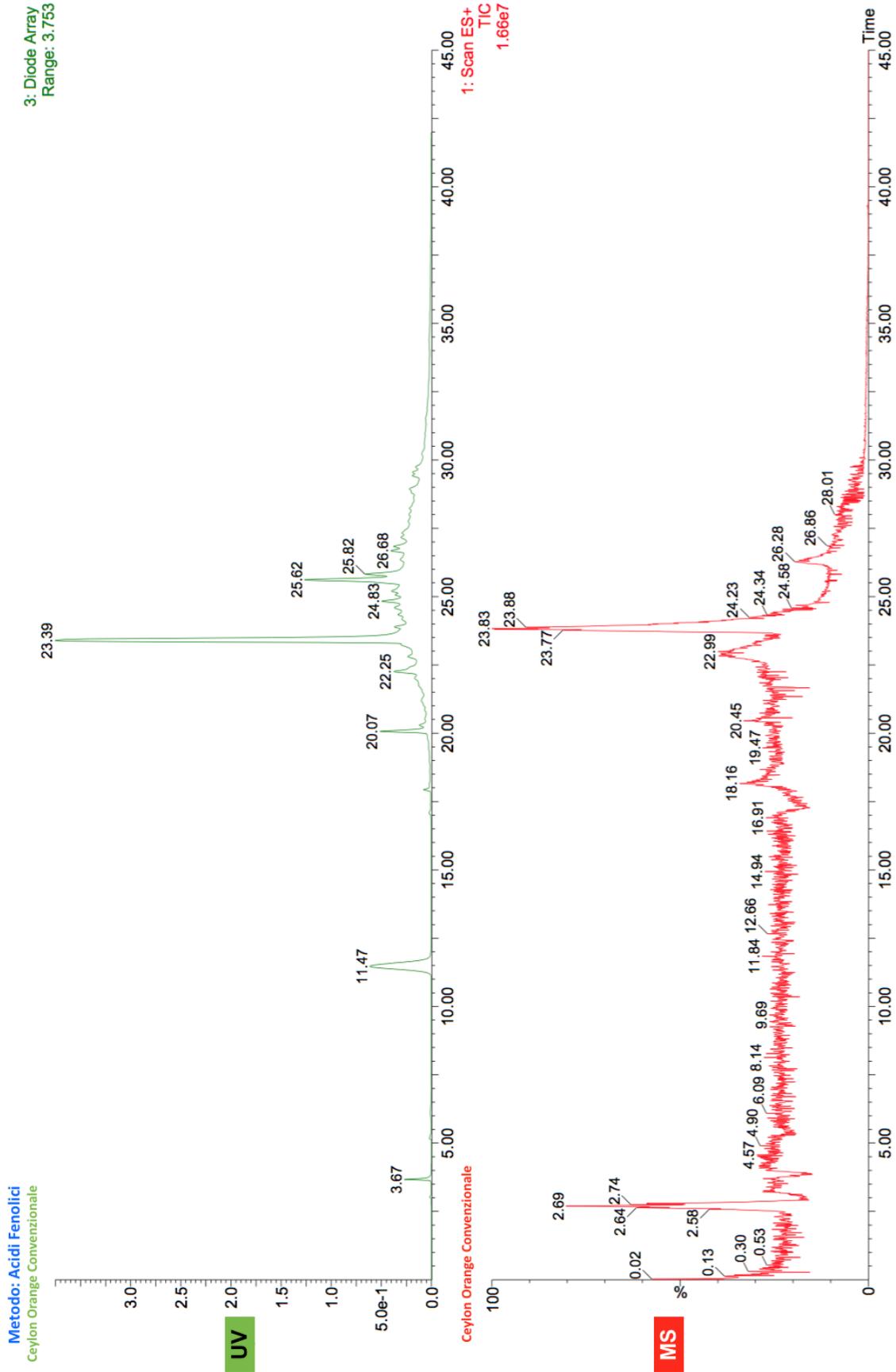


Figura 3.12: Ceylon Orange Convenzionale, Metodo Acidi Fenolici

**Metodo: Catechine**  
Ceylon Orange Convenzionale

3: Diode Array  
Range: 3.487

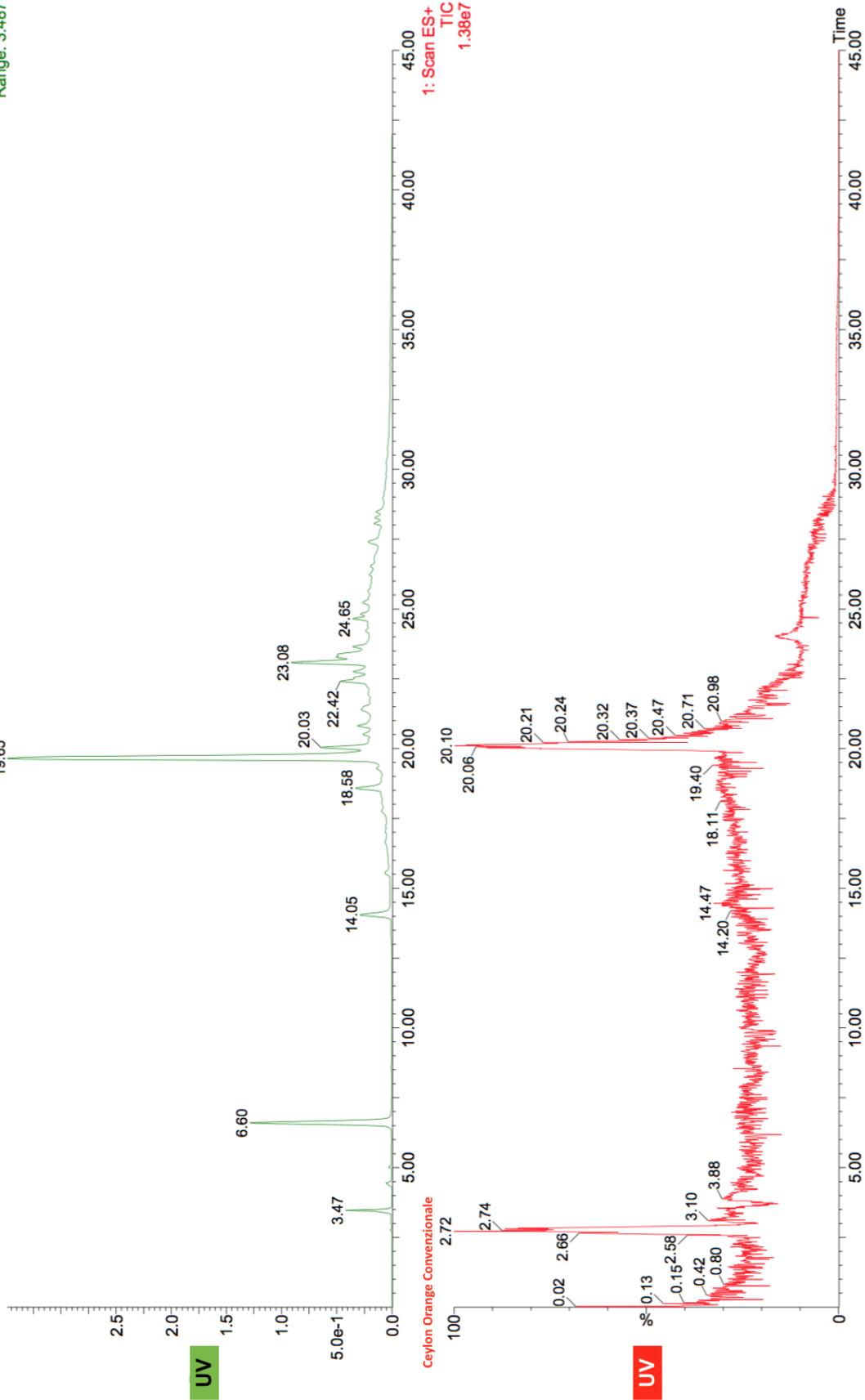


Figura 3.13: Ceylon Orange Convenzionale, Metodo Catechine

## South Indian

Nuovamente viene esposto in Tabella3.4.1 una panoramica sui composti riconosciuti nell'estratto ottimizzato confrontati poi con quelli ottenuti tramite estrazione convenzionale in acqua a ricadere. Il retention time viene sempre espresso in minuti. Dalla Tabella3.4.1 si può notare come nell'estratto ottimizzato si riconoscono alcuni composti differenti rispetto al metodo convenzionale. Non si è riusciti ad identificare l'acido gallico trovato in acqua a ricadere, ma si ritrovano l'acido clorogenico ed il paracumarico; per quanto riguarda le catechine compare una resa in epicatechina-3-gallata non presente nell'estrazione classica.

Metodo LC/Massa					
South Indian Ottimizzato					
Composto	Tempo di Ritenzione UV	Tempo di Ritenzione Massa	[M-H] <sup>+</sup>	Metodo	
Acido clorogenico	22.33	21.95	355	Acidi Fenolici	
Acido paracumarico	23.48	23.28	165	Acidi Fenolici	
Caffeina	15.03	14.53	195	Catechine	
Quercetina	24.96/25.74	24.88/26.33	303	Catechine	
Canferolo	25.18/26.83	24.88/26.33	287	Acidi Fenolici	
Catechina	15.59	15.09	291	Catechine	
Epicatechina	18.60	18.02	291	Catechine	
Epicatechina-3-gallata	22.78	22.35	443	Catechine	
EGCG	20.90	20.50	459	Catechine	
South Indian Convenzionale					
Composto	Tempo di Ritenzione UV	Tempo di Ritenzione Massa	[M-H] <sup>+</sup>	Metodo	
Acido gallico	12.97	11.77	171	Acidi Fenolici	
Caffeina	15.03	14.53	195	Catechine	
Quercetina	24.50/25.39	24/25.22	303	Acidi Fenolici	
Quercetina-3-glucoside	25.33	24.83	465	Acidi Fenolici	
Canferolo	26.50/30.76	26.07/30.20	287	Acidi Fenolici	
Teobromina	19.58	19.25	181	Acidi Fenolici	
Catechina	15.69	15.19	291	Catechine	
Epicatechina	18.50	18.02	291	Catechine	
EGCG	20.90	20.40	459	Catechine	

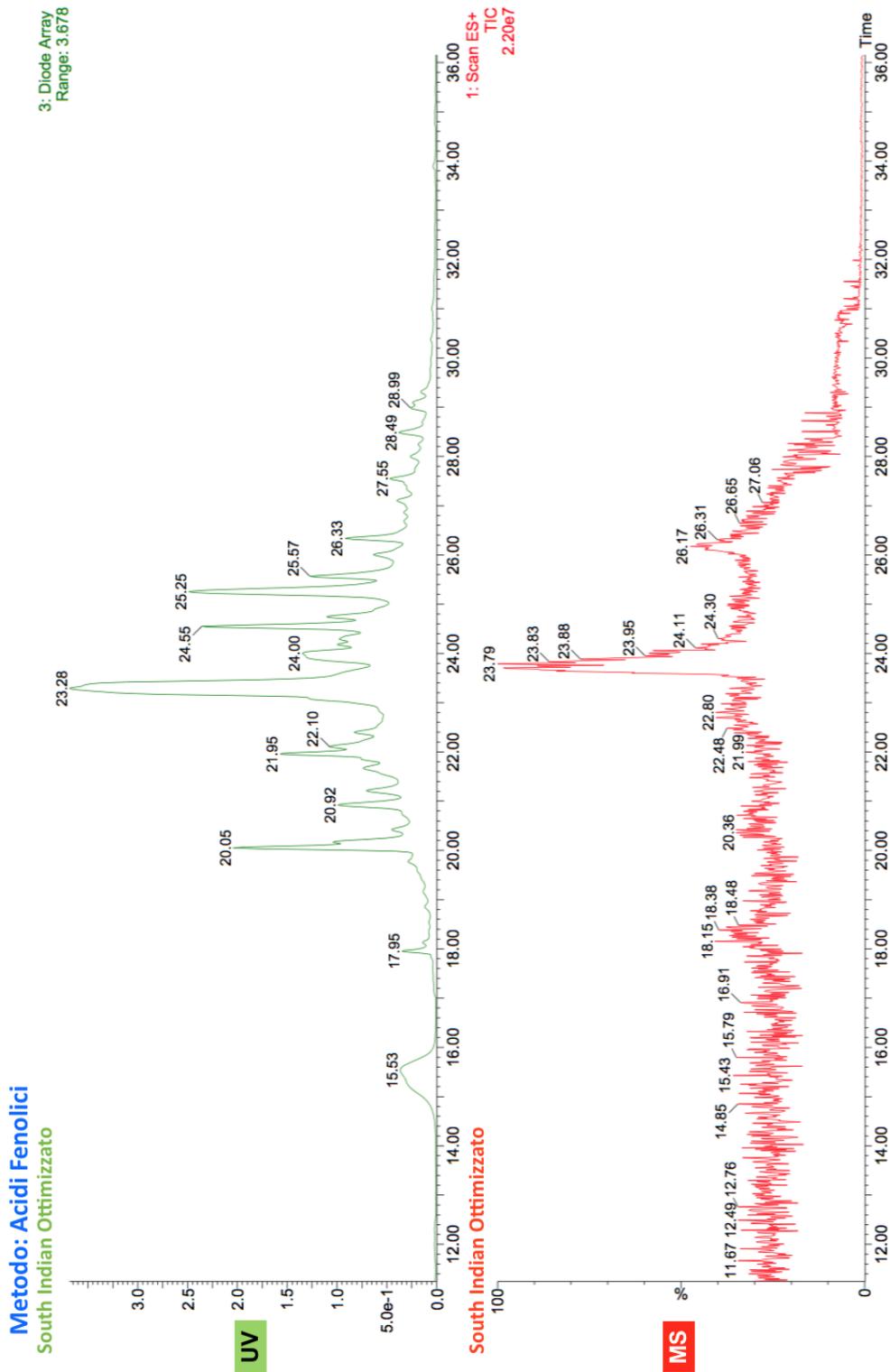


Figura 3.14: South Indian Ottimizzato, Metodo Acidi Fenolici

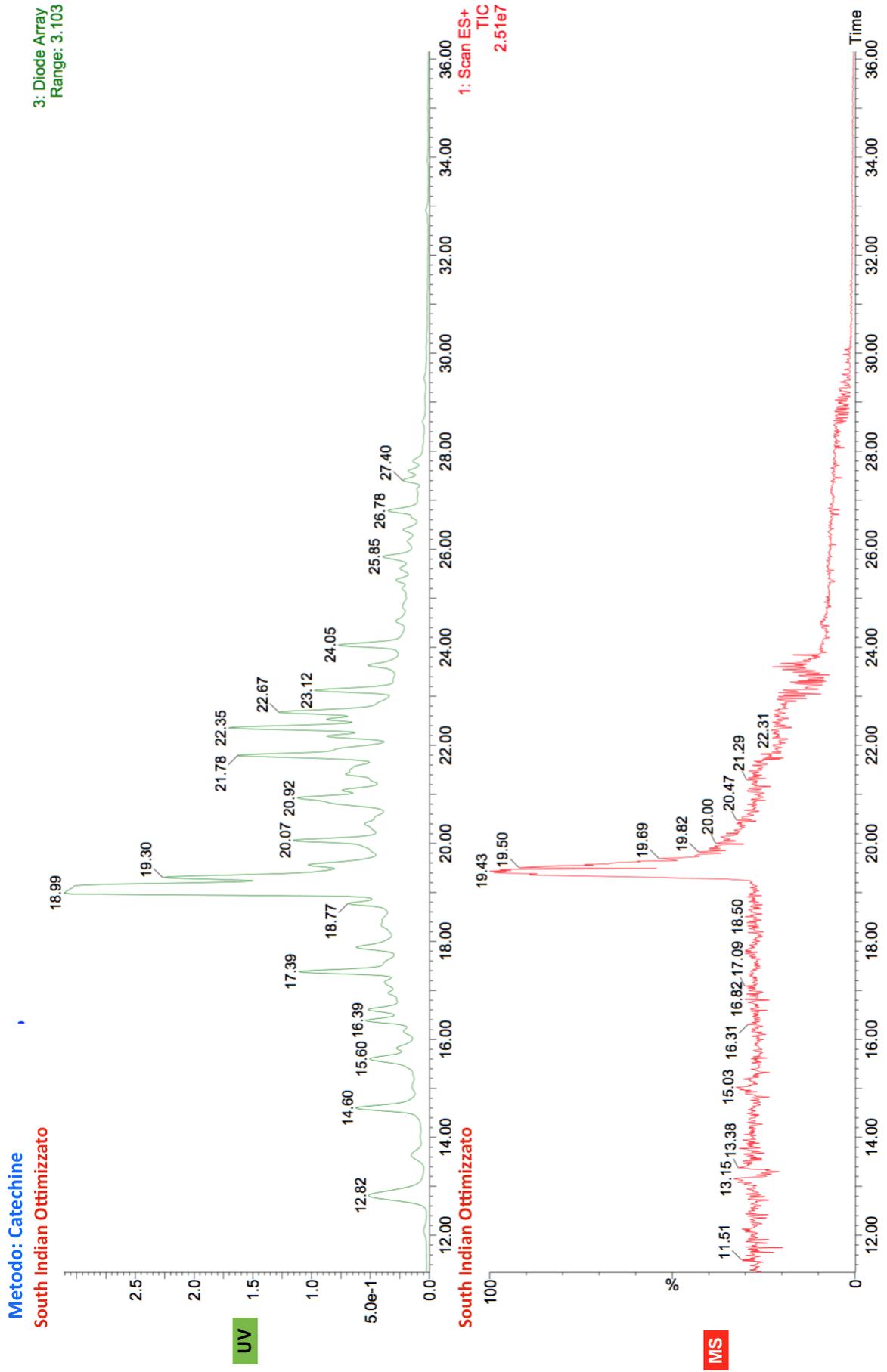


Figura 3.15: South Indian Ottimizzato, Metodo Catechine

**Metodo Acidi Fenolici**  
**South Indian Convenzionale**

3: Diode Array  
 Range: 3.565

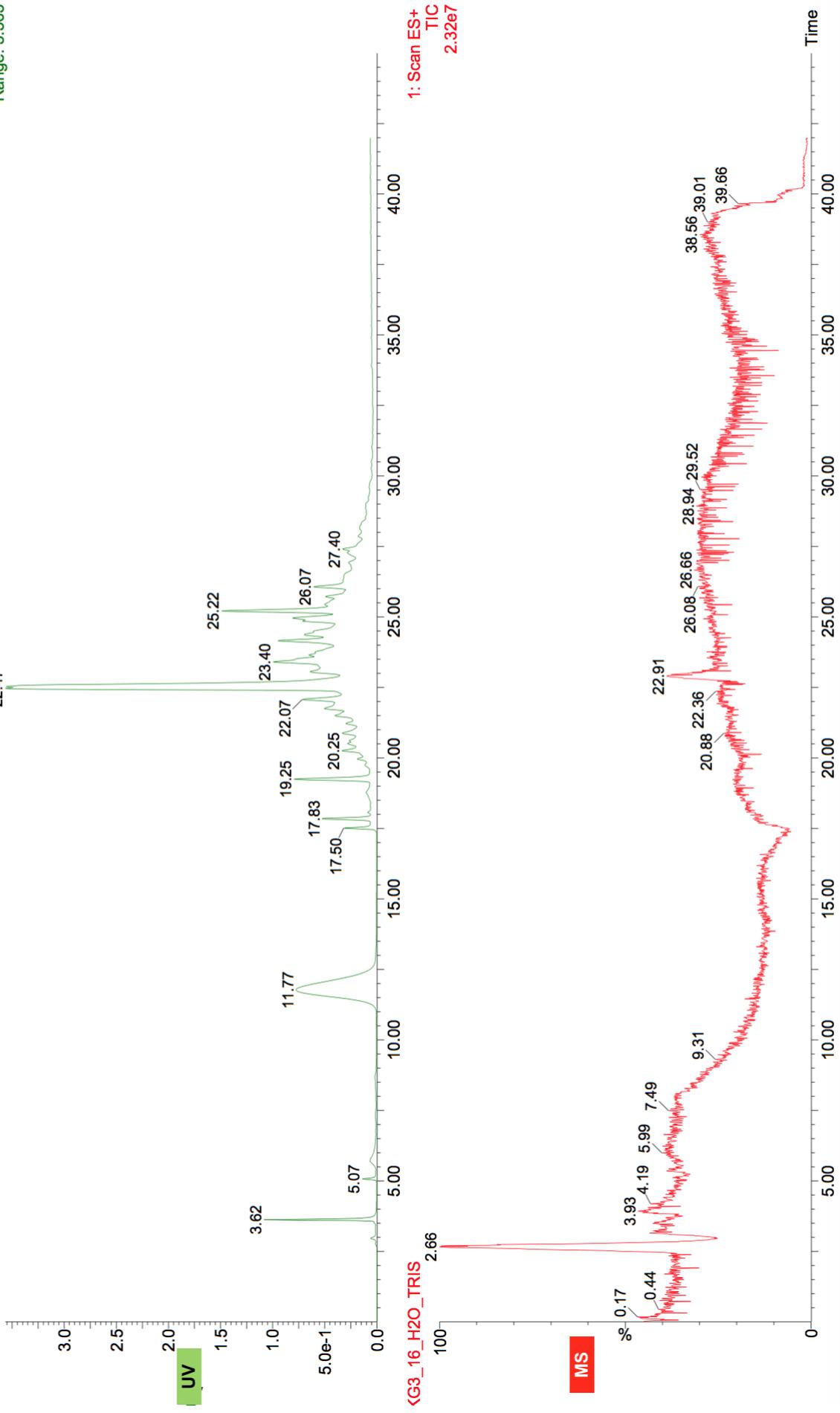


Figura 3.16: South Indian Convenzionale, Metodo Acidi Fenolici

Metodo: Catechine  
South Indian Convenzionale

3: Diode Array  
Range: 3.602

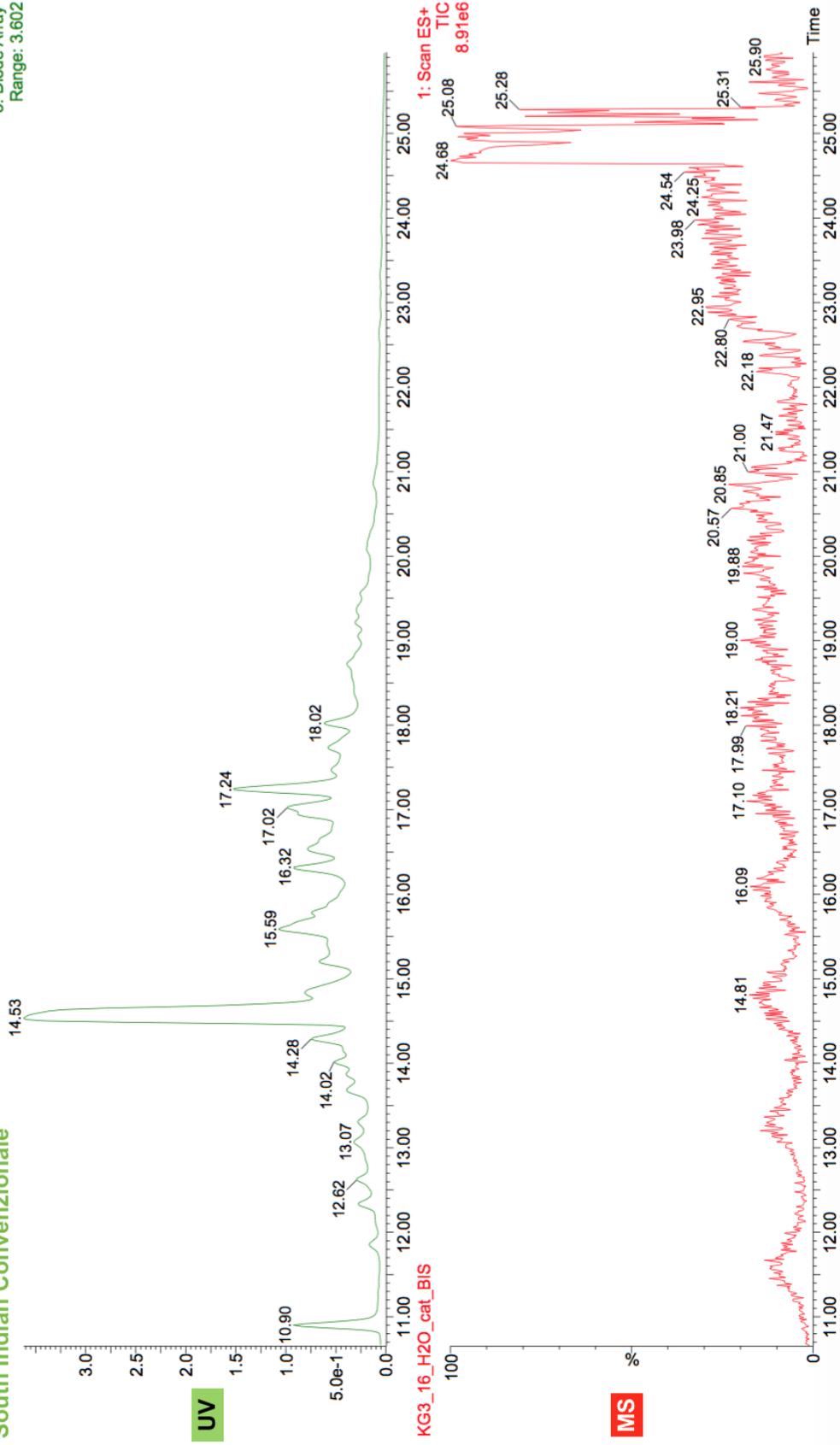


Figura 3.17: South Indian Convenzionale, Metodo Catechine

### 3.4.2 Analisi Quantitativa HPLC

Tramite l'analisi LC-MS si è riuscito ad identificare i composti grazie agli strumenti di ricerca diretta delle masse; tuttavia si è scelto di affiancare a questo sistema uno strumento analitico più adatto alla quantificazione, in grado di lavorare e registrare concentrazioni anche molto ridotte.

L'HPLC-DAD, difatti, riesce a lavorare a basse concentrazioni, restituendo per ogni picco ottenuto uno spettro di assorbanza tipico per componente o famiglia di composti.

La procedura analitica seguita ha previsto l'iniezione di ciascun campione secondo due metodi di eluizione differenti (2.5.1), in modo da poter differenziare in maniera efficiente le varie classi di composti in funzione delle relative affinità chimiche. Si è scelto di riferirsi ad ogni metodo attraverso il nome della famiglia di composti che meglio viene risolta (rispettivamente catechine ed acidi fenolici). I protocolli di analisi presumono una lunghezza d'onda tipica, nello specifico definita a 280 nm per 'Catechine' e a 340nm per 'Acidi fenolici'. Ciò nonostante si è deciso di registrare sempre gli spettri per entrambi i canali per completezza analitica. Sono stati riportati solamente i casi utilizzabili per fini quali-quantitativi. Questo poiché le tarature sono state elaborate alla lunghezza d'onda specifica per ogni metodo (v.d.2.5.1), tornando poi utili per la quantificazione degli estratti.

Per ogni analisi effettuata si nota come i cromatogrammi svolti con il metodo Catechine risultino più chiari e con minor rumore di fondo, mentre tramite il metodo Acidi Fenolici si ottenga una linea di base con andamento meno lineare, in particolare modo tra i minuti 22 e 32. Si è supposto che questo andamento possa essere ascrivito alla presenza di dimeri od oligomeri di catechine, come le procianidine. In questo caso il metodo analitico costruito per gli acidi, risulta avere una fase mobile meno adatta per l'eluizione di molecole così pesanti, mentre il metodo Catechine possiede una miglior affinità chimica verso di esse, portando a migliori risultati. Questa ipotesi è stata approfondita nel paragrafo (3.4.3).

La quantificazione è stata poi effettuata tramite la retta di taratura ottenuta dall'iniezione degli standard (v.d.2.5.1), la quale restituisce i parametri a e b utili ai calcoli. Nelle equazioni 3.5, 3.6 e 3.7 si riportano le procedure di calcolo seguite per quantificare i componenti presenti negli estratti.

$$C_{analita} = \frac{Area_{HPLC} - b}{a} \quad (3.5)$$

$$\%pp = \frac{C_{analita}}{C_{estratto}} \quad (3.6)$$

$$C_{analitasumatrice} = \frac{\%pp_{estratto} * peso_{EstrattoSecco}}{peso_{MatriceSecca}} \quad (3.7)$$

Tramite il confronto degli spettri di assorbimento con gli standard disponibili, vengono indicate per completezza anche molecole associate a famiglie di composti noti. Nel caso in cui esse siano state individuate nel metodo corretto, si è potuto procedere ad una quantificazione, dosando il componente in questione sul riferimento più simile. Nel caso invece in cui essi ricadessero al di fuori dal campo di quantificazione (ossia differiscono per lunghezza d'onda alla quale è stata effettuata

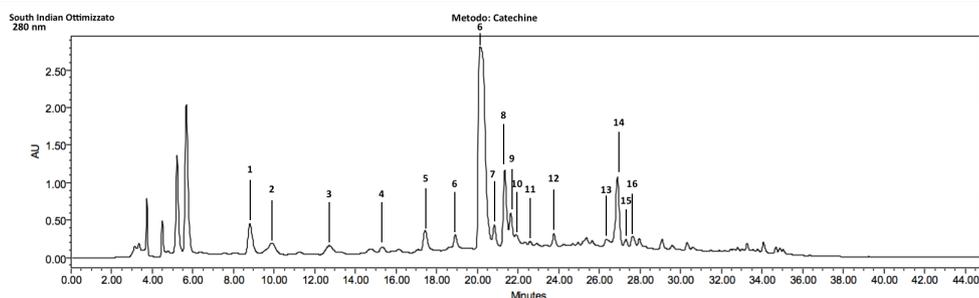
la misura, per metodo utilizzato o per entrambi), ci si è limitati all'identificazione. Il campione viene preparato in modo analogo a quanto fatto per l'analisi LC/MS, si riporta per completezza la tabella riguardante i parametri operativi .

Tabella 3.30: Parametri Operativi Campione HPLC/DAD

Componente	Peso	Unità di misura
Estratto	100	mg
Metanolo	1	mL
Acqua	1	mL

## South Indian Ottimizzato

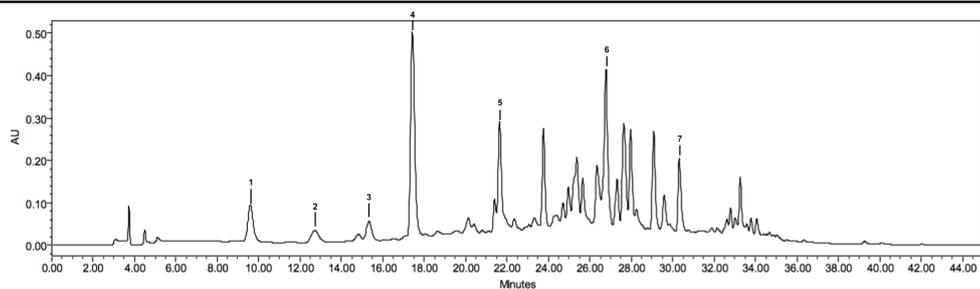
### Catechine 280 nm



No.	Composto	Tempo di ritenzione
1	Simil acido gallico	8.811
2	Gallocatechina	9.892
3	Simil Epigallocatechina-3-gallata	12.713
4	Simil acido paracumarico	15.326
5	Simil acido clorogenico	17.432
6	Epigallocatechina-3-gallata	18.913
7	Caffeina	20.116
8	Epicatechina	20.840
9	Epigallocatechina-3-gallata	21.347
10	Simil acido paracumarico	21.639
11	Simil Epigallocatechina-3-gallata	21.897
12	gallocatechina-3-gallata	22.591
13	Simil apigenina-7-glucoside	23.759
14	Simil Kaempferolo	26.344
15	Epicatechina-3-gallata	26.889
16	simil quercetina-3-glucoside	27.304
17	simil quercetina-3-glucoside	27.643

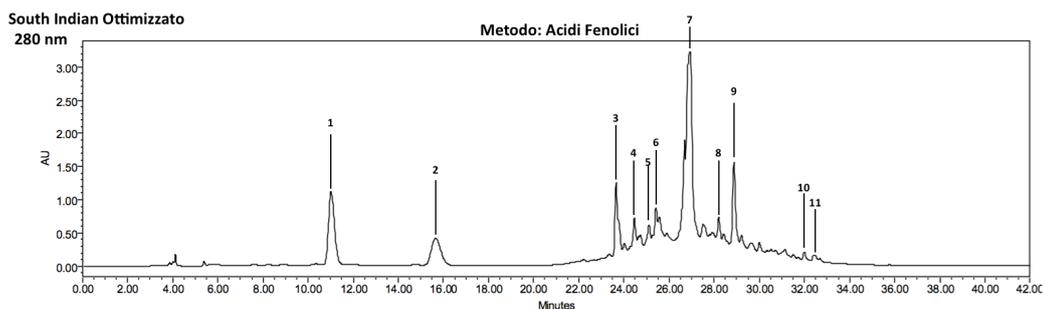
*Continua nella prossima pagina*

## Catechine 340 nm



No.	Composto	Tempo di ritenzione
1	Simil acido clorogenico	9.597
2	Simil epicatechina-3-gallata	12.714
3	Simil acido paracumarico	15.327
4	Simil acido clorogenico	17.430
5	Simil acido paracumarico	21.643
6	Simil Quercetina-3-glucoside	27.968
7	Simil apigenina-7-glucoside	30.323

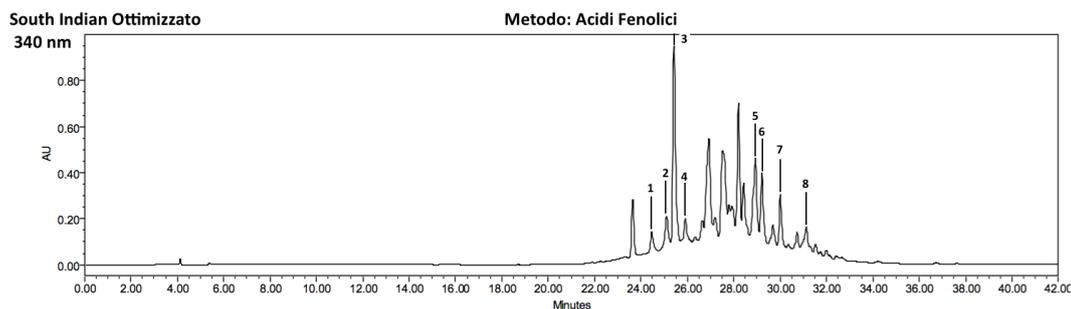
## Acidi fenolici 280 nm



No.	Composto	Tempo di ritenzione
1	Acido gallico	11.017
2	Simil acido gallico	15.665
3	Simil caffeina	23.653
4	simil catechina	24.462
5	Simil acido clorogenico	25.107
6	Simil acido paracumarico	25.421
7	Simil catechina-3-gallata	26.920
8	Simil quercetina	28.204
9	Simil quercetina-3-glucoside	28.873
10	Simil acido paracumarico	31.994
11	Simil acido paracumarico	32.419

*Continua nella prossima pagina*

## Acidi fenolici 340 nm



No.	Composto	Tempo di ritenzione
1	Simil catechina	24.463
2	Simil acido paracumarico	25.105
3	Acido clorogenico	25.421
4	Simil quercetina	25.910
5	Quercetina-3-glucoside	28.803
6	Simil Quercetina-3-glucoside	29.209
7	Simil apigenina-7-glucoside	30.006
8	Acido paracumarico	31.125

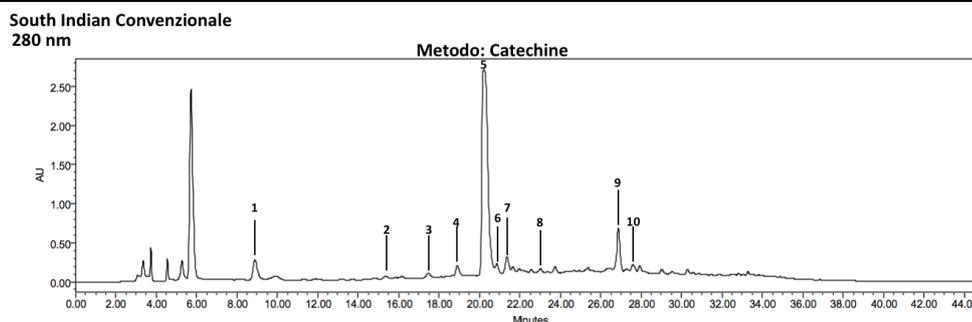
*Si conclude dalla pagina precedente*

Tabella 3.31: Quantificazione HPLC/DAD, South Indian Ottimizzato

Metodo HPLC		
South Indian Ottimizzato		
Composto	mg/gEstratto secco	Metodo
Epicatechina	1,6	Catechine
Epigallocatechina-3-gallata	0,73	Catechine
Epicatechina-3-gallata	1,81	Catechine
Gallocatechina-3-gallata	0,35	Catechine
Gallocatechina	4,85	Catechine
Acido gallico	1,84	Acidi Fenolici
Simil Acido gallico	0,06	Acidi Fenolici
Acido clorogenico	0,82	Acidi Fenolici
Acido paracumarico	1,32	Acidi Fenolici
Simil Acido paracumarico	0,46	Acidi Fenolici
Caffeina	10,02	Catechine
Quercetina-3-glucoside	1,02	Acidi Fenolici
Simil Quercetina-3-glucoside	1,08	Acidi Fenolici

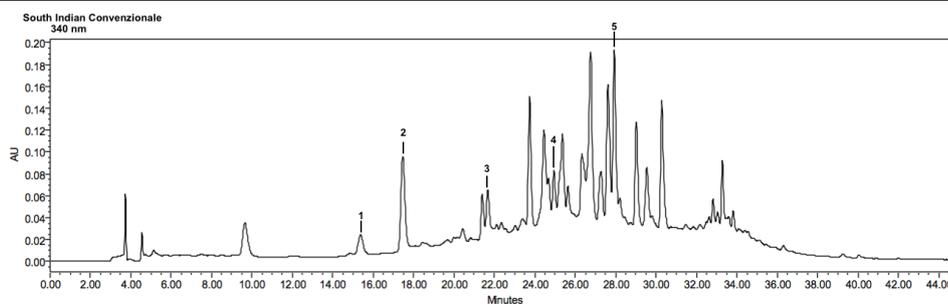
# South Indian Convenzionale

## Catechine 280 nm



No.	Composto	Tempo di ritenzione
1	Simil catechina	9.922
2	Simil acido paracumarico	15.36
3	Simil acido clorogenico	17.468
4	Epigallocatechina-3-gallata	18.901
5	Caffeina	20.210
6	Epicatechina	20.861
7	Gallocatechina	21.369
8	gallocatechina-3-gallata	23.021
9	Epicatechina-3-gallata	26.867
10	simil quercetina-3-glucoside	27.904

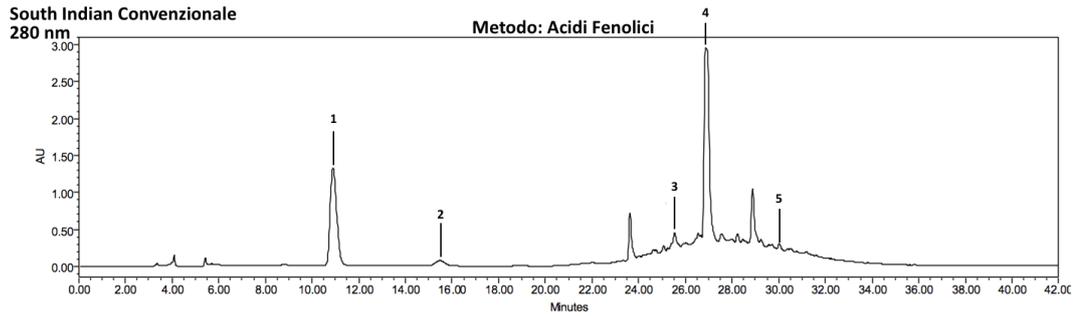
## Catechine 340 nm



No.	Composto	Tempo di ritenzione
1	Simil acido paracumarico	15.367
2	Simil acido clorogenico	17.465
3	Epigallocatechina-3-gallata	21.406
4	Simil quercetina-3-glucoside	24.944
5	Simil quercetina-3-glucoside	27.930

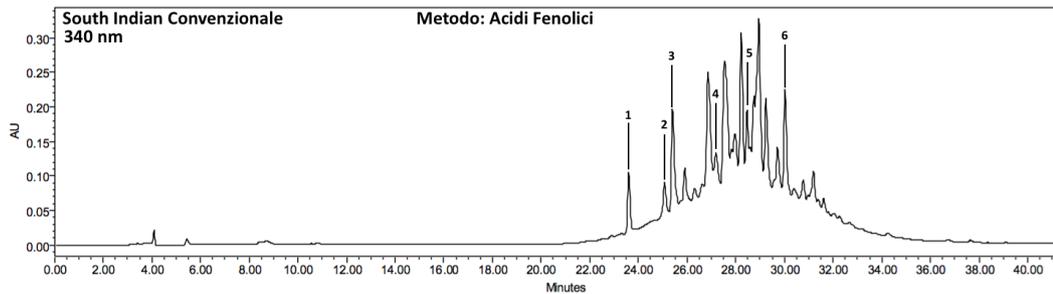
*Continua nella prossima pagina*

## Acidi fenolici 280 nm



No.	Composto	Tempo di ritenzione
1	Acido gallico	10.895
2	Simil acido gallico	15.484
3	Simil catechina	25.536
4	simil caffeina	26.894
5	Simil quercetina-3-glucoside	28.879

## Acidi fenolici 340 nm



No.	Composto	Tempo di ritenzione
1	Simil caffeina	23.601
2	Simil acido paracumarico	25.071
3	Acido clorogenico	25.906
4	Simil caffeina	27.550
5	Quercetina-3-glucoside	28.950
6	Simil Quercetina-3-glucoside	30.027

*Si conclude dalla pagina precedente*

Confrontando le analisi delle due diverse matrici, si può osservare come il prodotto UAE sia molto più caratterizzabile rispetto a quello convenzionale, infatti sono stati riconosciuti nell'estrazione classica la metà dei composti classificati invece nell'estrazione ottimizzata. Questa differenza si riflette nelle relative quantificazioni ottenute, ovvero procedendo con una quantificazione approfondita si ottengono valori relativi di mg/g<sub>Estratto secco</sub> molto più elevati nell'estrazione US rispetto all'estrazione convenzionale, sia per quanto riguarda le catechine che gli acidi fenolici. Ciò avviene nonostante l'estrazione ottimizzata presenti un TPC pari a quasi metà

Tabella 3.32: Quantificazione HPLC/DAD South Indian Convenzionale

Metodo HPLC		
South Indian Convenzionale		
Composto	mg/gEstratto secco	Metodo
Epicatechina	0,61	Catechine
simil Catechina	0,46	Catechine
Epigallocatechina-3-gallata	0,37	Catechine
Simil Epigallocatechina-3-gallata	0,34	Catechine
Gallocatechina-3-gallata	0,17	Catechine
Epicatechina-3-gallata	0,86	Catechine
Gallocatechina	3,29	Catechine
Acido gallico	2,21	Acidi Fenolici
Simil Acido gallico	0,18	Acidi Fenolici
Acido clorogenico	0,14	Acidi Fenolici
Acido paracumarico	0,19	Acidi Fenolici
Caffeina	4,81	Catechine
Quercetina-3-glucoside	0,53	Acidi Fenolici

della quantificazione in convenzionale. Questo può essere ascrivibile a processi di epimerizzazione e degradazione (i.e. deglicosilazione) dei composti ad alte temperature (come ad esempio può accadere per i composti glucosidici), che modificano la natura dell'estratto polifenolico e ne complicano la composizione. Ciò conferma che per le tecnologie UAE si riescono ad identificare quasi in toto i componenti estratti, ottenendo un profilo polifenolico esatto, mentre l'estrazione in acqua a ricadere resta scarsamente identificata.

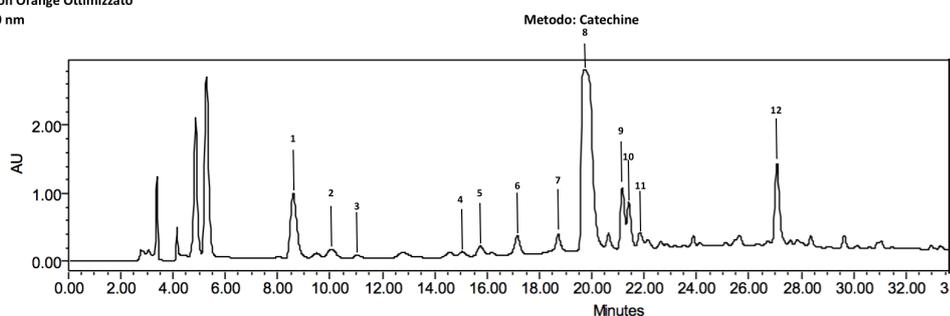
### Ceylon Orange

Si è applicata la medesima procedura del taglio tisana (*South Indian*) anche sui campioni ottenuti dall'estrazione dello scarto di produzione industriale (*Ceylon Orange*), utilizzando i medesimi metodi e lunghezze d'onda per i passaggi qualitativi.

# Ceylon Orange Ottimizzato

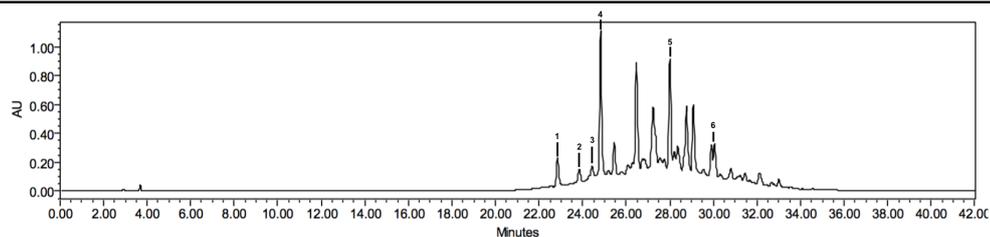
## Catechine 280nm

Ceylon Orange Ottimizzato  
280 nm



No.	Composto	Tempo di ritenzione
1	Simil caffeina	8,894
2	Gallocatechina	10.044
3	Simil acido gallico	11.038
4	Simil acido paracumarico	15.050
5	Catechina	15.745
6	simil acido clorogenico	17.105
7	simil catechina	18.718
8	Caffeina	19.728
9	Epicatechina	20.637
10	Epigallocatechina-3-gallata	21.168
11	gallocatechina-3-gallata	21.839
12	Epicatechina-3-gallata	27.071

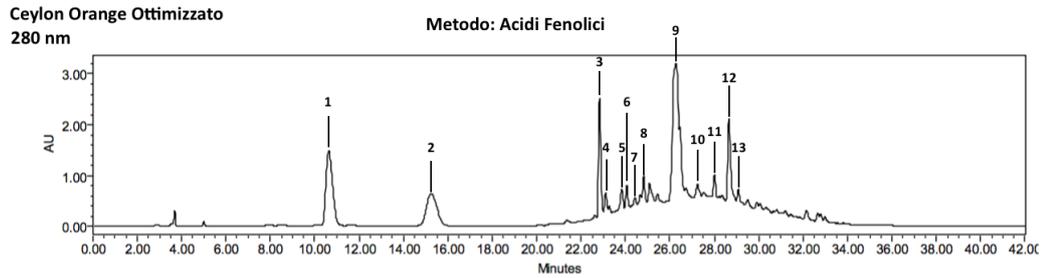
## Catechine 340 nm



No.	Composto	Tempo di ritenzione
1	Simil acido gallico	22.844
2	Simil gallocatechina	23.832
3	Simil acido paracumarico	24.431
4	Simil acido clorogenico	24.818
5	Simil quercetina	28.000
6	Simil quercetina	30.051

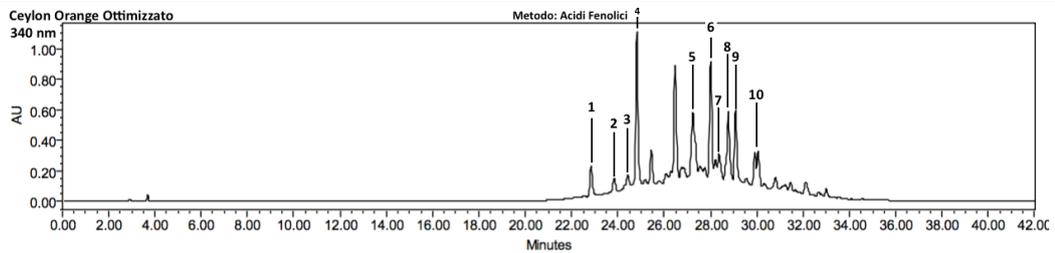
*Continua nella prossima pagina*

## Acidi fenolici 280 nm



No.	Composto	Tempo di ritenzione
1	Acido gallico	10,621
2	Simil acido gallico	15.251
3	simil epigallocatechina-3-gallata	22.832
4	simil epigallocatechina-3-gallata	23.108
5	simil epigallocatechina-3-gallata	23.825
6	Simil epicatechina-3-gallata	24.057
7	Simil acido clorogenico	24.818
8	Simil gallocatechina-3-gallata	25.089
9	Simil catechina-3-gallata	26.188
10	Simil acido caffeico	27.237
11	Kaempferolo	28.000
12	Simil caffeina	28.654
13	Simil quercetina	29.080

## Acidi fenolici 340 nm



Composto	mg/gmatrice estratta	Metodo
1	Simil caffeina	22,844
2	Simil Epicatechina	23.832
3	Acido paracumarico	24.431
4	Acido clorogenico	24.828
5	Simil quercetina	27.237
6	Simil acido caffeoilchinico	28.361
7	Quercetina-3-glucoside	28.766
9	Kaempferolo	29.082
10	Simil quercetina	30.50

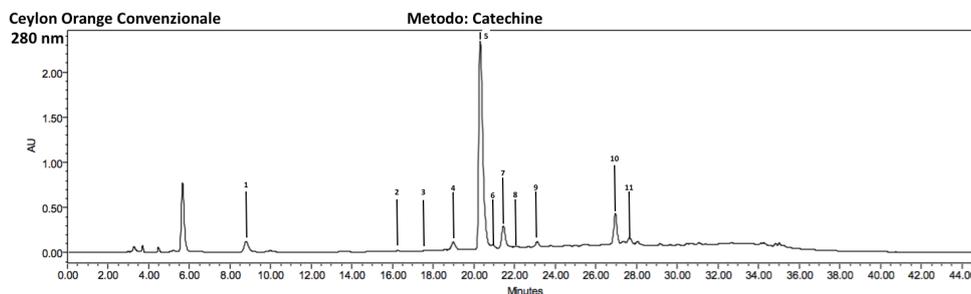
*Si conclude dalla pagina precedente*

Tabella 3.33: Quantificazione HPLC/DAD Ceylon Orange Ottimizzato

Composto	mg/gEstratto secco	Metodo
Catechina	0,84	Catechine
Simil catechina	1,60	Catechine
Epicatechina	4,37	Catechine
Epigallocatechina-3-gallata	1,85	Catechine
Gallocatechina-3-gallata	0,68	Catechine
Epicatechina-3-gallata	2,13	Catechine
Gallocatechina	3	Catechine
Acido gallico	1,83	Acidi Fenolici
Simil acido gallico	2,58	Acidi Fenolici
Acido paracumarico	2,58	Acidi Fenolici
Acido clorogenico	0,94	Acidi Fenolici
Simil acido clorogenico	0,18	Acidi Fenolici
Simil acido caffeico	0,54	Acidi Fenolici
Caffeina	6,69	Catechine
Quercetina-3-glucoside	0,83	Acidi Fenolici

## Ceylon Orange Convenzionale

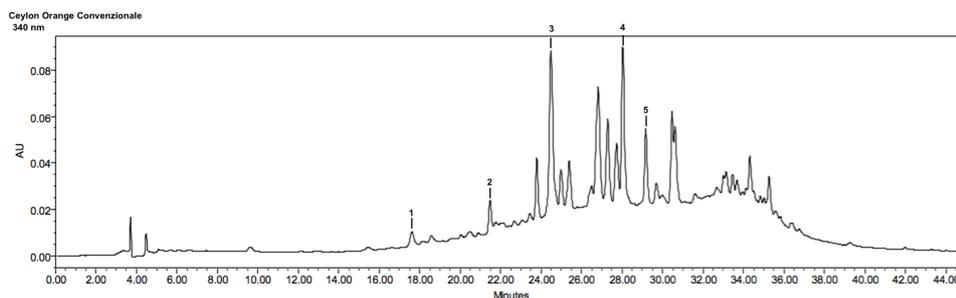
### Catechine 280 nm



No.	Composto	Tempo di ritenzione
1	Gallocatechina	9.903
2	Catechina	16.270
3	simil acido clorogenico	17.625
4	simil epigallocatechina	18.985
5	Caffeina	20.312
6	Epicatechina	20.936
7	Epigallocatechina-3-gallata	21.451
8	Simil Epigallocatechina-3-gallata	22.074
9	gallocatechina-3-gallata	23.117
10	Epicatechina-3-gallata	26.955
11	Simil quercetina	28.000

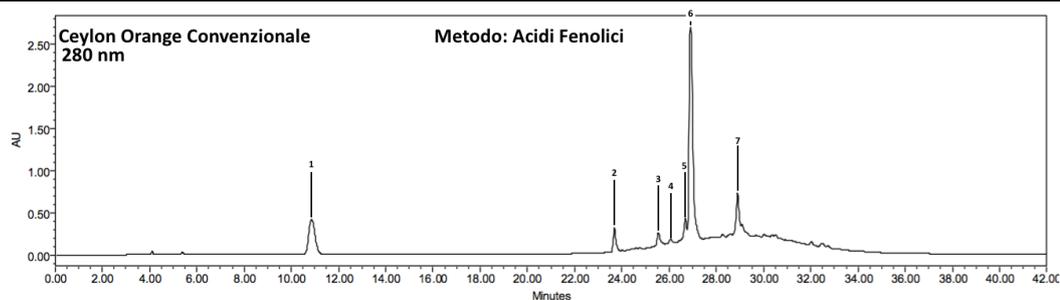
*Continua nella prossima pagina*

## Catechine 340 nm



No.	Composto	Tempo di ritenzione
1	simil acido clorogenico	17.611
2	Simil epigallocatechina-3-gallata	21.476
3	Simil acido paracumarico	24.493
4	Simil quercetina-3-glucoside	28.040
5	Simil quercetina-3-glucoside	29.166

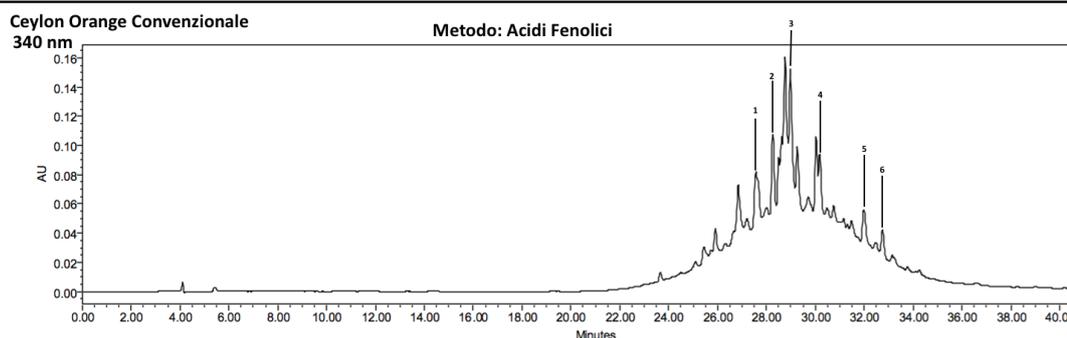
## Acidi fenolici 280 nm



No.	Composto	Tempo di ritenzione
1	Acido gallico	10,860
2	Caffeina	23.683
3	simil epigallocatechina-3-gallata	25.547
4	simil epigallocatechina-3-gallata	26.055
5	Simil epicatechina-3-gallata	26.689
6	Simil caffeina	26.909
7	Simil epicatechina-3-gallata	28.900

*Continua nella prossima pagina*

## Acidi fenolici 340 nm



Composto	mg/gmatrice estratta	Metodo
1	Simil Quercetina-3-glucoside	27.572
2	Acido clorogenico	28.759
3	Quercetina-3-glucoside	28.932
4	Kaempferolo	30.178
5	Simil acido veratrico	31.986
6	Simil acido paracumarico	32.750

*Si conclude dalla pagina precedente*

Tabella 3.34: Quantificazione HPLC/DAD Ceylon Orange Convenzionale

Metodo HPLC		
Ceylon Orange Convenzionale		
Catechina	0,03	Catechine
Epicatechina	0,15	Catechine
Epigallocatechina-3-gallata	0,56	Catechine
Simil Epigallocatechina-3-gallata	0,05	Catechine
Gallocatechina-3-gallata	0,03	Catechine
Epicatechina-3-gallata	0,56	Catechine
Gallocatechina	0,27	Catechine
Acido gallico	0,66	Acidi Fenolici
Acido paracumarico	0,05	Acidi Fenolici
Caffeina	2,91	Catechine
Quercetina-3-glucoside	0,22	Acidi Fenolici
Simil Quercetina-3-glucoside	0,13	Acidi Fenolici
Acido Veratrico	0,13	Acidi Fenolici

Per la matrice presentata come scarto da produzione industriale vale quanto detto precedentemente, ossia si riescono a riconoscere molte più componenti per l'estrazione ottimizzata che per la convenzionale. Il risultato ottenuto rivela la bontà dell'ottimizzazione effettuata, ottenendo un estratto ampiamente caratterizzato e con una elevata selettività per i composti catechinici. Nella fase di quantificazione inoltre, si è dedotto che questa matrice presenta valori superiori rispetto al taglio

tisana sia per quanto riguarda le catechine che per gli acidi fenolici. Si è stimato infatti di riuscire ad estrarre il 35% di catechine in più, ed il 43% di acidi fenolici in più, a fronte di una quantificazione totale che differiva del solo 15%. Si conferma così un'ottima matrice di partenza, adatta per la successiva intensificazione di processo in US.

### Ceylon Orange

Essendo la matrice di scarto di forte interesse per applicazioni industriali, in chiave di processo e valorizzazione sostenibile, oltre che di costo di materiale, si è ritenuto necessario effettuare analisi più approfondite. Tramite analisi adeguate (LC-MS/MS) si può inoltre spiegare l'andamento dei tracciati HPLC-DAD (presenza procianidine) ed una quantificazione di polifenoli, parallela al TPC, in grado di restituire una resa in soli flavonoidi. Un dato chiave per l'impiego dell'estratto polifenolico inoltre, è il potere antiossidante (ORAC e DPPH), indice dell'attività del prodotto finale. Per meglio caratterizzare il processo estrattivo, i campioni analizzati sono stati rispettivamente:

- Quantificazione convenzionale in acqua
- Estratto ottimizzato UAE in *cup-horn* (1 step, 45')
- Estratto ottenuto da step finale *cross-flow* (L5)
- Estratto MIX, ricostruito unendo tutte le correnti di estrazione *cross-flow*

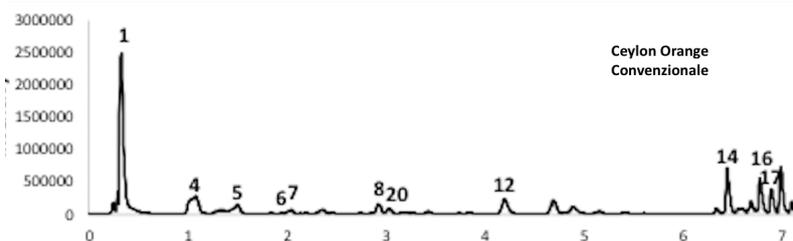
#### 3.4.3 Analisi Qualitativa LC-MS/MS - Institute of Wood Chemistry (IWC, Lettonia), Prof. Telysheva, G.

È stato sfruttato il frazionamento MS/MS del *detector* per identificare i composti presenti tramite i profili di frammentazione noti in letteratura. I componenti rilevati con relativi tempi di ritenzione e masse vengono riportati in (Appendice TabellaC.1). Di seguito i cromatogrammi con relative assegnazioni.

Dai dati raccolti si può innanzitutto confermare la presenza di dimeri di procianidine, le quali spiegherebbero l'andamento della linea di base per il metodo Acidi Fenolici utilizzato nelle analisi HPLC-DAD. Nel complesso questa caratterizzazione permette di affermare che il mix polifenolico risulti avere la composizione più interessante. Contiene difatti tutti i componenti presenti negli altri estratti analizzati, con l'aggiunta dell'acido caffeico, il quale evidentemente in concentrazione troppo bassa per essere individuato nei singoli estratti, viene arricchito nei passaggi sequenziali. Si può inoltre sottolineare il ruolo delle UAE osservando la presenza solo nei relativi estratti di composti dall'elevato valore aggiunto, quali:

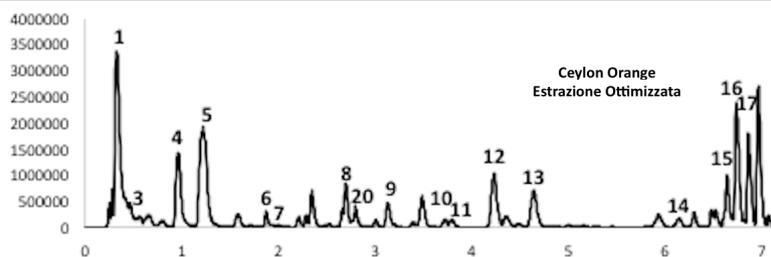
- acido caffeoilchinico;
- acido cumaroilchinico;
- epigallocatechina-3-gallata;
- vitexina-O-glucoside.

### Estrazione Convenzionale



Picco No	Composto
1	Acido quinico
4	Acido Gallico
5	Acido galloil chinico / epossinico
6	Epigallocatechina
7	(Epi)gallocatechin-O-gallata
8	Dimero derivato da procianidina
12	Derivati catechina
14	(Epi)catechina-3-O-gallata
16	Rutina
17	Canferol-3-O-glucoside-7-ramnoside
18	Catechina

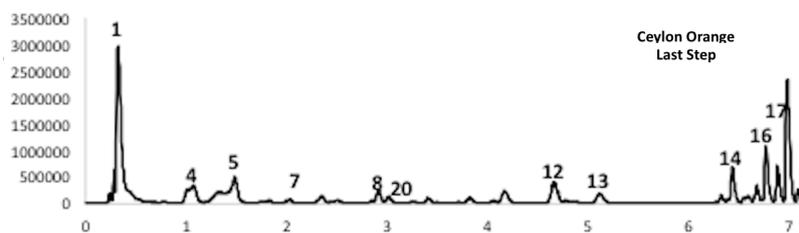
### Estrazione Ottimizzata in Cup-Horn



Picco No	Composto
1	Acido quinico
3	Acido caffeoilchinico
4	Acido Gallico
5	Acido galloil chinico / epossinico
6	Epigallocatechina
7	(Epi)gallocatechin-O-gallata
8	Dimero derivato da procianidina
9	Acido caffeoilchinico
10	Acido cumaroilchinico
11	Epigallocatechina-3-gallata
12	Derivati catechina
13	Isomero acido cumaroilchinico
14	(Epi)catechina-3-O-gallata
15	Vitexin-O-glucoside
16	Rutina
17	Canferol-3-O-glucoside-7-ramnoside
18	g7Catechina

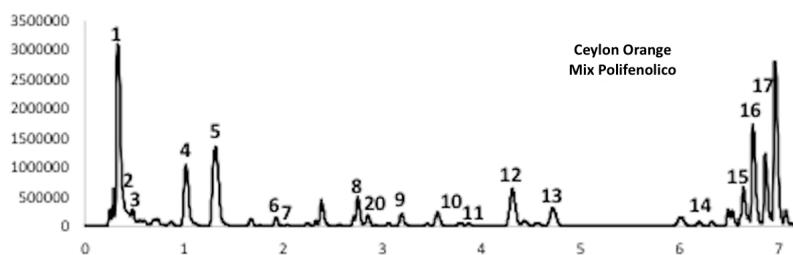
Tabella 3.35: Identificazione Composti tramite LC-ESI(-)-MS

Ultimo Step Estrattivo



Picco No	Composto
1	Acido quinico
4	Acido Gallico
5	Acido galloil chinico / epossinico
6	Epigallocatechina
7	(Epi)gallocatechin-O-gallata
8	Dimero derivato da procianidina
12	Derivati catechina
14	(Epi)catechina-3-O-gallata
16	Rutina
17	Canferol-3-O-glucoside-7-ramnoside
18	Catechina

Mix Polifenolico



Picco No	Composto
1	Acido quinico
2	Acido caffeico
3	Acido caffeoilchinico
4	Acido Gallico
5	Acido galloil chinico / epossinico
6	Epigallocatechina
7	(Epi)gallocatechin-O-gallata
8	Dimero derivato da procianidina
9	Acido caffeoilchinico
10	Acido cumaroilchinico
11	Epigallocatechina-3-gallata
12	Derivati catechina
13	Isomero acido cumaroilchinico
14	(Epi)catechina-3-O-gallata
15	Vitexin-O-glucoside
16	Rutina
17	Canferol-3-O-glucoside-7-ramnoside
18	<sup>98</sup> Catechina

Tabella 3.36: Identificazione Composti tramite LC-ESI(-)-MS

### 3.4.4 Quantificazione contenuto Flavonoidi - Institute of Wood Chemistry (IWC, Lettonia), Prof. Telysheva, G.

Tramite il metodo riportato in (2.5.2), è possibile avere una quantificazione dei flavonoidi, classe di composti a cui appartengono le catechine. Questo dato può essere utilizzato in modo complementare insieme al contenuto in TPC, che invece esprime tutte le specie polifenoliche presenti nell'estratto.

Tabella 3.37: Quantificazione Flavonoidi

Campione	Contenuto Totale (mg <sub>rutina</sub> /g <sub>estratto</sub> ).
Convenzionale	27,74
US - Ottimizzato	21,17
US - last step	30,92
Mix polifenolico totale	32,95

La quantificazione dell'estrazione ottimizzata risulta positiva, poiché presenta un contenuto di flavonoidi inferiore di solo il 24% ca. rispetto alla prova in convenzionale; inoltre il mix polifenolico si conferma come l'estratto più performante, mostrando un valore di flavonoidi che supera del 20% la quantitativa in acqua a ricadere. Infine, guardando il risultato dell'ultimo step di estrazione è ipotizzabile come nei primi step vengano rimosse le frazioni organiche diverse dai flavonoidi (i.e. zuccheri e fibre) contenuti nel tè, riuscendo man mano ad ottenere una maggiore selettività verso i flavonoidi.

### 3.4.5 Caratterizzazione delle proprietà antiossidanti - Institute of Wood Chemistry (IWC, Lettonia), Prof. Telysheva, G.

Come anticipato ad inizio paragrafo, il potere antiossidante gioca un ruolo chiave nella caratterizzazione di un prodotto polifenolico, soprattutto nel caso in cui si valuti un'applicazione nel campo della nutraceutica. Sono disponibili numerose tipologie di analisi che diano un ordine di grandezza dell'attività del prodotto.

Campione	ORAC (mmol <sub>TE</sub> )/(grammo)	Campione	DPPH - IC <sub>50</sub> (mg/L)
Convenzionale	4,44	Convenzionale	8,3
US-Ottimizzato	3,31	US-Ottimizzato	13,7
US-Last Step	5,87	US-Last Step	X
Mix polifenolico totale	3,92	Mix polifenolico totale	10,3

Tabella 3.38: Test ORAC

Tabella 3.39: Test DPPH

Per il metodo ORAC si esprimono i risultati in equivalente a Trolox (TE), (mmol per grammo di campione), ed il valore ottenuto sarà pertanto diret-

tamente proporzionale al potere antiossidante. Per il test DPPH invece i dati sono inversamente proporzionali ad esso, essendo espressi come  $IC_{50}$ . Si può notare come il mix polifenolico ottenuto tramite diversi stadi estrattivi si confermi come prodotto d'interesse, esibendo buoni risultati sia per il DPPH che per l'ORAC, decisamente migliore rispetto ad un unico step di estrazione UAE, e molto vicino ai valori presentati dalla convenzionale. Per quanto riguarda l'ultimo step dal solo test ORAC si può desumere come nuovamente si presenti lo stadio più selettivo di quelli effettuati, dimostrandosi come l'estratto a potere antiossidante più elevato. Purtroppo per motivi di quantità richieste non è stato possibile ottenere un dato con il DPPH per questo campione.

## Capitolo 4

# Scale-up Industriale

### 4.1 Process Description

Tabella 4.1: Caratteristiche impianto

Tipo Alimentazione: Tè nero		
Caratteristica	Valore	Unità di misura
Potenzialità impianto	1800	(ton/y)
Funzionamento impianto	12	mesi
Settimane	50	(w)
Giorni a settimana	5	(d/w)
Ore giornaliere	14	(h/d)
Turndown Ratio Min	0,6	
Turndown Ratio Max	1,10	
Alimentazione oraria	514,286	(kg/h)
Alimentazione Min	308,571	(kg/h)
Alimentazione Max	565,714	(kg/h)

Il processo descritto in seguito ha come scopo la valorizzazione degli scarti dell'industria del tè. Il capitolo seguente si occuperà di sviscerare la progettazione di una sezione industriale di estrazione in tutte le sue componenti. Il progetto si fonda sui dati da me ottenuti in laboratorio, prevedendone poi un serio impiego a livello industriale. L'impianto viene collocato in India nella regione di Assam, regione famosa per l'imponente produzione di tè nero indiano, una bevanda caratterizzata dal sapore deciso e speziato. Si è ipotizzato di dover costruire un impianto industriale in grado di trattare materia prima (i.e. tè nero) approvvigionata in un raggio di 20 km dal sito impiantistico. Tenuto quindi conto del raccolto statistico di tè nero in un raggio di 20 km di quella regione geografica si è stabilita la taglia dell'impianto industriale pari a 1.800 ton/y si è ipotizzato un *turndown ratio* che spaziasse dal 60% al 110% della potenzialità nominale. Il tè non presenta una lavorazione stagionale, risulta

ragionevole quindi ipotizzare un funzionamento dell'impianto durante tutto l'anno, prevedendo comunque una sezione di essiccamento della matrice per evitare eventuali fenomeni di decomposizione, trattandosi pur sempre di materiale organico. Le caratteristiche dell'impianto vengono poi riportate nella tabella 4.1. Si lavora quindi per un totale di 3500 ore annue, ed una portata post essiccamento di  $0,47 \text{ ton/h}$ .

#### 4.1.1 Caratterizzazione della Matrice

La matrice che si è scelto di utilizzare come biomassa target per la progettazione dell'impianto si presenta come scarto industriale, avente dimensione media inferiore ai  $200 \mu\text{m}$ . La composizione chimica della matrice, che è la stessa entrante alla sezione di essiccamento dell'impianto (non sviluppata in questo lavoro) è visibile in Tabella 4.2. La parte fenolica viene divisa dalla quotaparte organica in modo tale che risulti ben visibile la potenzialità della matrice d'interesse.

Tabella 4.2: Composizione Matrice

Tè nero	
Composto	Valore %
Umidità	10,3
Organico	66,7
Polifenoli	17,2
Ceneri	5,8

#### 4.1.2 Panoramica Impianto

La progettazione dell'impianto è riferita alla sola sezione di estrazione poiché le fasi di pretrattamento della matrice e di concentrazione del prodotto non sono state sviluppate durante il periodo di attività sperimentale diretta. non sono qui progettate. Nell'eventualità in cui si passasse ad una realizzazione industriale dell'impianto proposto dovrebbero essere previste e progettate.

Il prodotto di nostro interesse è un *mix* di polifenoli, i quali non solo hanno un elevato valore aggiunto per le attività benefiche nella prevenzione di diverse patologie umane, o come intermedi per l'industria cosmetica ed alimentare; ma se non valorizzati devono essere smaltiti in modo tale che non rappresentino dei fattori di rischio per l'ambiente, vista la loro attività antiossidante ed inibitoria dell'attività batterica. Nell'ottica di un processo *green* si è scelto come solvente l'acqua, la quale non solo è facilmente reperibile, ma fa sì che si abbattano i costi sia di post trattamento delle acque di scarto, che di purificazione del prodotto finale. Non di minore importanza risulta essere la competitività del processo dal punto di vista industriale, motivo per cui si è scelto di puntare sulla tecnologia delle estrazioni assistite da ultrasuoni, le

quali portano a notevoli aumenti delle rese finali ottenute.

Il mix polifenolico ottenuto è così composto (Tabella4.3):

Tabella 4.3: Prodotto Mix Polifenolico

Prodotto Mix Polifenolico	
Composto	Composizione %
Acido Gallico	11.71
Teobromina	20.40
Caffeina	23.91
Quercetina-3-glucoside	25.34
Quercetina	26.26/31.75
Kaempferolo	27.20/34.89
Catechina	18.58
Epicatechina	20.63
EGCG	20.90
EC-3-Gallata	23.76
Acido Galloilchinico	17.37
Vitexina-O-glucoside	24.78

Si conclude stimando una produzione di:

Prodotto Fenolico	<b>0,045</b>	ton/h
Recupero Polifenoli	<b>56</b>	%

### Consumi Specifici

L'assenza di solventi di natura alcolica permette di ridurre i consumi delle utilities presenti nella sezione di estrazione alle sole energia elettrica ed acqua di rete (utile ai filtri a tamburo rotante). Per quanto concerne i consumi specifici si è diviso il valore del consumo orario per le tonnellate orarie di prodotto ottenute. In Tabella4.4 se ne riportano i valori finali. Si tiene a riportare comunque la necessità di aria compressa nella sezione di pretrattamento, atta ad assicurare un buon essiccamento della matrice.

Si procede quindi con il calcolo del consumo annuo delle utilities (Tabella4.5).

Una volta ottenuti i consumi della parte estrattiva si può procedere con il calcolo del costo annuo totale (Tabella4.6).

Tabella 4.4: Consumi Utilities

Utility	Consumo Orario	Unità di Misura	Consumo Specifico	Unità di Misura
Energia Elettrica	106	(kW*hr)	2,34E+03	(kW*h/ton)
Acqua di rete	9,21	(m <sup>3</sup> /h)	203,89	(m <sup>3</sup> /(h*ton))

Tabella 4.5: Consumi Annui Utilities

Utility	Consumo Annuo	Unità di Misura
Energia Elettrica	3,69E+05	(kW*h/y)
Acqua di rete	3,22E+04	(m <sup>3</sup> /y)

### 4.1.3 Sezione di Estrazione

Punto chiave di questa sezione è la progettazione dell'estrattore. Si è fatto in modo che questo rispecchiasse il R.E.U.S.S. utilizzato in laboratorio, ossia sfruttando il fenomeno della cavitazione generata dagli ultrasuoni per macerare la parete cellulare della matrice, ed estrarne i componenti *target*. Durante lo svolgimento delle estrazioni è stato ipotizzato il raggiungimento dell'equilibrio solido/liquido, rendendo possibile il calcolo della costante di equilibrio  $K_{eq}$  tramite l'ausilio dei risultati ottenuti per l'estrazione ottimizzata.

$$K = \frac{Polifenoli_{liquido}}{Polifenoli_{solido}} \quad (4.1)$$

$$K_{eq} = 0,49$$

Alla luce dei risultati sperimentali e tenendo conto dei parametri fluidodinamici derivanti dalle estrazioni effettuate, si è risalito al numero di stadi necessari per poter ottimizzare al meglio la matrice a livello industriale. È stato possibile evidenziare come il solido non esaurisse il suo potenziale tramite due stadi, decisione avvalorata dal calcolo teorico del numero di stadi effettuato a diversi rapporti liquido/solido. In Figura 4.1 si può visualizzare il grafico ottenuto dal calcolo teorico del numero di stadi.

Sul grafico vengono evidenziate due zone:

- Zona di impraticabilità perenne (L/S pari a 7) dovuta alla mancata creazione della sospensione, non vi è una fase slurry ma solo solido bagnato;
- Zona di impraticabilità dovuta alle specifiche dell'apparecchiatura che s'intende utilizzare (L/S pari a 10).

Tabella 4.6: Costi Utilities

Utility	Costo Utilities	Unità di Misura	Costo annuo totale	Unità di Misura
Energia Elettrica	0,105	(€/kW*h)	38.792	(€/y)
Acqua di rete	0,98	(€/m <sup>3</sup> )	31.583	(€/y)
Costo Totale Utilities: <b>70.400 (ca.) €/y</b>				

Tabella 4.7: Calcolo della costante di equilibrio

K <sub>eq</sub>		
Polifenoli totali	138,2	mg/g
Polifenoli liquido	44,7	mg/g
Polifenoli solido	93,5	mg/g

Nella definizione dei parametri operativi si è tenuto conto delle due aree da evitare, scegliendo di mantenere il rapporto liquido/solido con il quale si è operato sperimentalmente in laboratorio, pari a 15. Questa scelta infatti rispetta i risultati esposti finora. I parametri operativi da mantenere durante la progettazione sono visibili in Tabella4.8.

Tabella 4.8: Parametri Operativi

Parametro	Valore
L/S	15
Num. di Stadi	3

Si sceglie quindi di procedere con un doppio stadio in controcorrente in modo tale da esaurire quasi totalmente la carica polifenolica propria della matrice. In entrambi gli stadi si è considerato il raggiungimento dell'equilibrio termodinamico. In uscita dal secondo stadio il liquido non può più essere arricchito, presentandosi come prodotto finale, mentre la fase solida possiede ancora un'elevata quantità di polifenoli che rende interessante il procedere ad un terzo stadio estrattivo, il quale si compone del solido esausto proveniente dalla sezione in controcorrente che incontra del solvente fresco. In modo tale da avere una chiara visione del processo in Figura4.2 si riporta uno schema a blocchi della sezione di estrazione.

La corrente solida *1* derivante dalla sezione di essiccamento viene inviata in un miscelatore **ST-101** nel quale incontra la corrente *38* di solvente esausto, in modo tale da massimizzare il contatto solido/liquido. La corrente *3* in fase slurry in uscita dal miscelatore viene mandata alla sezione di estrazione vera e propria tramite una pompa volumetrica **P-101**. L'estrazione è effet-

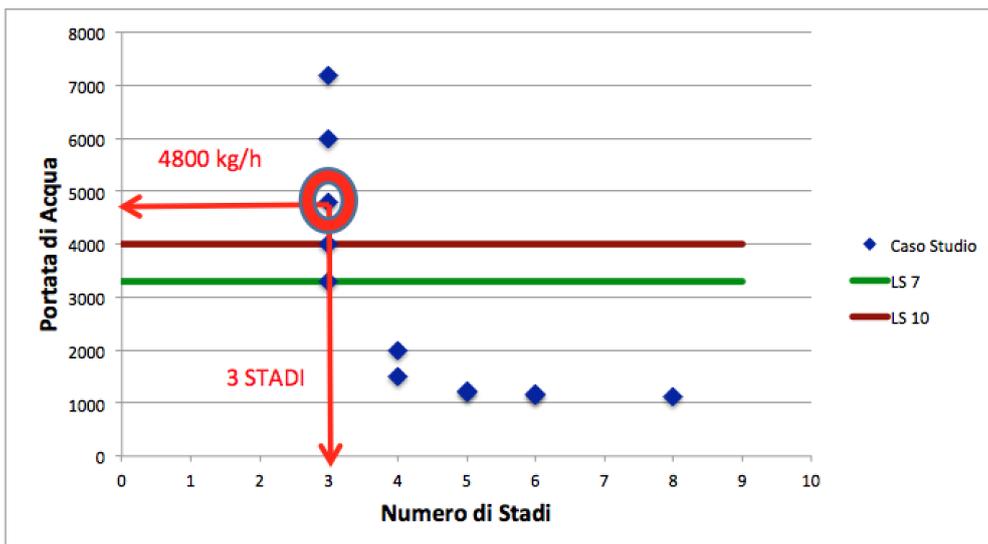


Figura 4.1: Numero di Stadi

tuata tramite un estrattore ultrasonico cavitazionale **UW-101** nel quale viene raggiunto l'equilibrio termodinamico, recuperando in fase liquida la componente polifenolica d'interesse. La corrente in uscita si sposta per gravità in un decanter **CS-101** atto alla separazione della fase solida dalla fase liquida. Effettuando un parallelismo con quanto fatto in laboratorio, si può dire che il decanter rappresenta la filtrazione sottovuoto effettuata per separare la fase liquida dalla fase solida nella quale era impregnata. Il decanter separa le due fasi tramite sedimentazione spontanea per differenza di densità, un motore pone in rotazione un albero che trasporta il solido in direzione assiale sino all'uscita posta sul basso; mentre la fase liquida esce dall'alto. Il solido esausto uscente da questo primo stadio viene inviato in un secondo miscelatore **ST-102** dove incontra del solvente fresco. Le fasi solide di ogni stadio vengono inviate ad una pressa **CP-201;CP-102** poichè ancora imbibite di liquido da valorizzare. In questo modo possono dirsi conclusi i due stadi in controcorrente.

La fase liquida in uscita da **CS-101** passa attraverso un filtro a tamburo rotante **RF-101** nel quale vengono eliminati gli ultimi residui solidi presenti. La corrente solida uscente viene considerata *solid waste*, mentre la corrente liquida viene movimentata tramite una pompa (e.g. per il primo stadio **P-103**) ed inviata in un tank di raccolta (**T-102**). La fase liquida in uscita dalla pressa va ad unirsi in un tank **T-103** alla corrente *16* uscente dalla filtrazione centrifuga (**CS-101**) e poi così inviate tramite pompa centrifuga **P-105** alla sezione di concentrazione del prodotto. La fase solida in uscita dalla pressa **CP-101** viene invece inviata tramite un nastro trasportatore **TB-101** ad un secondo miscelatore **ST-102**. Nel miscelatore il solido esausto incontra solvente fresco. Il secondo stadio prosegue identico al primo. Nuovamente, infatti, la fase solida derivante da **CP-102** viene spostata con nastro trasportatore **TB-102** ad un terzo miscelatore nel quale incontra liquido fresco, poichè possiede ancora

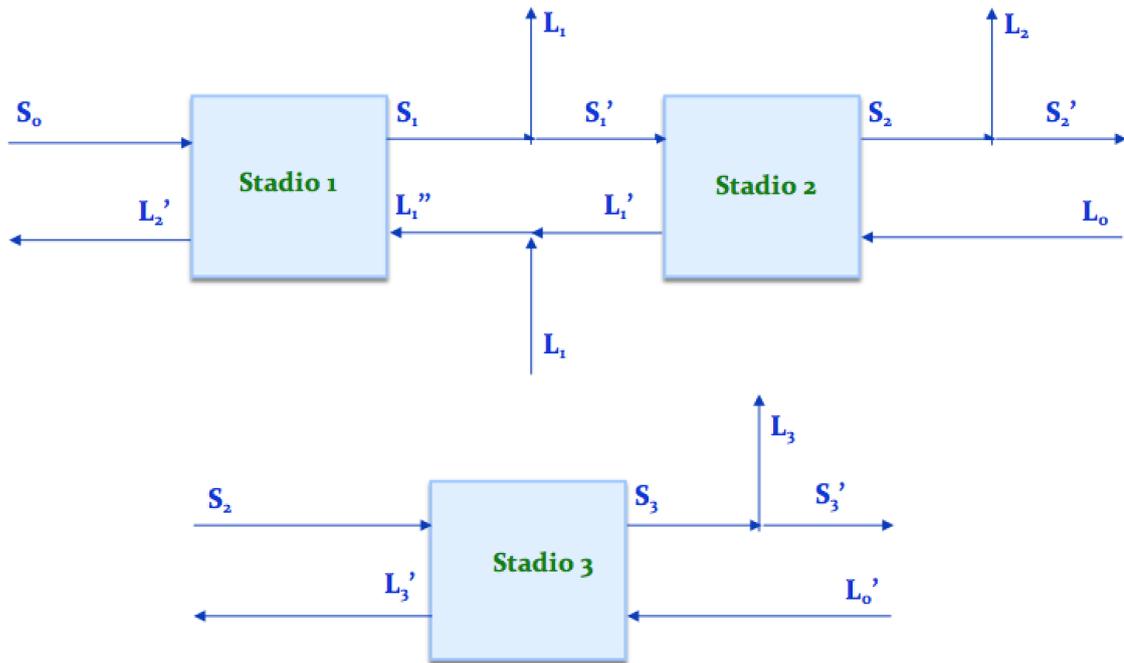


Figura 4.2: Divisione in Stadi

un quantitativo elevato di polifenoli. Questo stadio simil *crossflow* si presenta uguale ai precedenti, presentando infine la corrente 46 di solido esausto, mentre nel tank **T-107** vengono raccolte le ultime correnti di liquido arricchite in polifenoli, ed inviate tramite **P-113** alla fase successiva di concentrazione. Nell'appendice che segue questo capitolo è presente lo schema PFD dell'impianto appena descritto.

## 4.2 Dimensionamento Apparecchi

### 4.2.1 Miscelatori (ST-101, ST-102, ST-103)

Per il dimensionamento dei miscelatori sono state definite le caratteristiche dei deflettori ed i principali rapporti strutturali, definiti in base al diametro delle particelle. I valori sono raccolti nella tabella 4.9

Si procede quindi con il calcolo della velocità della girante secondo la formula 4.2:

$$N_{JS} = S \left( \frac{\mu_L}{\rho_L} \right)^{0,1} d_p^{0,2} \left( \frac{g(\rho_s - \rho_L)}{\rho_L} \right)^{0,45} \frac{X^{0,13}}{D^{0,85}} \quad (4.2)$$

Un altro parametro fondamentale è il tempo di permanenza all'interno del miscelatore, il quale deve essere inferiore a 20 minuti, calcolato come il rapporto fra il volume ottenuto del recipiente e la portata volumetrica entrante (al 110%). Per tutti e tre i miscelatori risulta essere intorno ai 17 minuti.

Tabella 4.9: Dimensionamento

A310/Hydrofoil	
Deflettori lama piatta	3
Angolo lama	45°
Parametro	Valore
D/T	0,5
D/H	0,42
D/D <sub>albero</sub>	5,22
D <sub>impeller</sub>	0,6 (m)

Bisogna infine verificare che il regime fluidodinamico sia turbolento, in modo tale da evitare la sedimentazione delle particelle solide. Si calcola quindi il numero di Reynolds 4.3 come:

$$Re = \frac{(\rho_L * N_{JS} * d_{impeller}^2)}{(\mu_{miscela})} \quad (4.3)$$

#### 4.2.2 Pompe a girante flessibile (P-101, P-106, P-110)

Dalla fase di miscelazione si ottiene una corrente di tipo *slurry*, la quale richiede una pompa a girante flessibile per la movimentazione. La procedura di dimensionamento seguita è quella indicata nel “*Slurry handbook-Guidelines for slurry pumping*” della Flygt Industry.

Come primo passo è fondamentale definire la *specific gravity* dello *slurry*, a partire da quella del solido, calcolata come in (4.4).

$$SG_{sl} = \frac{Peso}{Volume} = \frac{m * g}{\frac{m}{\rho}} = \rho * g \quad (4.4)$$

Il calcolo segue poi quanto segue secondo la 4.5

$$SG_{sl} = 1 + C_v(SG_s - 1) \quad (4.5)$$

Nota questa, tramite delle tabelle e delle prime approssimazioni sul diametro dei tubi del condotto è stata calcolata la velocità critica ( $v_{cr}$ ), la quale deve risultare inferiore a quella effettiva in modo tale da assicurare che l’operazione venga condotta in totale tranquillità senza rischio di blocchi o di eccessive perdite. 4.6:

$$v_{eff} > v_{cr} \quad (4.6)$$

Si è poi passato al calcolo della prevalenza ipotizzando una possibile lunghezza delle tubazione e un possibile dislivello geodetico. La prevalenza, come da manuale, è stata poi corretta con un fattore che permettesse di calcolare la prevalenza come equivalente di liquido pulito. Dalle caratteristiche tecniche e dalla portata trattata sono state scelte le pompe utilizzate facendo sempre attenzione che la stessa non vada in cavitazione, ossia che il  $NPSH_{disp}$  fosse maggiore di quello necessario.

### 4.2.3 Estrattore Ultrasonico (WU-101, WU-102, WU-103)

Per mantenere continuità con le estrazioni operate direttamente in laboratorio, si sceglie di dimensionare un estrattore ultrasonico della ditta Weber del quale è già noto il funzionamento. Il tempo di permanenza della sospensione all'interno dell'estrattore è stato scelto in modo tale da rimanere sul 'gomito' della curva Resa vs Tempo in modo tale che fosse massimizzata la forza spingente. Questo è dovuto all'elevata differenza di concentrazione fra le due fasi in questo primo tratto della curva, difatti, se si lavorasse all'ottimo ossia sull'asintoto, non si riuscirebbe ad estrarre un gran quantitativo di polifenoli perché diminuendo la  $\Delta C_A$  diminuisce drasticamente anche la forza spingente. Inoltre, il sistema in controcorrente permette di mantenere costante il valore di  $\Delta C_A$ . Si è scelto come tempo 5 minuti poiché, come mostrato in Figura 4.3,

Tabella 4.10: Parametri

Weber Ultrasonic		
Tempo	5	min
Altezza	1,80	m
Diametro	0,15	m

il campo di operatività ottimale del quale si è appena discusso rientra fra 2 e 9 minuti.

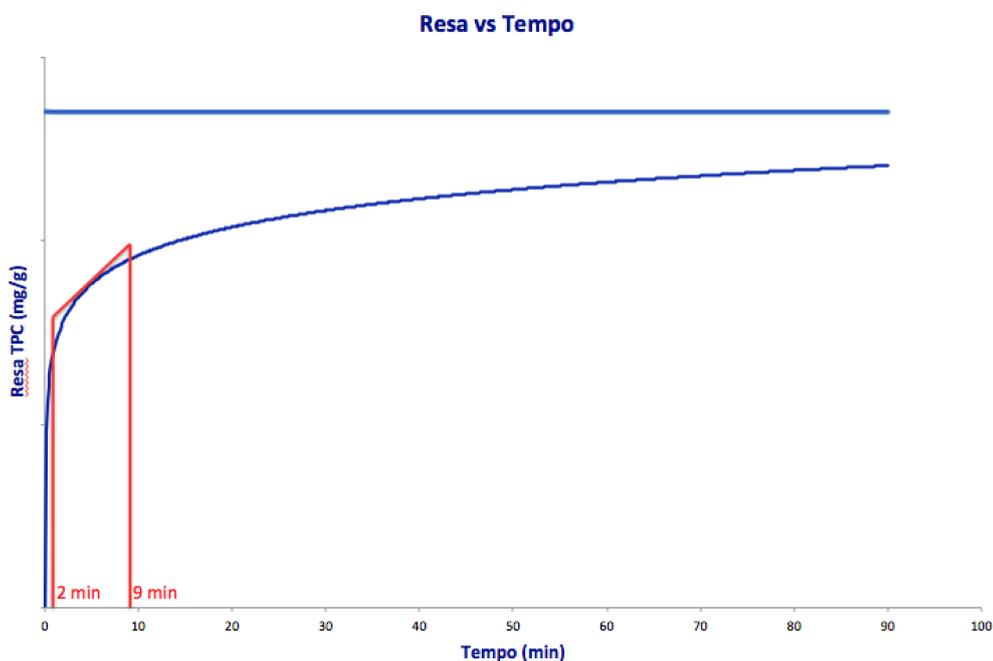


Figura 4.3: Punto di Funzionamento

Una volta stabilito il tempo di permanenza all'interno dell'estrattore si può calcolare la  $K_{L,a}$ , ossia il coefficiente di trasporto volumetrico, tramite 4.7, il

quale non varia a parità di condizioni fluidodinamiche. Questo parametro è utile per quanto riguarda l'espressione del flusso, il quale è in proporzionalità diretta con la  $K_{La}$ , e per determinare quale estrazione si dimostri più efficiente. Si mostra il calcolo effettuato sulla prova della durata di 5 minuti; al tempo  $t$  bisogna conoscere sia la concentrazione di bulk (ottenuta tramite estrazione) sia la concentrazione di saturazione ( $C_{AS}$ ), per la quale si considera la quantificazione totale di polifenoli ottenuta tramite prova in acqua a ricadere (2 step).

$$K_{La} = -\frac{\ln\left(\frac{C_{AS}-C_A}{C_{AS}}\right)}{t} \quad (4.7)$$

I parametri utilizzati per effettuare il calcolo sono:

Tabella 4.11: Parametri per il calcolo della  $K_{La}$

$C_{A,S}$	138,2	mg/g
$C(t)$	33,3	mg/g
Tempo	5	min

$$K_{La}=0,06$$

Per far sì che venga garantito il giusto funzionamento dell'estrattore bisogna verificare il mantenimento di un regime fluidodinamico di tipo turbolento all'interno del reattore.

$$Re = \frac{(\rho * v * d)}{(\mu)} \quad (4.8)$$

$$\mathbf{Reynolds_{Weber} \quad 2E+06}$$

Una volta settati questi parametri si procede al calcolo della capacità come mostrato in 4.9:

$$C = d^2 * h \quad (4.9)$$

Si può quindi procedere al numero di unità necessarie tenendo conto che ogni unità è in realtà composta da due reattori estrattivi.

$$Unità_{nec} = \frac{Volume_{nec}}{Capacità * 2} \quad (4.10)$$

Tramite questo calcolo si è giunti alla decisione di utilizzare otto unità in parallelo.

Si riportano in Tabella4.12 i parametri relativi al generatore ultrasonico in gestione, il quale si confa di più unità modulari, permettendo di lavorare a diverse frequenze.

Tabella 4.12: Parametri

Sonic Digital MG Multipremium TTE84		
Potenza	1000	W
Frequenza	40/80/120	kHz
Peso	7,5	Kg
Altezza	235	mm
Diametro	400	mm
Larghezza	530	mm

#### 4.2.4 Decanter (CS-101, CS-102, CS-103)

Per quanto concerne il decanter non vi è una vera e propria progettazione, bensì un processo di verifica delle prestazioni. Si procede quindi verificando la potenzialità del decanter Andritz F2000, seguendo la procedura di calcolo del *Perry's Chemical Engineers' Handbook*. Oltre ai valori già forniti da catalogo, è stato imposto il recupero di solido desiderato all'uscita del decanter. Procedendo nei calcoli si è arrivati ad una stimata della portata teorica trattabile soddisfacente le richieste che ci ha portato alla decisione di lavorare con un decanter per il primo e terzo stadio, mentre per il secondo stadio si procede con due decanter in parallelo. In tabella 4.13 sono raccolti i parametri da inserire per portare avanti il calcolo di verifica.

Tabella 4.13: Parametri Decanter

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

Il calcolo di verifica consiste nel risolvere quanto riportato nell'equazione 4.11:

$$\frac{Q_d}{2V_{gd}} = \frac{\pi\Omega^2 L}{g} \frac{r_p^2 - r_b^2}{\ln\{1 - Rec_d[1 - (r_p/r_b)^2]\}} = \Sigma_{Rec_d} \quad (4.11)$$

Come prima cosa viene calcolato il valore di  $\Sigma_{Rec_d}$  tramite la 4.12;

$$\frac{\pi\Omega^2 L}{g} \frac{r_p^2 - r_b^2}{\ln\{1 - Rec_d[1 - (r_p/r_b)^2]\}} = \Sigma_{Rec_d} \quad (4.12)$$

in seguito si valuta la  $Q_d$ , ossia la portata volumetrica teorica processabile dal modello di decanter in esame. Il calcolo effettuato è riportato nell'equazione 4.13.

$$\frac{Q_d}{2V_{gd}} = \Sigma_{Rec_d} \quad (4.13)$$

Infine la portata ottenuta tramite il calcolo soprastante viene confrontata con la portata di processo per la valutazione del numero di unità necessarie alla separazione, dando i risultati inizialmente espressi. Un esempio di funzionamento del decanter è mostrato in Figura 4.4.

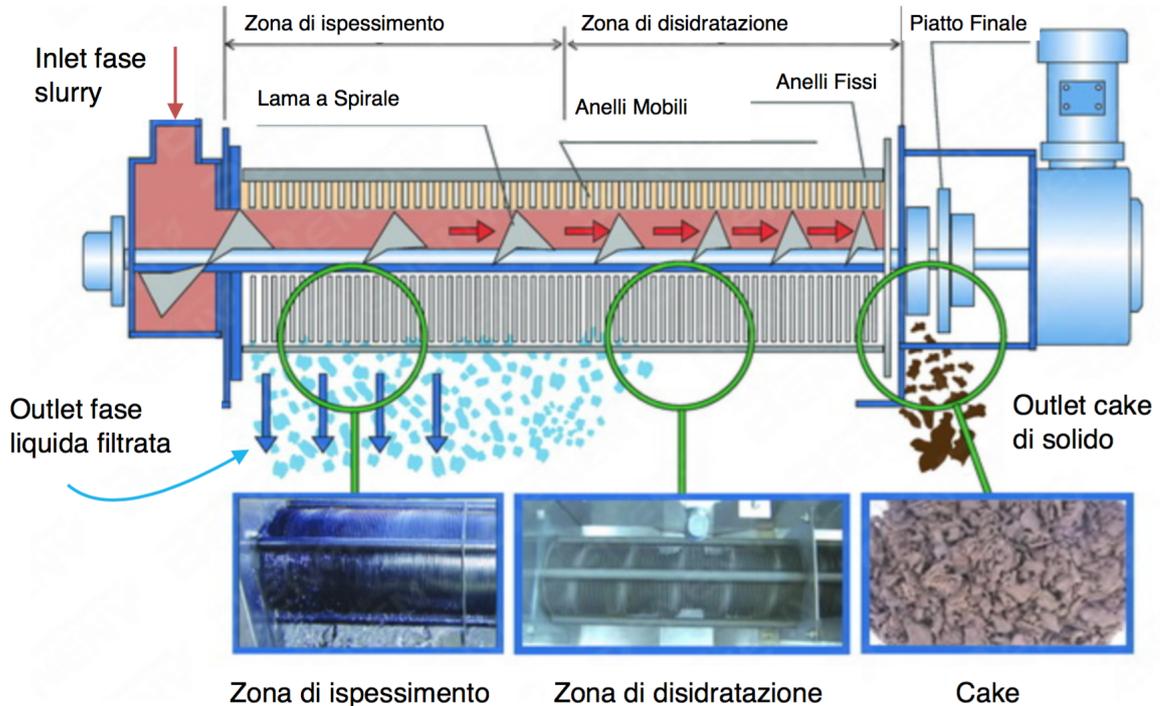


Figura 4.4: Funzionamento Decanter

#### 4.2.5 Filtri a tamburo rotante (RF-101, RF-102, RF-103)

Il dimensionamento viene effettuato per un filtro a nastro con lavaggio, la scelta è ricaduta su questa tipologia sia per la dimensione delle particelle trattate, sia per l'elevato grado di recupero. Per fare ciò si è seguito l'esempio 6 a pag. 18-94 del *Perry's Chemical Engineers' Handbook*. Per poter procedere bisogna definire una serie di parametri, a partire dalla cake thickness per lo scarico di solidi, ottenuta da tabella 18.8, la quale riporta come valore minimo da 3 a 5 mm, per questo si è scelto di usare 7,5 mm.

Nel solido uscente si avrà anche del liquido nel quale vi saranno disciolti i composti di nostri interesse; per questo si procede ad un lavaggio, ed il volume di liquido richiesto è stato calcolato a partire dal valore di perdita di solidi disciolti, imposto allo 0,1%.

Vengono quindi definiti i seguenti parametri di processo:

- TDS - Total dissolved solid = 0,1220 w/w
- Solidi restanti nel liquido = 0,1 w/w (ipotesi)
- Residual moisture (RUR) = 20%

Si passa quindi al calcolo del volume di lavaggio, partendo dai seguenti valori ottenuti tramite grafici (Tabella4.14).

Tabella 4.14: Calcolo Volume di Lavaggio

Parametro	Valore	Unità di misura
W	10	kg/m <sup>2</sup> xcycle
Form time	0,3	minuti
d/W	0,04	-
Dry time	0,4	minuti

Il volume di lavaggio (WVw [kgL/m<sup>4</sup>]) richiede per la sua determinazione la risoluzione delle seguenti equazioni 4.14 e 4.15 :

$$L_{\text{cake}}^f = \frac{W * RUR/100}{(100 - RUR)/100} \quad (4.14)$$

dove  $L_{\text{cake}}^f$  rappresenta il liquido nel cake finale in kg/m<sup>2</sup>xciclo

$$WVw = \frac{N * L_{\text{cake}}^f}{No.cicli} W \quad (4.15)$$

Una volta trovato riesco tramite il grafico Figura4.5 ad individuare il tempo di lavaggio.

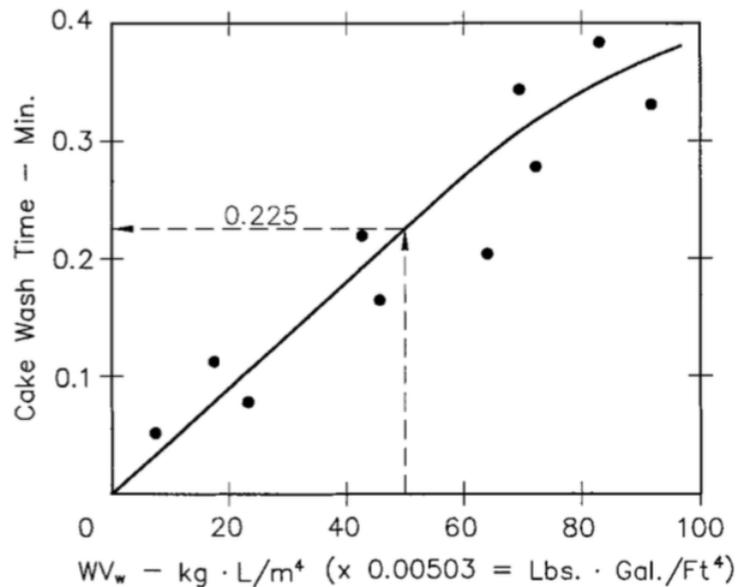


Figura 4.5: Tempo di lavaggio *Tratta da Perry's Chemical Engineers' Handbook*

In questo modo risulta definito in toto il tempo di un ciclo, il quale prevede filtrazione, asciugatura e lavaggio. Tramite i valori tabulati sui fattori tipici di design geometrico si è arrivati a stabilire che il tempo controllante per un ciclo

di filtrazione è la somma dei tempi di asciugatura e lavaggio. Noto ciò si può procedere al calcolo dell'area totale del filtro tramite l'ausilio di un fattore di *scale-up* definito dalla procedura. Una volta ottenuta l'area del filtro è possibile calcolare il flusso di gas richiesto per raggiungere il grado di vuoto richiesto utile alla procedura finale di essiccamento.

Tramite la Figura 4.6 si definisce la portata di gas che attraversa il nastro sia nell'essiccamento iniziale che in quello finale, in modo tale da poter poi calcolare il flusso di gas totale. L'aria richiesta viene calcolata come il rapporto fra l'aria necessaria ad un ciclo (tenuto conto delle perdite di carico) e l'area totale del filtro stesso. Si riporta la struttura del filtro a tamburo ro-

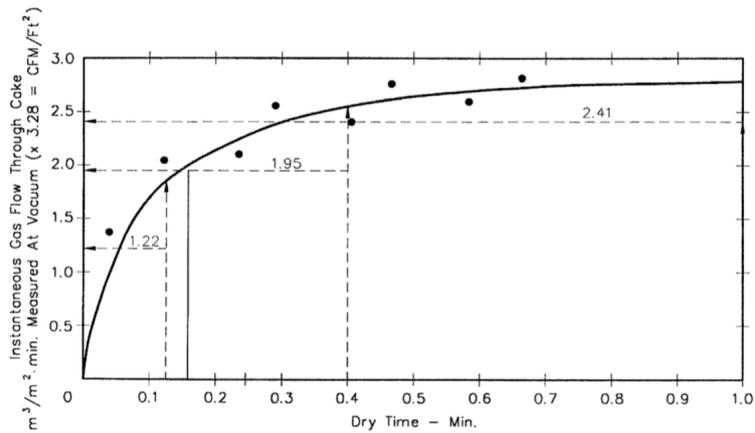


Figura 4.6: Portata di gas *Tratta da Perry's Chemical Engineers' Handbook*

tante, tramite un'immagine esplicativa tratta dal *Perry's Chemical Engineers' Handbook*.

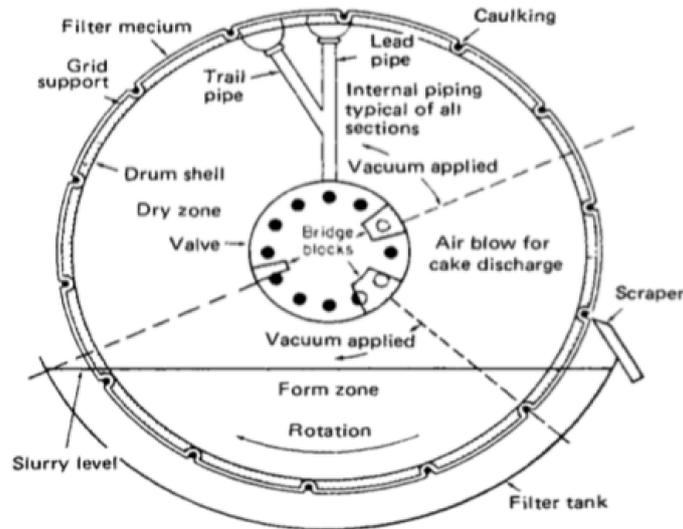


Figura 4.7: Struttura filtro *Tratta da Perry's Chemical Engineers' Handbook/fig.18-134*

## 4.2.6 Pompe Centrifughe

Il design delle pompe centrifughe impiegate nell'impianto è stato condotto nel medesimo modo per tutte quelle presenti. È stata fatta una prima approssimazione della disposizione nello spazio delle varie apparecchiature presenti, in modo tale da poter ipotizzare dei valori di massima di lunghezza delle tubazioni, e del dislivello fra il pelo libero del liquido. I diametri delle tubazioni, le quali sono state scelte saldate, sono stati presi da KSB Italia S.p.a "Selezione delle pompe centrifughe", così come la procedura di calcolo.

Come prima cosa occorre calcolare la prevalenza della pompa, tramite l'equazione 4.16:

$$H_A = H_{geo} + \frac{\Delta p}{\rho g} + \Sigma H_v \quad (4.16)$$

dove:

- $H_{geo}$  è il dislivello geodetico;
- $\Sigma H_v$  Perdite di carico localizzate e distribuite, dovute al flusso, alle valvole, ai gomiti e così via;
- $\Delta p$  Perdite di carico dovute alla differenza di pressione che la pompa fornisce al flusso; quest'ultimo per mancanza di dati si è ricavato da simulazione su software Aspen.

Le pompe si è ipotizzato fossero nella totalità in configurazione sotto battente. Si prosegue poi al calcolo della prevalenza della pompa, ed ad un calcolo di verifica in modo tale che fosse scongiurata l'eventualità che la pompa incorra in fenomeni di cavitazione. Ciò avviene tramite il calcolo dell' $NPSH_{disp}$ , ottenuto secondo l'equazione 4.17:

$$NPSH_{disp} = \frac{p_e + p_b - p_D}{\rho g} + \frac{v_e^2}{2g} - H_{v,s} - H_{s,geo} \pm s' \quad (4.17)$$

Una volta ottenuto l' $NPSH_{disp}$  si procede alla scelta del modello della pompa, e da grafico Figura 4.8 si verifica l' $NPSH_{nec}$  necessario. Si verifica quindi che:

$$NPSH_{disp} > NPSH_{nec} \quad (4.18)$$

I modelli ed i grafici operativi per ogni pompa sono stati reperiti da catalogo FlowServe.

## 4.2.7 Serbatoi

La scelta dei serbatoi (contenenti solo liquidi) è ricaduta su serbatoi verticali con fondo ellissoidale, parte centrale cilindrica e in testa un raccordo torosferico. Il volume del liquido è stato calcolato considerando un tempo di permanenza di 1h e una portata volumetrica maggiorata del 10%. Il volume del serbatoio, invece, è stato dimensionato considerando che all'interno del

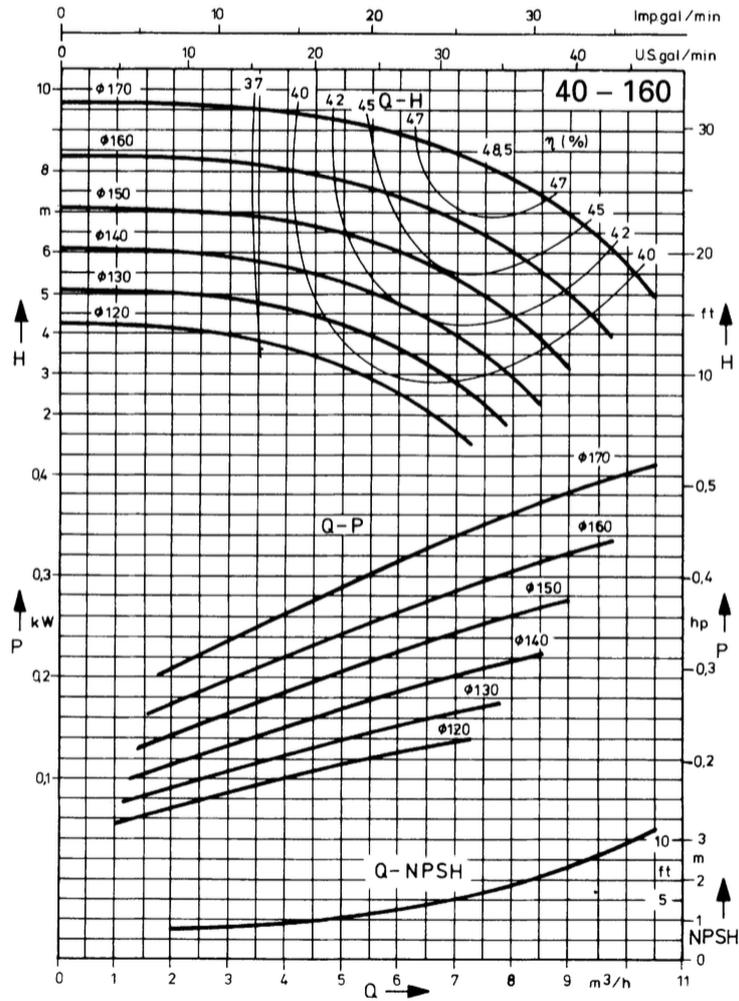


Figura 4.8: Curva caratteristica pompa centrifuga 40-160 *Tratta da catalogo FLOWSERVE*

serbatoio oltre il liquido vi è un disimpegno del circa 20% in più. La procedura utilizzata per il calcolo degli spessori è quella mostrata nella normativa EN 13445. Si è utilizzato un sovrappessore di corrosione pari a 3 mm. Tutti i valori delle altezze, diametri, spessori e volumi sono stati normalizzati secondo valori commerciali tabellati.

Sono state fatte le seguenti ipotesi:

- Tempo permanenza all'interno del serbatoio **1 h**;
- Portata volumetrica maggiorata del **10%**;
- Volume del serbatoio maggiorato con un **20%** di disimpegno.

I valori nominali sono stati scelti tra una serie di valori tabulati e adattati di volta in volta alle portate.

### 4.3 Sistema di Controllo

- Controllo delle portate delle correnti 9, 12, 31 e 48 al fine di evitare lo svuotamento dei miscelatori T-101, T-103, T-104 e T-106;
- Controllo di rapporto della corrente di solido fresco 1 in modo tale da garantire la corretta portata in entrata al primo stadio di estrazione in funzione del liquido esausto in ingresso ad ST-101, derivante dal secondo stadio estrattivo;
- Controllo di rapporto delle correnti di solvente fresco 22 e 39 in modo tale che sia garantito il mantenersi del rapporto Liquido/Solido in ogni stadio di estrazione;
- Controllo di Pressione delle presse CP-101, CP-102 e CP-103 tramite iniezione di aria sul controcono di uscita del pannello esausto;
- Controllo di Livello nei filtri a tamburo rotante RF-101, RF-102 ed RF-103. Si controlla il livello del serbatoio di raccolta del liquido per evitarne lo svuotamento, agendo rispettivamente sulle correnti 15, 35 e 52.

## Capitolo 5

# Conclusioni

### 5.1 Conclusioni della tesi

Al termine di questo lavoro si sono ottenuti risultati in scala laboratoriale che supportano l'utilizzo della tecnologia US; i dati sono poi stati efficacemente interpretati con modelli fisici per la progettazione in scale-up a livello industriale, per il quale questo sistema rappresenta una innovazione utile sia a livello di sostenibilità che di impatto economico. Dai numerosi confronti effettuati tramite metodologie classiche, quali l'infusione e la decozione, si è potuto evincere come le UAE rappresentassero la scelta vincente permettendo di lavorare sia con il solvente green per eccellenza, l'acqua, che di ottenere rese elevate lavorando a temperatura pressoché ambiente.

Gli estratti sono stati quantificati inizialmente utilizzando un rapido test analitico per individuare i polifenoli totali in essi contenuti (*Folin-Ciocalteu*). Le prove sono state effettuate contemporaneamente su due matrici di diversa origine; la prima di taglio commerciale (*South Indian*) e la seconda come residuo di produzione (*Ceylon Orange*). Dalle quantificazioni ottenute in acqua a ricadere si è confermato che la matrice di scarto, non adatta alla vendita, presentasse un contenuto di polifenoli estremamente elevato, comparabile se non addirittura superiore al taglio tisana. Questo risultato avvalorava la fattibilità di valorizzazione di questa biomassa.

L'obiettivo prefisso era quello di riuscire ad estrarre i componenti polifenolici antiossidanti presenti nel tè nero e caratterizzarne il profilo di composizione. Con l'aiuto di analisi quali-quantitative (i.e. LC/MS ed HPLC/DAD) sono stati identificati sia i componenti relativi alla famiglia delle catechine, sia quelli appartenenti agli acidi fenolici. Fra i composti individuati si riportano l'acido gallico e l'acido clorogenico (acidi fenolici), insieme a quercetina-3-glucoside (flavonoli), teobromina e caffeina (metilxantine). Sono state registrate inoltre rese elevate in catechina, gallo catechina ed epigallocatechina-3-gallata, flavonoidi caratteristici del tè.

Confrontando le analisi delle due diverse matrici, si può osservare come il prodotto UAE sia molto più caratterizzabile rispetto a quello convenzionale (circa il doppio dei componenti sono noti), ripercuotendosi nelle relative

quantificazioni ottenute, con valori di mg di analiti su  $g_{\text{Estratto secco}}$  molto più elevati nell'estrazione in *cup-horn* rispetto all'estrazione convenzionale. Questo può essere ascrivibile a processi di epimerizzazione e degradazione (i.e. deglicosilazione) dei composti ad alte temperature, che modificano la natura dell'estratto polifenolico e ne complicano la composizione.

E' stato dimostrato come l'applicazione sulla matrice di scarto del protocollo estrattivo US porti a valori superiori rispetto al taglio tisana circa le principali classi di componenti, stimando un aumento del 35% in catechine e del 43% in acidi fenolici.

Uno degli obiettivi del lavoro era riuscire ad avvicinarsi il più possibile all'esaurimento della biomassa. Ciò è stato attuato tramite la simulazione laboratoriale di un *cross-flow* in più stadi. Per il *South Indian* si è visto come dopo due stadi non si riuscisse ad ottenere beneficio da ulteriori estrazioni del solido e del liquido esausti, riuscendo comunque a recuperare il 72% dei composti polifenolici presenti. Per la matrice di tipo *Ceylon Orange* sono invece stati necessari tre *step* estrattivi, arrivando ad esaurire la matrice per il 74% del suo potenziale (con picco del 82% per il primo batch), ed ottenendo il 16% in più di polifenoli totali rispetto al taglio commerciale.

Il potere antiossidante è una delle caratteristiche più di rilievo del tè nero, d'interesse sia per l'industria alimentare che per quella farmaceutica e cosmetica. Tramite i test di determinazione del potere antiossidante (DPPH e ORAC) si è evinto come il mix polifenolico, ottenuto unendo i diversi stadi estrattivi sopra citati, presenti attività più elevata rispetto ad un'unica estrazione assistita da US, assestandosi su valori prossimi a quelli ottenuti in convenzionale. Eseguendo analisi più accurate, inoltre, si è dimostrato come il terzo *step* estrattivo eseguito per il *Ceylon Orange* sia il più selettivo, con maggior concentrazione di flavonoidi e dal maggior potere antiossidante.

Una volta caratterizzata la matrice d'interesse e ottenuto un set di dati sufficiente, si è potuto procedere con l'intensificazione della sezione di estrazione di un processo su scala industriale. Per fare ciò ci si è serviti del modello di Peleg per descrivere la cinetica estrattiva, il quale ha permesso di risalire ai parametri fluidodinamici ( $k_{La}$ ) utili alla progettazione di un reattore ad ultrasuoni a flusso, sfruttabile per un impianto controcorrente industriale. Tramite uno studio dei parametri operativi si ritrovano nuovamente tre stadi, ipotizzati come detto in controcorrente, in modo tale da lavorare in continuo e da massimizzare il *mass transfer*. Si fissa inoltre un rapporto L/S pari a 15 (stesso valore utilizzato per le prove in laboratorio). Per far sì che la forza spingente che guida l'estrazione risulti ottimale, si deve lavorare sul ginocchio della curva cinetica, individuandovi un tempo operativo adatto che sia in equilibrio tra resa ottenuta e rapidità di processo. Quest'ultima è stata valutata tramite l'*extraction rate* del modello cinetico, corrispondente al coefficiente angolare della retta tangente la curva nel punto selezionato sul ginocchio.

Infine è stata quindi progettata la sezione di estrazione di un impianto di valorizzazione degli scarti, la quale permettesse di replicare i dati ottenuti in laboratorio in termini di rese e di parametri operativi (acqua come solvente, temperatura ambiente, rese elevate) con un processo che fosse *green* ed eco-

nomicamente vantaggioso. I parametri operativi dell'impianto, pensato per la regione di Assam in India, prevedono una portata entrante di biomassa umida pari a 1800 t/y lavorate su 3500 ore annue non presentando il tè una lavorazione stagionale. Si è ipotizzato un *turndown ratio* che spaziasse dal 60 al 110% della potenza nominale, stimando una portata post essiccamento di 0,47 ton/h.

Il lavoro si è concluso stimando un recupero pari al 56% dei polifenoli inizialmente presenti nella matrice, stimando una produzione oraria di 0,045 ton di prodotto, ossia circa 158 ton/y.

# Bibliografia

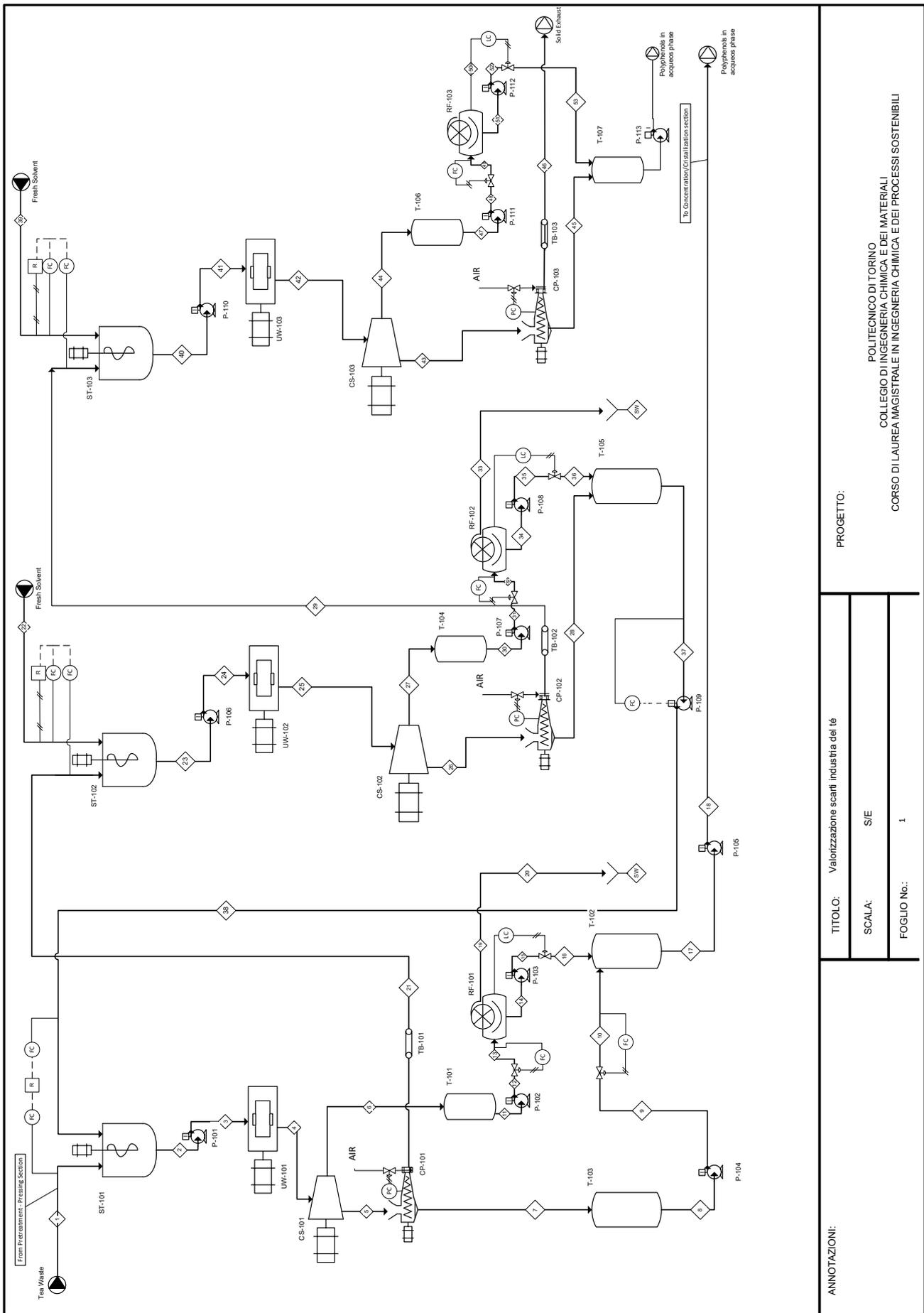
- [1] Naveeda M.; BiBib J.; Kamboh A.A.: '*Pharmacological values and therapeutic properties of black tea (Camellia sinensis): A comprehensive overview*', In: Food Chemistry 241 (2018) pp. 480–492
- [2] Grzesika M.; Naparoa K.; Bartoszb G.; Sadowska-Bartosza I.; '*Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants*', In: Food Chemistry 241 (2018) pp. 480–492
- [3] Fresco, P.; Borges, F.; Marques, M.P.M.; Diniz, C. '*The Anticancer Properties of Dietary Polyphenols and its Relation with Apoptosis*' Curr. Pharm. Des. (2016), 16, pp. 114–134
- [4] Atoui A.K.; Mansouri A.; Boskou G.; Kefalas P., '*Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile*', In: Food Chemistry 89 (2005) pp. 27–36
- [5] Pasrija D.; Anandharamakrishnan C.; '*Techniques for Extraction of Green Tea Polyphenols: A Review*' Food Bioprocess Technol (2015) 8:935-950
- [6] L. Manzocco\*, M. Anese and M. C. Nicoli. '*Antioxidant Properties of Tea Extracts as Affected by Processing*'. In: Lebensm.-Wiss. u.-Technol., 1998 31, pp. 694-698
- [7] E. Weichselbaum, J. L. Buttriss; '*Polyphenols in the diet*', In: Nutrition Bulletin, (2010) 35, pp. 157–164
- [8] Phenol Explorer, '*Showing all polyphenols found in Tea [Black], infusion*'; <http://phenol-explorer.eu/contents/food/30>
- [9] Turkmen N.; Y. Sedat Velioglu, Sari F.; Polat G., '*Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea Molecules*' (2007) 12, 484-496
- [10] Sakanaka, S.; Juneja, L.R.; Taniguchi, M. '*Antimicrobial effects of green tea polyphenols on thermophilic spore-forming bacteria*'. J. Biosci. Bioeng. (2000), 90, 81-85
- [11] Khan, N.; Mukhtar, H. ; '*Multitargeted therapy of cancer by green tea polyphenols*' Cancer Lett. (2008), 269, pp. 269–280
- [12] S. Khokar, S. G. M. Magnusdottir; '*Total Phenol, Catechin, and Caffeine Contents of Teas Commonly Consumed in the United Kingdom*', In: . Agric. Food Chem, (2002), 50, pp. 565?570
- [13] Chang K., '*World tea production and trade Current and future development*', In: Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO, Rome (2005)

- [14] Both, S.; Chemat, F.; Strube, J. *Extraction of polyphenols from black tea - Conventional and ultrasound assisted extraction*, *Ultrasonics Sonochemistry* 21 (2014) 1030–1034
- [15] Guçlü Üstündag Ö.; Ersan S.; Özcan E.; Özcan G.; Kayra N.; Ekinçi Y. *'Black tea processing waste as a source of antioxidant and antimicrobial phenolic compounds*, In: *Eur Food Res Technol*, (2016) 242, pp. 1523-1532
- [16] Al-Dhabi N.A.; Ponmurugan K.; Jeganathan P.M., *'Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds'*, In: *Ultrasonics Sonochemistry* 34 (2017) pp. 206–213
- [17] ACS, Chemistry for Life, *'12 Principles of Green Engineering'*, <https://www.acs.org/content/acs/en/greenchemistry/what-is-green-chemistry/principles/12-principles-of-green-engineering.html>
- [18] Samantha Y. Tang et al. *'The 24 Principles of Green Engineering and Green Chemistry: "IMPROVEMENTS PRODUCTIVELY"'*. In: *Green Chem.* (2008) doi: 10.1039/B719469M.
- [19] Farid Chemat, Maryline Abert Vian, and Giancarlo Cravotto. *'Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles'*. In: *International Journal of Molecular Sciences* 13.7 (2012), p. 8615. issn: 1422-0067
- [20] Knoerzer K.; Juliano P.; Smithers G. *'Innovative Food Processing Technologies: Extraction, Separation, Component Modification, and Process Intensification'* Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology, and Nutrition: Number 302. pp. 22-39
- [21] R. Amirantea, E. Distasoa, P. Tamburranoa, A. Paduano b, D. Pettinichio; *'Acoustic cavitation by means ultrasound in extra virgin olive oil extraction process'*, In: *Energy Procedia*, 10206 (2017) 09, pp- 82-90
- [22] Chemat F.; Zill-e-Huma; Kamran Khan M.; *'Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction'*. In: *Ultrasonics Sonochemistry* 18 (2011) pp. 813–835
- [23] Lei Zhang A., Cunshan Zhou A., Bei Wang A., Abu El-Gasim A. Yagoub B., Haile Ma A., Xiao Zhang C., Mian Wu A.; *'Study of ultrasonic cavitation during extraction of the peanut oil at varying frequencies'*, In: *Ultrasonics Sonochemistry* 37 (2017), pp. 106–113
- [24] The Engineering ToolBox. Cavitation - an Introduction. [url:www.engineeringtoolbox.com/cavitation](http://www.engineeringtoolbox.com/cavitation)
- [25] Epic *Sistemi cavitazionali*, <https://www.epic-srl.com/it/sistemi-cavitazionali>
- [26] Chatel G., De Oliveira Vigier K., Jérôme F.; *'Sonochemistry: What Potential for Conversion of Lignocellulosic Biomass into Platform Chemicals?'* In: *ChemSusChem* 7.10 (2014), pp. 2774–2787.
- [27] T.J. Mason, *Chemistry with Ultrasound*, Elsevier Applied Science, New York, (1990).

- [28] Muthupandian Ashokkumar. '*The characterization of acoustic cavitation bubbles – An overview*'. In: *Ultrasonics Sonochemistry* 18 (2011) pp. 864–872
- [29] McDonnell C., Tiwari B.K., '*Ultrasound: A Clean, Green Extraction Technology for Bioactives and Contaminants*', In: *Comprehensive Analytical Chemistry*, Volume 76, (2017) pp. 111-126
- [30] Crum L.A., '*Comments on the evolving field of sonochemistry by a cavitation physicist*', In: *Ultrason. Sonochem.* 2 (1995), pp. 147-152.
- [31] M. Toma, M. Vinatoru, L. Paniwnyk, T.J. Mason, '*Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction*', In: *Ultrasonics Sonochemistry*. 8 (2001) pp. 137–142.
- [32] McDonnell C., Tiwari B.K., '*Ultrasound: A Clean, Green Extraction Technology for Bioactives and Contaminants*', In: *Comprehensive Analytical Chemistry*, Volume 76, (2017) pp. 111-126
- [33] Üstündag? O; Özcan E; Özcan G; et al., '*Black tea processing waste as a source of antioxidant and antimicrobial phenolic compounds*', In: *Eur Food Res Technol* (2016) 242, pp.1523–1532
- [34] Marcello Guidotti, <http://dctf.uniroma1.it/galenotech/liofilizz.htm>
- [35] Peleg M., '*An Empirical Model for the Description of Moisture Sorption Curves*', In: *Journal of Food Science*, Volume 53, No. 4, (1988)
- [36] C.Zhou, C. Sun, K. Chen, X. Li. '*Flavonoids, Phenolics, and Antioxidant Capacity in the Flower of Eriobotrya japonica Lindl.*' In: *J Mol Sci*, Vol 12 No. 5 (2011) pp: 2935–2945.
- [37] <http://www.chimicare.org/blog/filosofia/il-tao-della-chimica-2°-parte/>

## Appendice A

# Process Flow Diagram



ANNOTAZIONI:

TITOLO: Valorizzazione scarti industria del té

SCALA: S/E

FOGLIO No.: 1

PROGETTO:

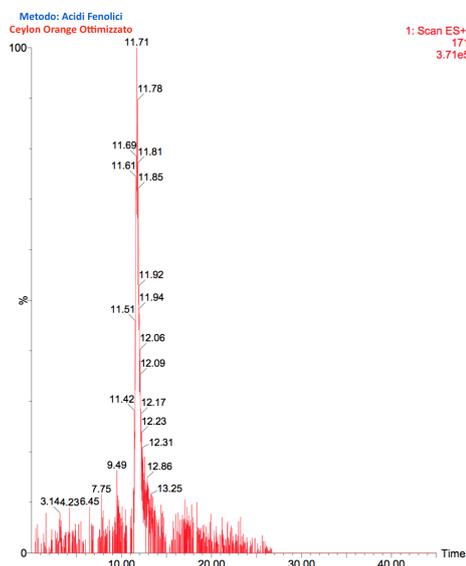
POLITECNICO DI TORINO  
 COLLEGIO DI INGEGNERIA CHIMICA E DEI MATERIALI  
 CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN INGEGNERIA CHIMICA E DEI PROCESSI SOSTENIBILI

# Appendice B

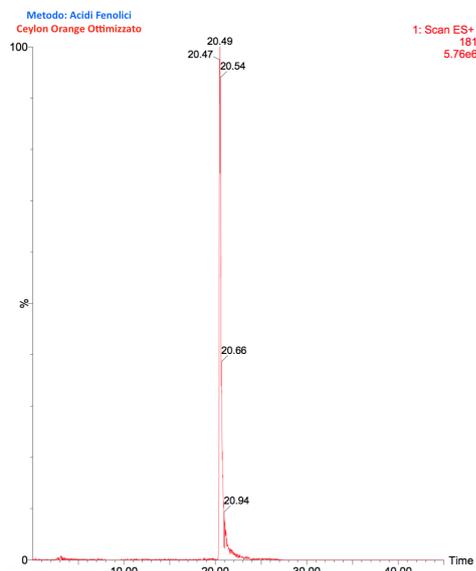
## LC-MS

### B.1 Ceylon Orange

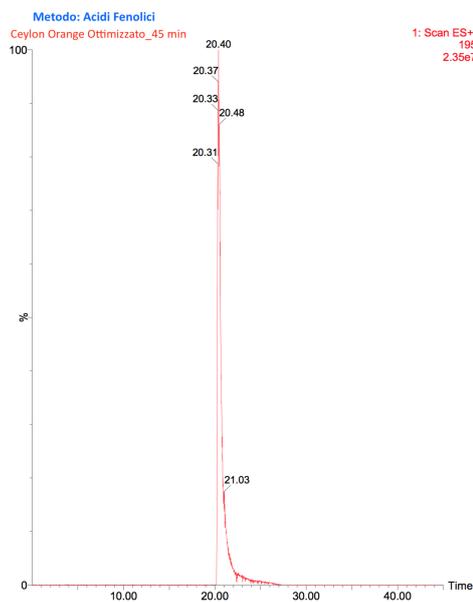
#### B.1.1 Estrazione Ottimizzata



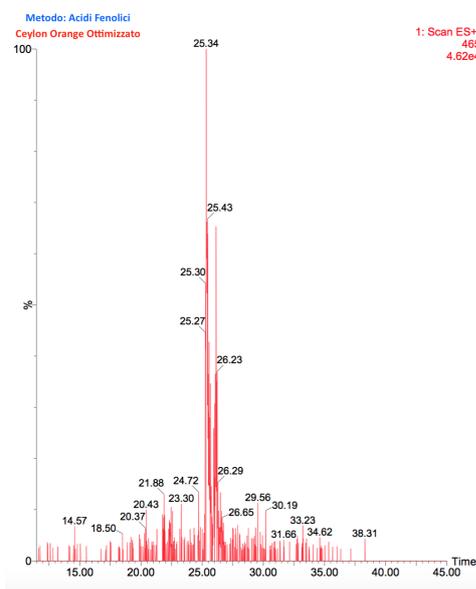
(a) *Acido Gallico*



(b) *Teobromina*

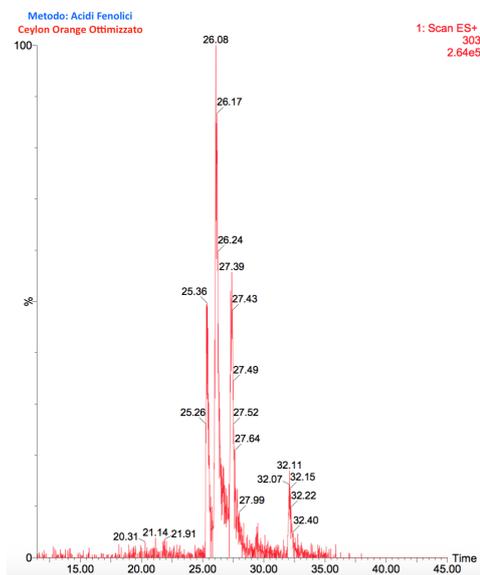


(c) *Caffeina*

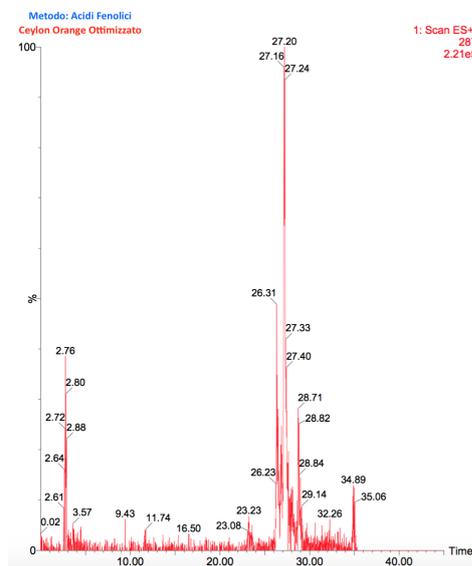


(d) *Quercetina-3-glucoside*

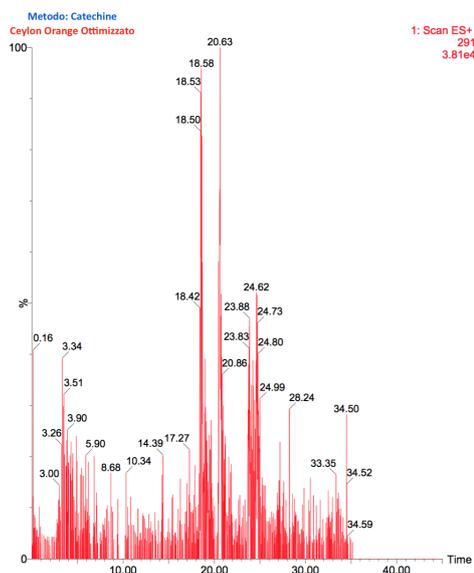
Figura B.1: Ceylon Orange Ottimizzato



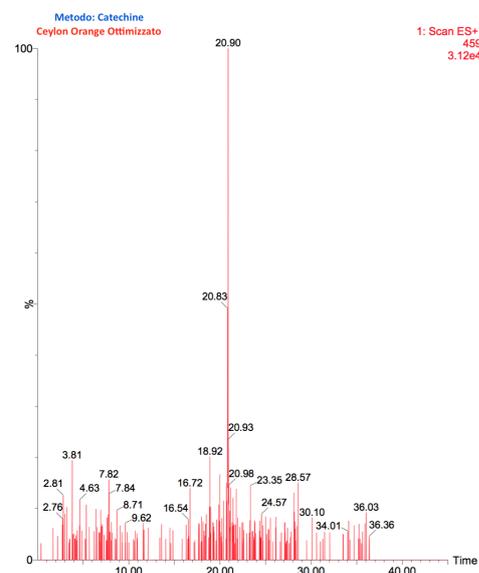
(a) *Quercetina*



(b) *Kaempferolo*



(c) *(Epi)Catechina*



(d) *Epigallocatechina gallata*

Figura B.2: Ceylon Orange Ottimizzato

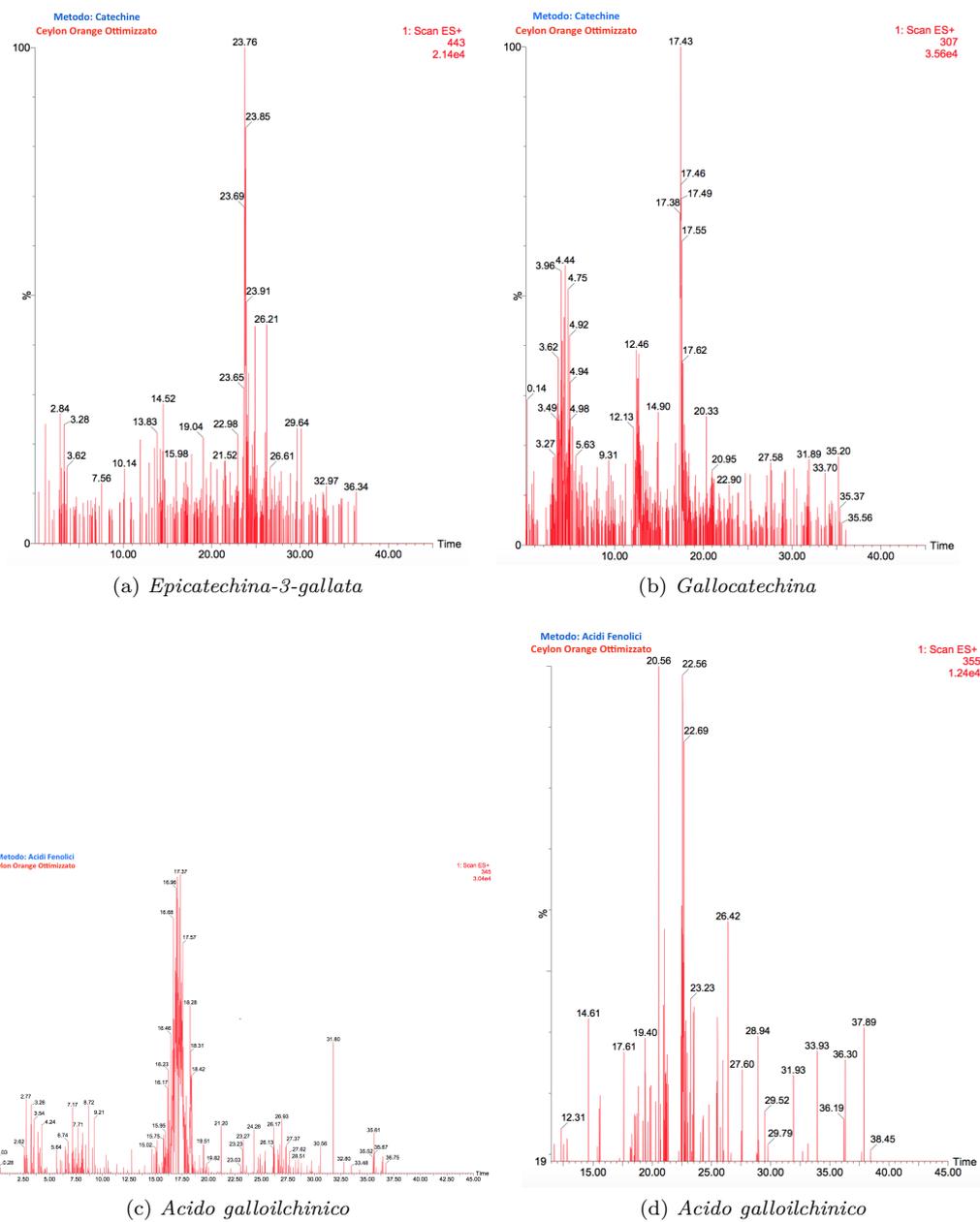


Figura B.3: Ceylon Orange Ottimizzato

## B.1.2 Estrazione Convenzionale

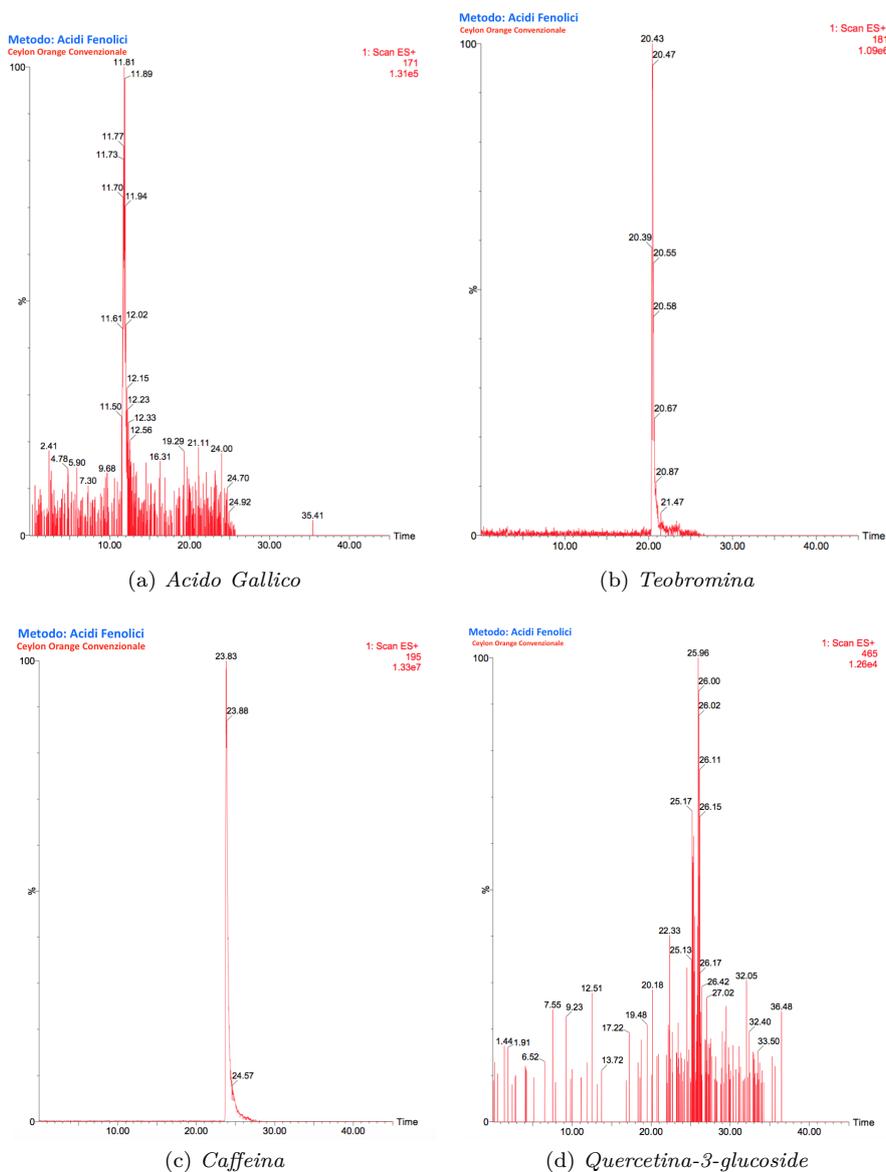
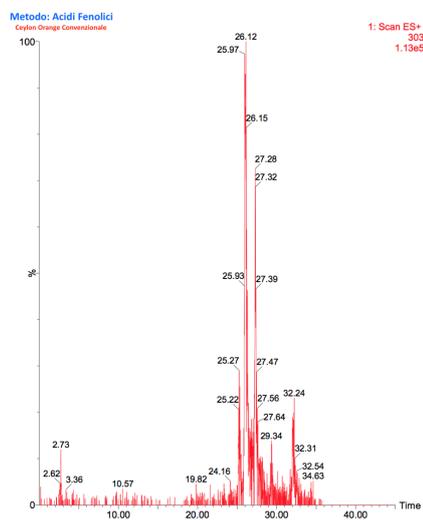
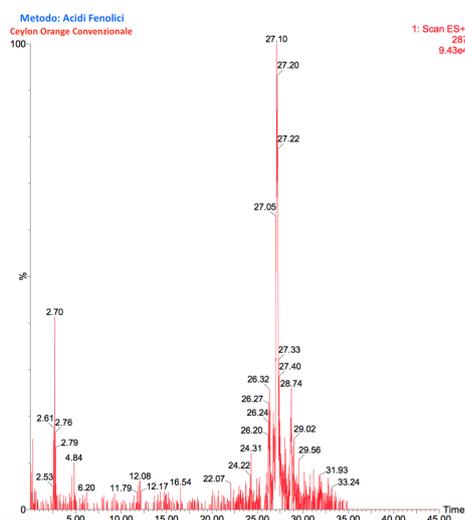


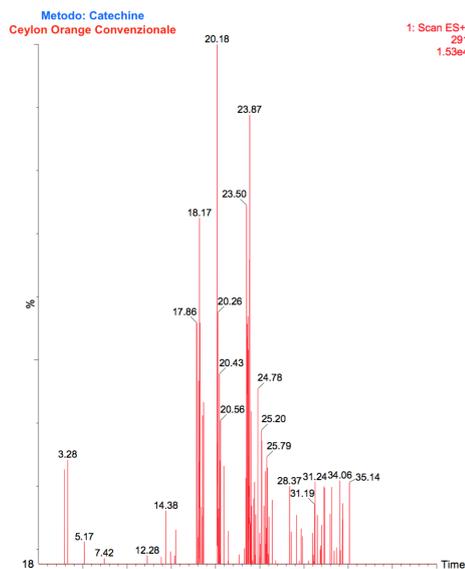
Figura B.4: Ceylon Orange Convenzionale



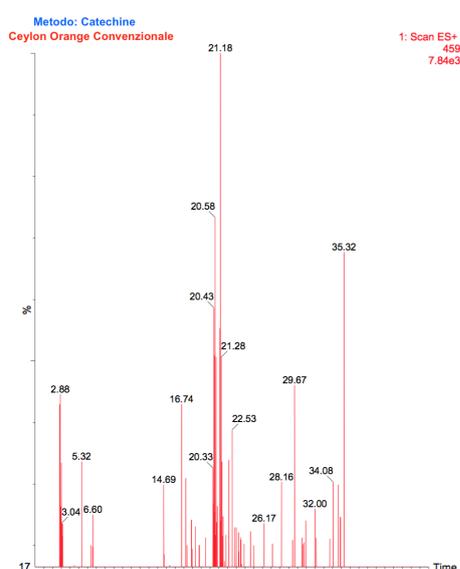
(a) *Quercetina*



(b) *Kaempferolo*



(c) *(Epi)Catechina*



(d) *Epigallocatechina gallata*

Figura B.5: Ceylon Orange Convenzionale

## B.2 South Indian

### B.2.1 Estrazione Ottimizzata

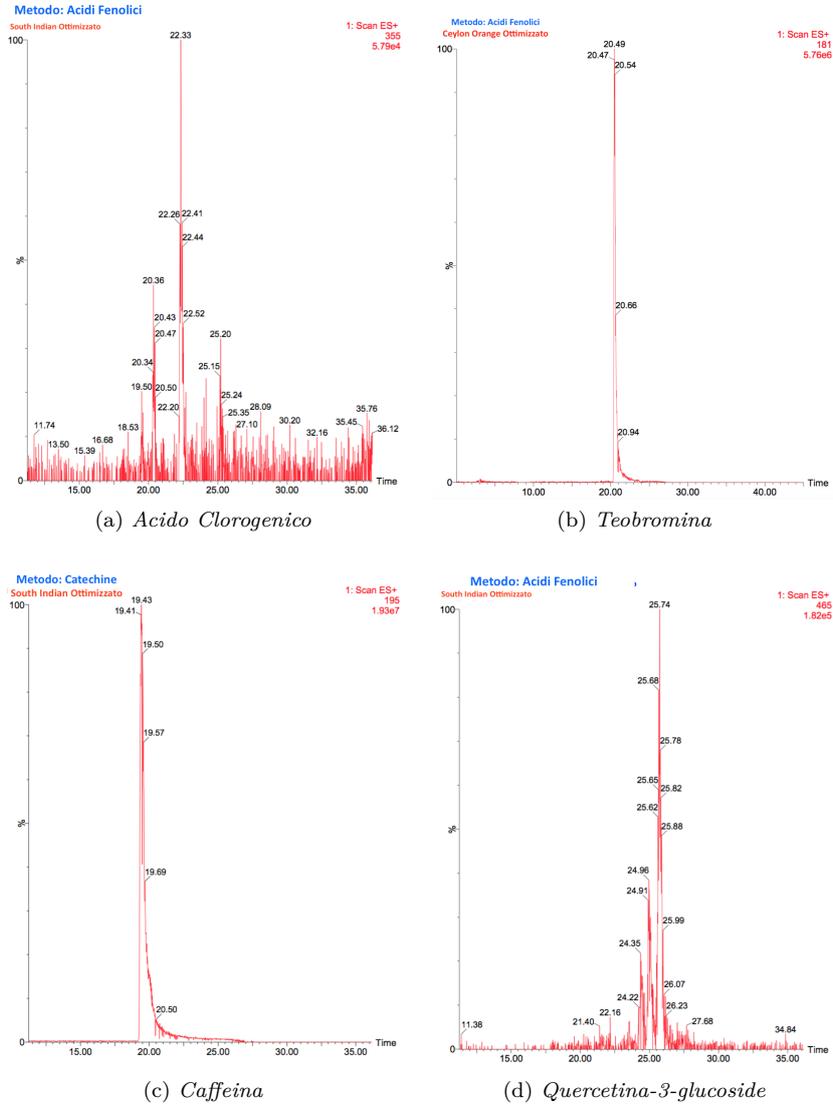
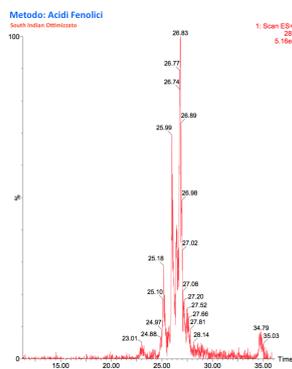
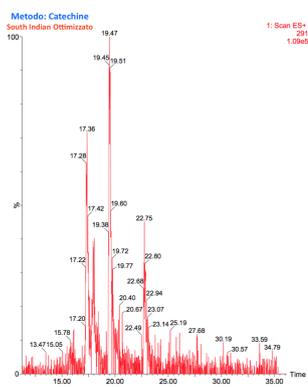


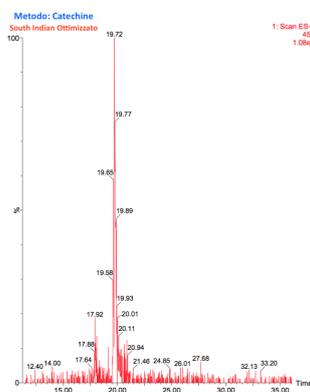
Figura B.6: South Indian Ottimizzato



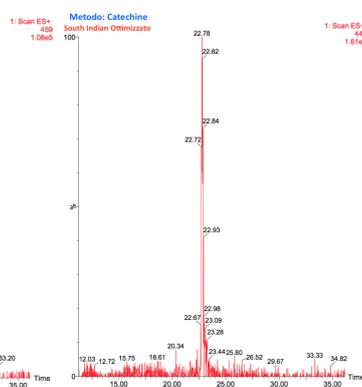
(a) *Kaempferolo*



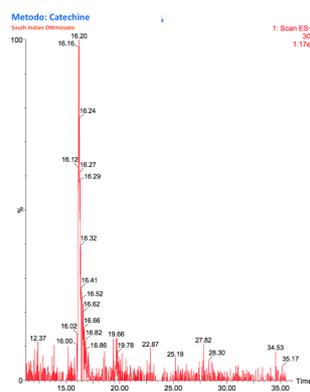
(b) *(Epi)Catechina*



(c) *Epigallocatechina gallata*



(d) *Epicatechina-3-gallata*



(e) *Galocatechina*

Figura B.7: South Indian Ottimizzato

## B.2.2 Estrazione Convenzionale

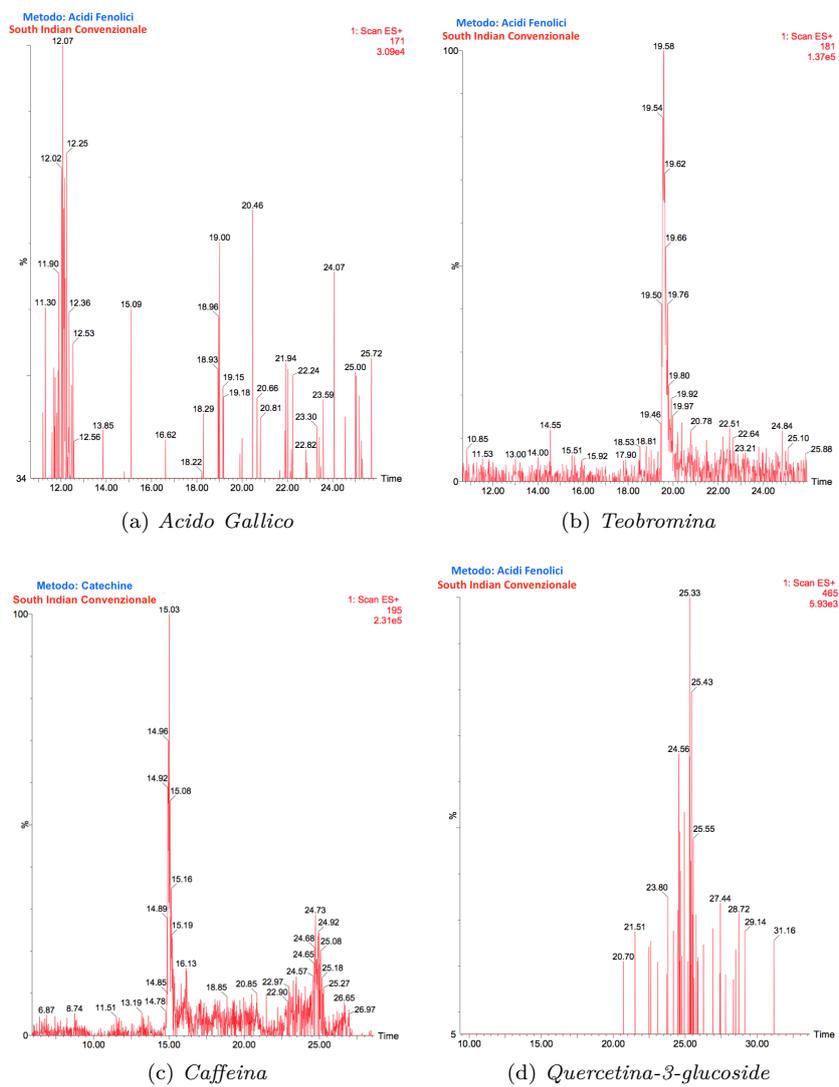
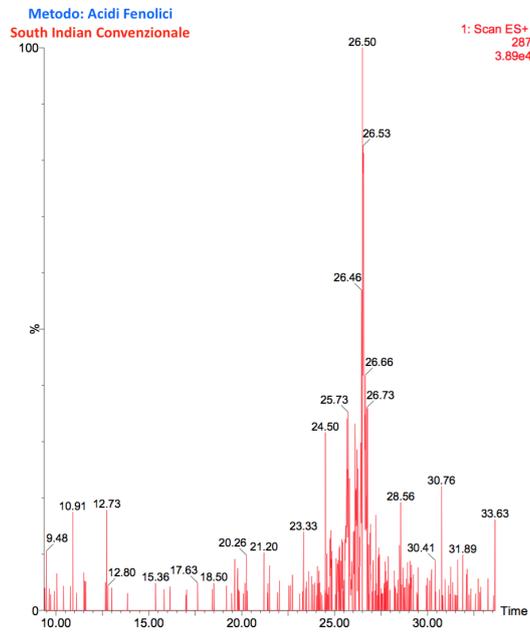
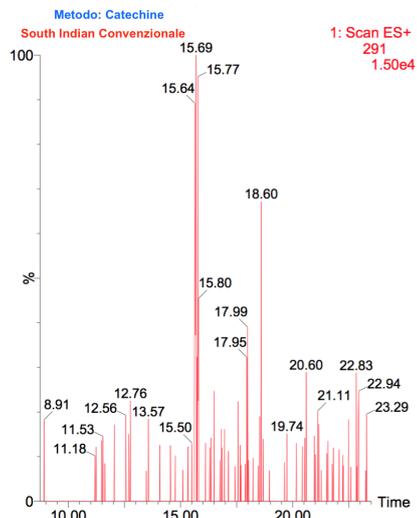


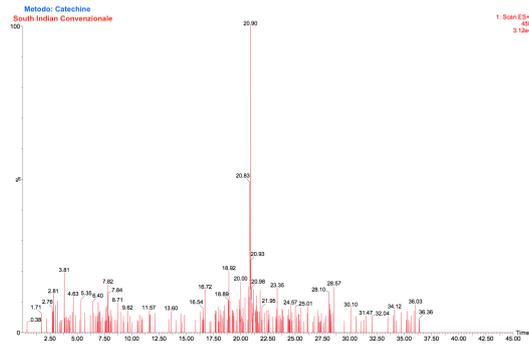
Figura B.8: South Indian Convenzionale



(a) *Kaempferolo*



(b) *(Epi)Catechina*



(c) *Epigallocatechina gallata*

Figura B.9: South Indian Convenzionale



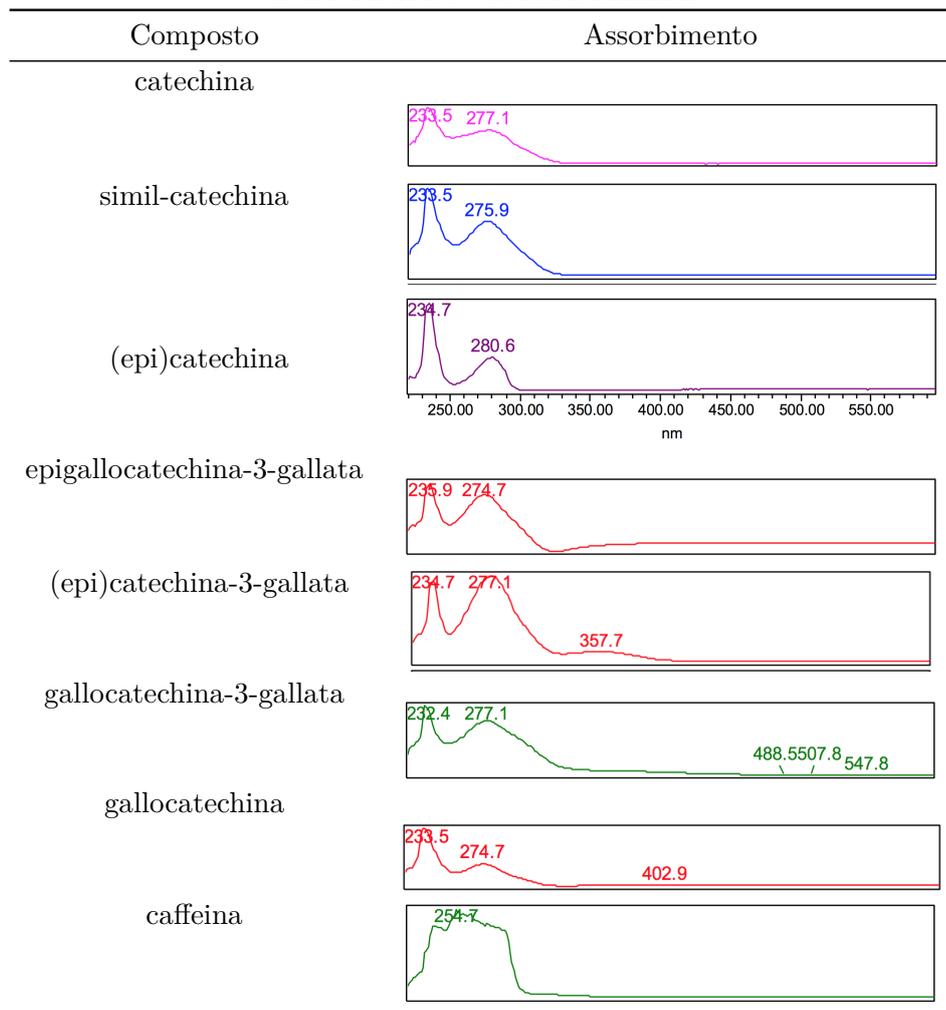
# Appendice C

## HPLC

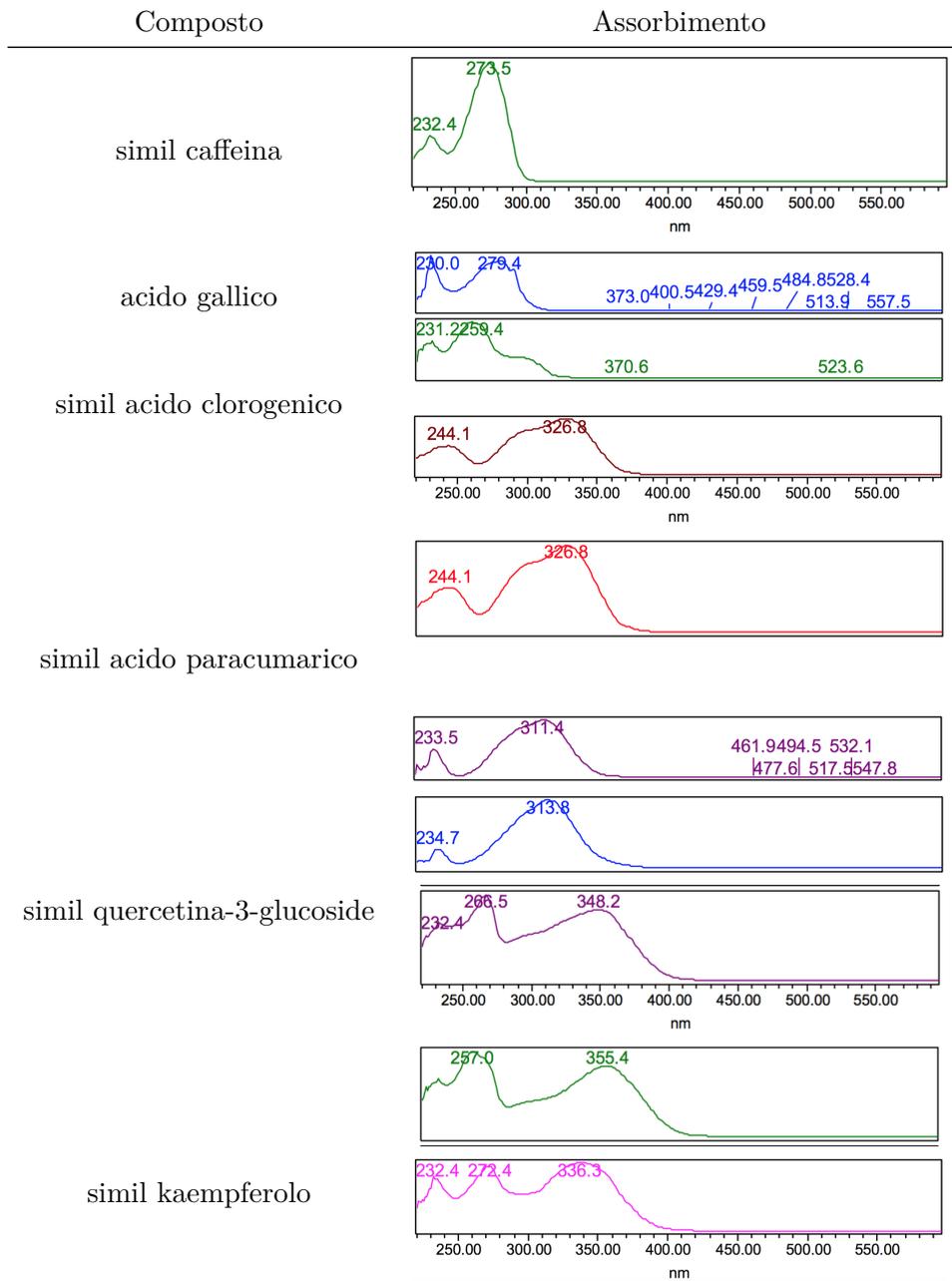
### C.1 Ceylon Orange

#### C.1.1 Ceylon Orange Ottimizzato

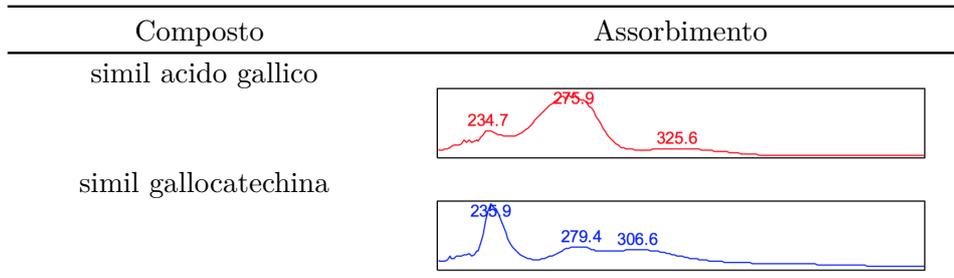
### Metodo: Catechine



# Metodo: Catechine

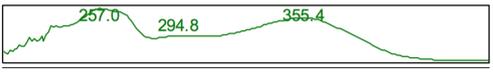
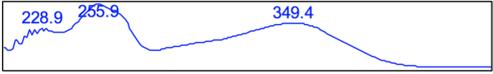


## Assorbimenti a 340 nm

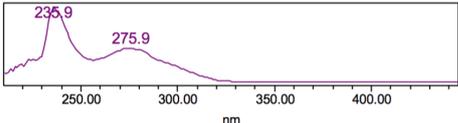
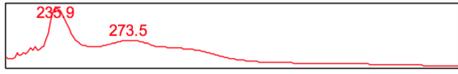
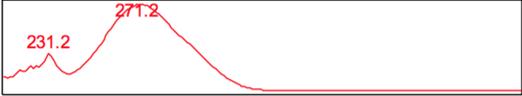
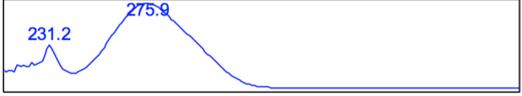


Continua nella prossima pagina

Assorbimenti a 340 nm

Composto	Assorbimento
simil acido paracumarico	
simil acido clorogenico	
quercetina-3-glucoside	
simil quercetina	

Metodo: Acidi Fenolici

Composto	Assorbimento
simil epigallocatechina-3-gallata	 
simil galocatechina-3-gallata	
acido gallico	
simil acido gallico	
simil acido clorogenico	
simil caffeina	

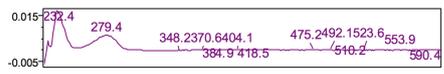
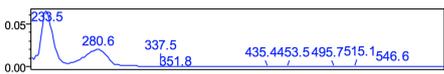
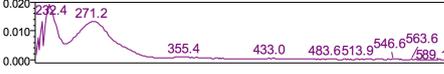
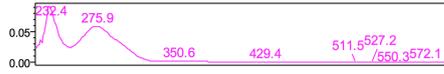
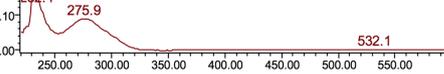
Continua nella prossima pagina

Composto	Assorbimento
simil quercetina	
simil kaempferolo	
acido clorogenico	
kaempferolo	
simil (epi)catechina	
simil caffeina	
simil acido paracumarico	
simil acido caffeico	
simil acido caffeoilchinico	
quercetina-3-glucoside	
simil quercetina	

*Si conclude dalla pagina precedente*

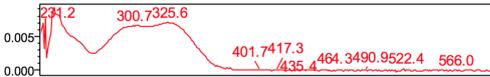
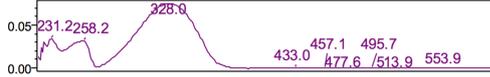
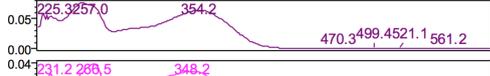
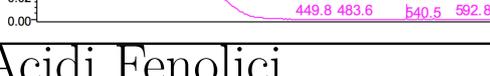
### C.1.2 Ceylon Orange Convenzionale

## Metodo: Catechine

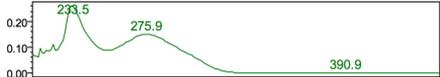
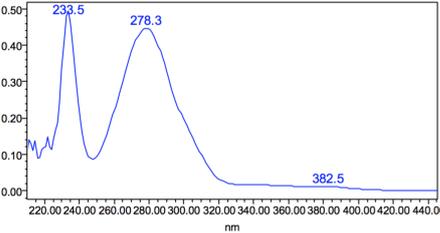
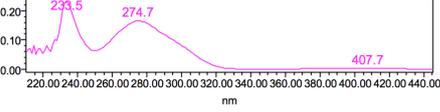
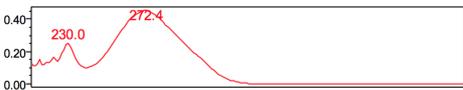
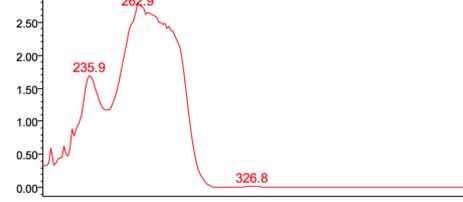
Composto	Assorbimento
catechina	
(epi)catechina	
epigallocatechina-3-gallata	
simil epigallocatechina-3-gallata	
(epi)catechina-3-gallata	
galocatechina-3-gallata	
galocatechina	
simil galocatechina	
caffeina	
simil caffeina	

*Continua nella prossima pagina*

Assorbimenti a 340 nm

Composto	Assorbimento
simil acido clorogenico	
simil epigallocatechina-3-gallata	
simil acido paracumarico	
quercetina-3-glucoside	
	

Metodo: Acidi Fenolici

Composto	Assorbimento
simil epigallocatechina-3-gallata	
	
simil (epi)catechina-3-gallata	
	
acido gallico	
acido clorogenico	
simil caffeina	

Continua nella prossima pagina

---

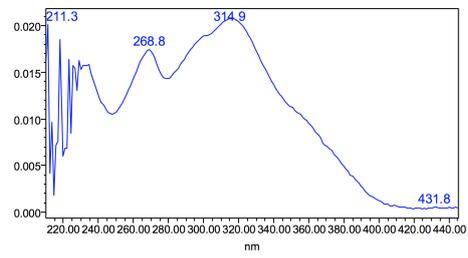
# Metodo: Acidi Fenolici

---

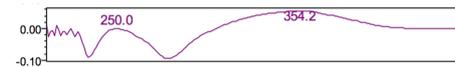
Assorbimenti a 340 nm

---

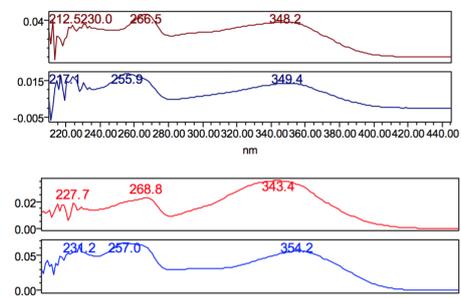
simil acido paracumarico



quercetina-3-glucoside



simil quercetina



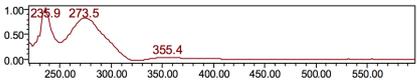
---

*Si conclude dalla pagina precedente*

## C.2 South Indian

### C.2.1 South Indian Ottimizzato

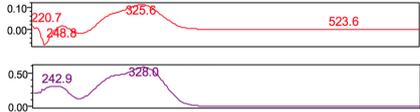
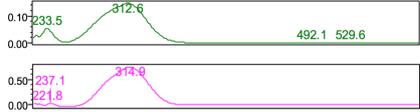
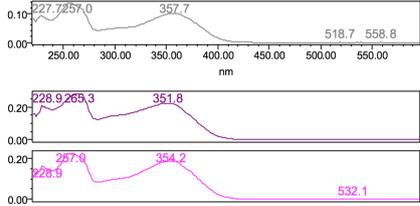
#### Metodo: Catechine

Composto	Assorbimento
(epi)catechina	
epigallocatechina-3-gallata	
simil epigallocatechina-3-gallata	
(epi)catechina-3-gallata	
gallocatechina-3-gallata	
gallocatechina	
caffaina	
simil-acido gallico	
simil-acido clorogenico	
simil acido paracumarico	
	

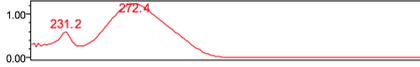
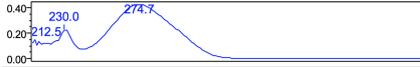
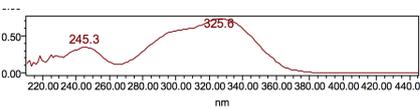
*Continua nella prossima pagina*

## Metodo: Catechine

Assorbimenti a 340 nm

Composto	Assorbimento
simil-acido clorogenico	
simil epicatechina-3-gallata	
simil acido paracumarico	
simil quercetina	

## Metodo: Acidi Fenolici

Composto	Assorbimento
acido gallico	
acido gallico	
acido clorogenico	
simil acido clorogenico	

*Continua nella prossima pagina*

# Metodo: Acidi Fenolici

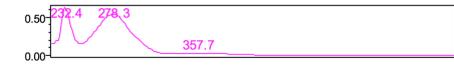
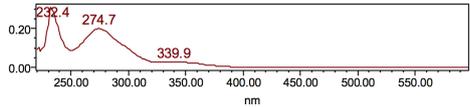
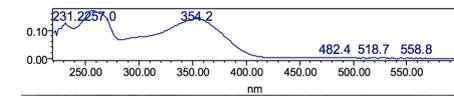
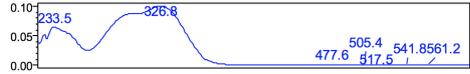
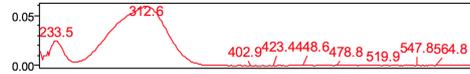
Composto	Assorbimento
simil acido paracumarico	
simil acido protocatecuico	
simil quercetina	
simil catechina	
simil catechina-3-gallata	

## Assorbimenti a 340 nm

simil catechina	
simil acido paracumarico	

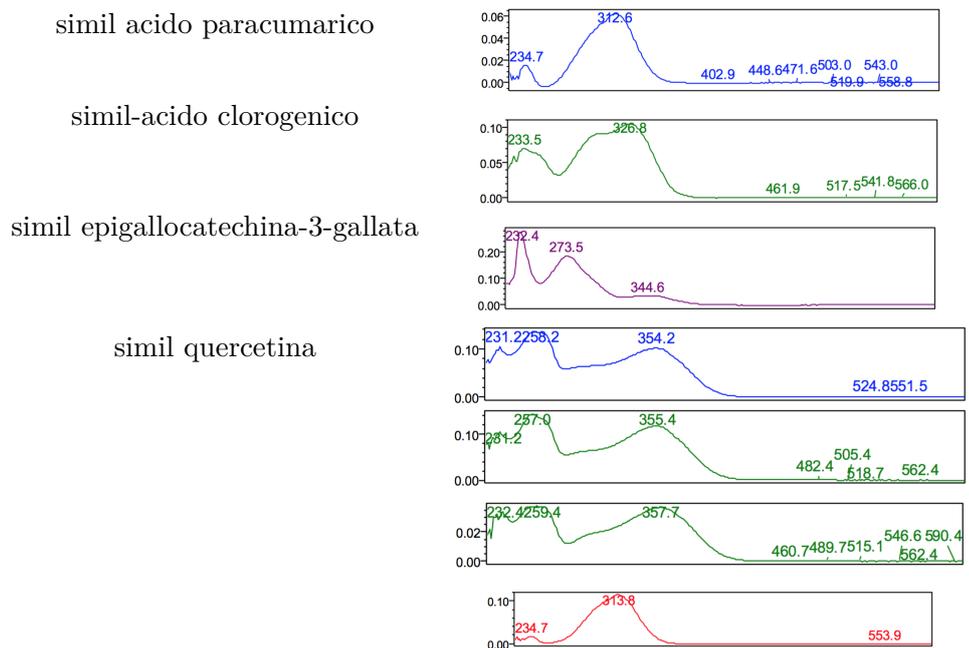
### C.3 South Indian Convenzionale

## Metodo: Catechine

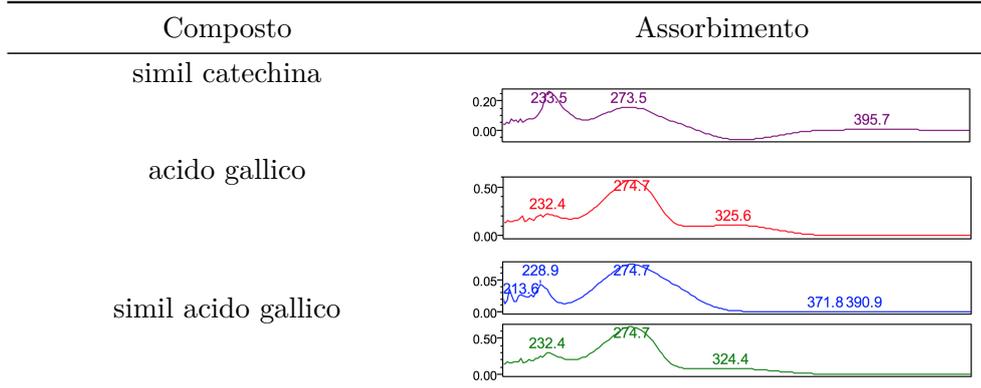
Composto	Assorbimento
(epi)catechina	
epigallocatechina-3-gallata	
(epi)catechina-3-gallata	
gallocatechina-3-gallata	
gallocatechina	
caffaina	
simil quercetina	
simil-acido gallico	
	
simil-acido clorogenico	
simil acido paracumarico	
	

*Continua nella prossima pagina*

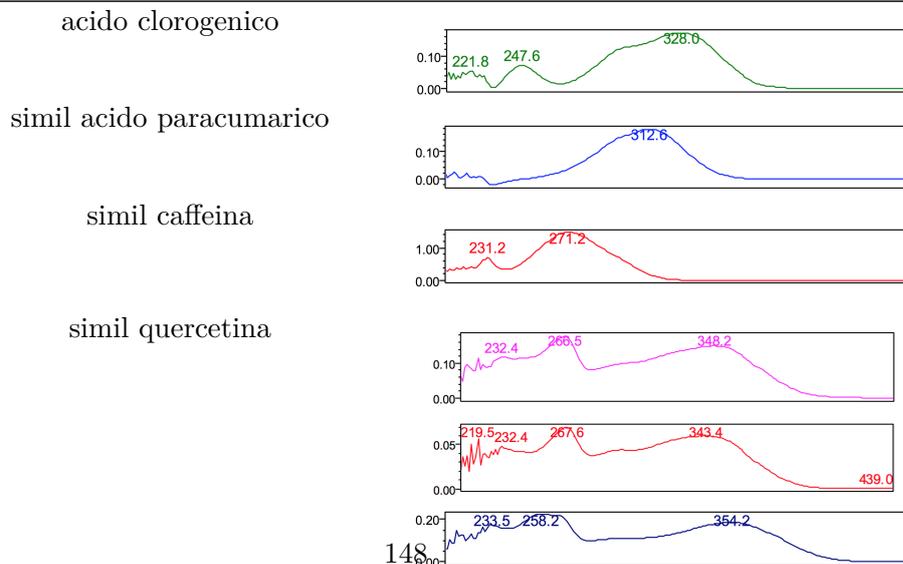
Assorbimenti a 340 nm



Metodo: Acidi Fenolici



Assorbimenti a 340 nm



## C.4 Analisi Qualitativa LC-MS/MS - Institute of Wood Chemistry (IWC, Lettonia), Prof. Telysheva, G.

### C.4.1 Ceylon Orange

Picco No	R <sub>t</sub> min	[M-H] <sup>-</sup> [uma]	Composto
1	0,33	191	Acido quinic
2	0,35	179	Acido caffeico
3	0,48	353	Acido caffeoilchinico
4	1,02	196	Acido Gallico
5	1,32	343	Acido galloil chinico / epossinico
6	1,92	305	Epigallocatechina
7	2,24	761	(Epi)gallocatechin-O-gallata
8	2,85	759	Dimero derivato da procianidina
9	3,20	353	Acido caffeoilchinico
10	3,78	337	Acido cumaroilchinico
11	3,88	457	Epigallocatechina-3-gallata
12	4,31	595	Derivati catechina
13	4,73	337	Isomero acido cumaroilchinico
14	6,34	441	(Epi)catechina-3-O-gallata
15	6,65	593	Vitexin-O-glucoside
16	6,75	609	Rutina
17	6,87	593	Canferol-3-O-glucoside-7-ramnoside
18	2,79	289	Catechina

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