

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

SCUOLA DI SCIENZE

**Corso di laurea magistrale in
Analisi e Gestione dell'Ambiente**
Classe LM-75 Scienze e Tecnologie per l'Ambiente e il Territorio

**Estrazione di principi attivi da scarti agro-
industriali mediante protocolli sostenibili**

Tesi in Biocarburanti e Bioraffinerie

Relatore

Prof.ssa Chiara Samorì

Presentata da

Lorenzo Piccinini

Correlatore

Prof. Andrea Pasteris

Sessione Anno Accademico 2016 – 2017

Indice

1. Introduzione

1.1. Biomassa residuale da processi di vinificazione

1.1.1. Vantaggi associati all'uso di biomassa da scarti viti-vinicoli

1.1.2. Composti bioattivi presenti nella biomassa residuale da processi di vinificazione

1.1.2.1. Attività antiossidante dei polifenoli

1.1.2.2. Acidi grassi polinsaturi (PUFA)

1.2. Applicazioni commerciali

1.2.1. Digestione anaerobica e produzione di biocarburanti

1.2.2. Agricoltura

1.2.3. Cosmesi

1.2.4. Nutraceutica

1.2.5. Alimentazione animale

2. Scopo della tesi

3. Applicazione di metodiche alternative per l'estrazione di composti bioattivi da biomassa residuale da processi di vinificazione

3.1. Dimetilcarbonato (DMC)

3.2. Deep Eutectics Solvents (DES)

4. Risultati e discussione

4.1. Caratteristiche e composizione generale della biomassa residuale di interesse

4.1.1. Analisi elementare e del contenuto organico

4.1.2. Analisi dei lipidi

4.1.3. Analisi dei polifenoli

4.2. Estrazione di composti bioattivi con metodologie green

4.2.1. Estrazione di lipidi con dimetilcarbonato

4.2.2. Pretrattamento della biomassa con DES e successiva estrazione di acidi grassi con DMC

4.2.3. Estrazione di polifenoli con DES e test di attività antiossidante

4.3. Preparazione di gel bio-based arricchiti in polifenoli

4.4. Test di tossicità degli estratti polifenolici

4.4.1. Test su *Daphnia magna*

4.4.2. Test su *Raphidocelis subcapitata*

4.4.3. Test di pronta biodegradabilità in acqua

5. Conclusioni

5.1. Prospettive future

6. Materiali e metodi

6.1. Composti chimici

6.2. Materiali

6.3. Metodi

Bibliografia

1. introduzione

Le biomasse sono fonti energetiche rinnovabili che si distinguono dalle altre fonti rinnovabili (come per esempio eolico, solare, geotermico) in quanto l'energia disponibile è stoccata nei legami chimici presenti nelle varie molecole che la compongono. Questo fa sì che siano fonte di energia ma anche di composti chimici di base (platform chemicals) o alto valore aggiunto e di biomateriali.

Al momento la maggior parte della biomassa viene ancora utilizzata per la produzione di energia elettrica e termica attraverso l'uso di processi di digestione anaerobica e combustione e solo una piccola parte viene dedicata alla produzione di biocombustibili e molecole organiche; questo avviene in quanto le bioraffinerie esistenti non dispongono di tecnologie mature ed efficienti in grado di competere con i processi petrolchimici.

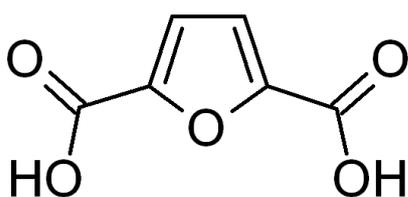


Figura 1 acido 2,5-furandicarbossilico

Attualmente si tende a produrre dalla biomassa gli stessi platform chemicals ottenuti da fonti fossili, come per esempio etilene, usato come precursore per la produzione di polimeri, ed etanolo. Questo comporta una competizione diretta tra il costo dei prodotti finali, del processo di trasformazione, delle infrastrutture e della materia prima. Una nuova strategia che può rivelarsi vincente consiste invece nella conversione della biomassa in nuovi composti chimici differenti rispetto ai platform chemicals ottenibili da fonti fossili, in modo da eliminare la competizione diretta tra i prodotti.

Affinché questo approccio possa risultare economicamente vantaggioso è fondamentale sviluppare nuove tecnologie ed un nuovo mercato per questi prodotti; un esempio di questo approccio è la produzione dell'acido 2,5-furandicarbossilico (Figura 1) e del chetale dell'acido levulinico, entrambi ottenuti per deidratazione di esosi presenti nella biomassa lignocellulosica.

Ad oggi gli incentivi nell'uso di biomassa per la produzione di composti chimici sono:

1. La crescente sensibilizzazione dei consumatori verso i prodotti cosiddetti "green" e rinnovabili, e di conseguenza la loro crescente richiesta sul mercato
2. La maggior facilità nell'ottenere platform chemicals più simili, per funzionalità e grado di ossidazione, ai prodotti finali d'interesse rispetto a quelli ottenibili da fonti fossili e più competitivi sul mercato come per esempio l'acido furan-dicarbossilico, l'acido levulinico o l'acido lattico
3. La necessità da parte del mondo industriale di adeguarsi alle normative che prevedono la riduzione della dipendenza da fonti fossili per limitare sia l'impatto ambientale che il cambiamento climatico

Sono quindi fattori economici, sociali e politici a spingere verso la ricerca di alternative più sostenibili e a minor impatto ambientale rispetto alle fonti fossili. Tuttavia in un'ottica di un miglioramento l'uso di biomassa al posto di fonti fossili deve essere accompagnato dall'uso di processi sostenibili e sicuri per l'uomo e l'ambiente, seguendo una filosofia di Chimica Sostenibile o Green Chemistry.

La Green Chemistry si basa su un insieme di 12 principi, il cui obiettivo è quello di eliminare o ridurre al minimo l'uso e la produzione di composti chimici tossici e pericolosi per l'uomo e l'ambiente, che ogni ricercatore dovrebbe applicare nella fase di sviluppo di un processo chimico:⁵⁹

1. Prevenzione: è meglio prevenire la formazione di rifiuti piuttosto che trattarli una volta prodotti
2. Atom Economy: progettare metodi di sintesi chimica che massimizzino l'incorporazione di tutti i materiali usati nel prodotto finale
3. Sintesi meno pericolose: quando possibile i metodi di sintesi devono essere progettati per usare e produrre sostanze che siano poco o per niente tossiche nei confronti dell'uomo e dell'ambiente
4. Progettazione di composti chimici più sicuri: i prodotti chimici devono essere progettati affinché mantengano la loro efficacia riducendo allo stesso tempo la loro tossicità

5. Utilizzo di solventi ed ausiliari più sicuri: l'uso di sostanze ausiliarie deve essere evitato quando possibile e se usate devono essere innocue
6. Efficienza energetica: il consumo di energia nel corso delle reazioni chimiche deve essere ridotto al minimo e se possibile, progettare metodi sintetici che avvengano a temperatura e pressione ambiente
7. Uso di fonti rinnovabili: usare biomasse o materia prima rinnovabile quando tecnicamente ed economicamente possibile
8. Ridurre le derivatizzazioni: derivatizzazioni non necessarie devono essere evitate o ridotte al minimo quando possibile perché questi passaggi richiedono l'uso di ulteriori reagenti che possono generare rifiuti
9. Catalisi: reagenti catalitici (il più selettivi possibile) sono da preferirsi a reagenti stechiometrici
10. Progettazione di composti chimici biodegradabili: i prodotti chimici devono essere progettati affinché alla fine della loro funzione si scompongano in sottoprodotti innocui e non persistenti.
11. Analisi Real-time analysis per prevenire l'inquinamento: le metodologie analitiche devono essere ulteriormente sviluppate per permettere un controllo in tempo reale prima della formazione di composti tossici
12. Chimica sicura per prevenire gli incidenti: le sostanze usate in un processo chimico devono essere scelte per minimizzare la possibilità che si verifichino incidenti chimici

L'estrazione di composti chimici ad alto valore aggiunto da biomassa rappresenta già un mercato importante nei settori farmaceutico (chitosano usato come veicolo per farmaci o per la produzione di fili da sutura e pelle sintetica) , cosmetico (sieri e creme arricchiti in chitosano ed estratti polifenolici), nutraceutico (coloranti derivati da biomassa, conservanti, texture modifiers e integratori alimentari) e agricolo (insetticidi a base di piretro); affinché i processi di estrazione possano essere definiti sostenibili è importante che si faccia uso di tecnologie ad elevata efficienza energetica e che si basano su solventi a basso impatto ambientale ottenuti preferibilmente da fonti rinnovabili.

1.1. Biomassa residuale da processi di vinificazione

La vite comune (*Vitis vinifera*) è un arbusto rampicante appartenente alla famiglia delle Vitaceae e rappresenta il tipo di vite con maggior diffusione delle colture (viene coltivata in tutti i continenti ad eccezione dell'Antartide). Il portamento naturale è irregolare e presenta una ramificazione rada e molto sviluppata in lunghezza, mentre se coltivata il portamento viene determinato dal sistema di potatura. Il frutto è una bacca chiamata acino, il colore di un acino maturo varia dal verde al giallo, dal roseo al rosso-violaceo e dal nero al nero-bluastro. La forma degli acini è in genere sferica, subsferica, ellittica o ovoidale, ma in alcuni vitigni può essere anche marcatamente allungata fino ad assumere una forma cilindrica o arcuata. Lo sviluppo del grappolo, in termini di peso o di lunghezza, varia sensibilmente secondo il vitigno e secondo le condizioni ambientali e nutrizionali. È una pianta caducifoglie che entra in riposo vegetativo durante la stagione fredda, la ripresa vegetativa ha luogo in primavera e si manifesta con il germogliamento: in questa fase le gemme dormienti si rigonfiano provocando la divaricazione delle perule che poi cadono lasciando fuoriuscire i germogli. L'epoca del germogliamento dipende dalle condizioni climatiche, dalla precocità sia del vitigno sia del portinnesto e, infine, dalla vigoria del ceppo. In generale i ceppi più vigorosi sono più tardivi. In Italia il germogliamento può avviarsi in un arco temporale che si estende dagli inizi di marzo, nelle regioni più calde e con vitigni precoci, agli inizi di maggio, nelle regioni del nord con vitigni tardivi.

Il ciclo riproduttivo di *Vitis vinifera* si compone di vari passaggi, la fase finale di questo ciclo è la maturazione. L'epoca di maturazione varia in base a fattori geografici, climatici e varietali, con un intervallo temporale piuttosto ampio; durante la maturazione nell'acino avvengono i seguenti cambiamenti: ¹

1. Accumulo di glucosio e fruttosio e stabilizzazione del rapporto tra i due in quantità 1:1
2. Riduzione dell'acidità totale e spostamento del rapporto quantitativo tra gli acidi con prevalenza finale dell'acido tartarico
3. Riduzione in peso dei vinaccioli

La composizione in acidi polinsaturi e tannini nei vinaccioli, antociani, terpeni e flavonoli nella buccia e, acido tartarico, malico e citrico nella polpa dell'acino è fortemente condizionata da fattori esterni come: la varietà dell'uva, il luogo geografico, le condizioni climatiche e lo stato di maturazione al momento del raccolto.

L'uva è una delle coltivazioni maggiori al mondo e circa l'80% del raccolto totale viene dedicato alla produzione di vino.⁵ La produzione mondiale di uva nel 2014 si è attestata sulle 75 milioni di tonnellate,² e la produzione globale di vino è risultata essere di 270 milioni di ettolitri; di questi 170 milioni di ettolitri sono prodotti in Europa mentre la produzione italiana si attesta a 44 229 ettolitri.³

La lavorazione dell'uva genera annualmente tutta una serie di scarti che si stima essere in Europa di 14.5 milioni di tonnellate; l'industria del vino genera infatti enormi quantitativi di vinacce (residuo della spremitura delle uve costituito da bucce e semi, generalmente senza raspo), vinaccioli (i semi dell'acino d'uva), raspi (struttura legnosa che funge da scheletro a un grappolo d'uva) e foglie i quali causano impatti ambientali negativi al momento dello smaltimento.^{6,7}

In Italia i quantitativi dei sottoprodotti dell'industria vitivinicola sono elencati nella Tabella 1

Tipologia	Fattore di produzione (Kg/hl)	Quantità (t)
vinaccia	18	925 800
Raspi	4	205 700
Solidi e Fecce	6	308 600
Fanghi	1	51 400

Tabella 1 scarti del settore vitivinicolo a livello nazionale per l'anno 2001⁴

1.1.1. vantaggi associati all'uso di biomassa da scarti vitivinicoli

Da sempre i sottoprodotti della vinificazione non vengono trattati come semplici scarti ma vengono inseriti in una filiera di riutilizzo, classicamente le vinacce vengono sparse sui campi, compostate, distillate, usate per la produzione di acido tartarico, cremor tartaro (bitartrato di potassio) e coloranti, addizionate in mangimi per animali o destinate alla produzione di energia. Dai vinaccioli invece si estrae l'olio che viene poi usato in nutraceutica e in cosmetica.⁹

Negli ultimi anni è aumentato l'interesse verso specifici composti che possono essere ricavati dai sottoprodotti dell'industria vitivinicola, questo unito all'interesse da parte delle industrie vinicole alla riduzione degli impatti dei loro prodotti e all'abbattimento del volume dei rifiuti e dei loro costi di smaltimento ha portato ad un interesse maggiore nella ricerca per una valorizzazione più efficiente di questi sottoprodotti ricchi in sostanze ad elevato valore aggiunto. Infatti nelle vinacce esauste e nei vinaccioli si possono trovare diversi composti bioattivi tra cui: proteine, polifenoli e acidi grassi polinsaturi che trovano impiego in molte applicazioni in vari campi come per esempio cosmetica e nutraceutica. Diventa quindi importante lo sviluppo di metodi che consentano di usare completamente, in larga scala ed in economia questi sottoprodotti.⁵

Più in generale gli scarti vitivinicoli possono essere valorizzati seguendo diverse strategie, questo grazie alle loro caratteristiche chimiche e alla presenza di una grande varietà di composti ad alto valore aggiunto.¹²

Un altro vantaggio nell'uso, in aggiunta ai vantaggi economici per le aziende dati dalla riduzione dei costi di smaltimento e dai guadagni della vendita di prodotti chimici, risiede nella gran quantità di biomassa prodotta dalle aziende vinicole, che può essere utilizzata per produrre biomolecole sia non ottenibili da fonti fossili sia attraverso vie sintetiche alternative che ne evitano l'uso.

1.1.2. Composti bioattivi presenti nella biomassa residuale da processi di vinificazione

Con il termine “bioattivo” viene indicato un composto biologicamente attivo, cioè in grado di avere un effetto benefico sulla salute degli organismi viventi. Alcuni esempi comuni sono le vitamine e i carotenoidi.⁵² La biomassa residuale dei processi vitivinicoli rappresenta una fonte molto varia di composti bioattivi (Tabella 2), tra questi molti hanno potenziali applicazioni in vari ambiti tra cui quello medico e nutraceutico come per esempio acidi grassi poliinsaturi (PUFAs), pigmenti, proteine, composti fenolici e vitamine che possono essere somministrati sia nel sottoprodotto tale (vinaccia esausta) che in forma nutraceutica o di farmaco.

COMPOSTI BIOATTIVI ESTRATTI DA SOTTOPRODOTTI VITIVINICOLI	
	Resveratrolo
	Catechina
	Epicatechina
	Acido Gallico
	Acido tartarico
	Acido oleico
	Acido linoleico
	Vitamina E
	Melanina
	Proantocianidine

Tabella 2 singole componenti di interesse cosmetico estraibili da sottoprodotti dell'attività vitivinicola ⁵

1.1.2.1. attività antiossidante dei polifenoli

Lo stress ossidativo, causato da uno squilibrio tra sistemi antiossidanti e la produzione di ossidanti comprese le specie reattive dell'ossigeno (ROS), sembra essere associato a molte malattie multifattoriali, in particolare i tumori, le malattie cardiovascolari e le patologie infiammatorie. L'infiammazione cronica è ampiamente riconosciuta come una delle principali cause alla base di varie malattie degenerative.

È stato riferito come estratti di erbe con alti livelli di composti fenolici e flavonoidi presentano forti attività antiossidanti e antiinfiammatorie. Pertanto, si ritiene che frutta e verdura contenenti significative quantità di antiossidanti possano avere effetti benefici sulla salute, contrastando lo stress ossidativo riducendo così le malattie croniche. Questi antiossidanti si trovano principalmente sotto forma di composti fenolici come flavonoidi, acidi fenolici, stilbeni, tocoferoli, tocotrienoli, acido ascorbico e carotenoidi. Recentemente, i composti fenolici hanno ricevuto molta attenzione riguardo alla loro effettiva capacità antiossidante; i loro effetti benefici sono attribuiti alla loro capacità di donare elettroni, allo scavenging dei radicali liberi e al loro potere riducente. Inoltre, gli antiossidanti naturali hanno la capacità di migliorare la qualità e la stabilità degli alimenti e, nell'ambito della nutraceutica, possono agire anche come composti che interrompono le reazioni a catena dei radicali liberi nei sistemi biologici e pertanto possono fornire ulteriori benefici per la salute ai consumatori.¹⁰⁰

I sottoprodotti dell'attività vitivinicola e in particolare le vinacce e i vinaccioli presentano un notevole potenziale per essere utilizzati come fonti di antiossidanti naturali poiché contengono la maggior parte (se non tutti) dei composti polifenolici con dimostrate qualità antiossidanti che solitamente si ritrovano nei vini.

Il potenziale antiossidante degli estratti recuperati dai sottoprodotti della lavorazione dell'uva dovrebbe essere valutato stimando il contributo sia dei fenoli totali che di particolari frazioni fenoliche. Non solo la quantità, ma anche la composizione fenolica è importante, poiché i composti fenolici potrebbero avere un effetto sinergico o antagonistico sulla capacità antiossidante complessiva del substrato. Diversi tipi di composti fenolici sono in grado di donare atomi di idrogeno e contribuire a reazioni di ossidoriduzione in modo differente.¹⁰¹

1.1.2.2. Acidi grassi polinsaturi (PUFA)

I sottoprodotti dell'attività vitivinicola sono importanti fonti di composti chimici ad alto valore commerciale, tra cui i PUFAs. La porzione lipidica consiste infatti principalmente di acidi grassi poliinsaturi (PUFAs) ω -3 e ω -6 come l'acido oleico, l'acido linoleico, l'acido stearico e l'acido palmitico (figura 3). È stato dimostrato che i PUFAs sono essenziali per l'appropriato funzionamento del corpo umano e per la sua salute grazie alle loro proprietà antibatteriche, antifunginee e antiossidanti.⁹⁴ Inoltre sono particolarmente importanti per mantenere sani i tessuti in cui vengono incorporati ed è per questa ragione che sono già presenti sul mercato prodotti alimentari additivati con acidi grassi polinsaturi (es. latte di mucca arricchito in ω -3 figura 2).



Figura 2 esempio di prodotto arricchito con acidi grassi ω -3

L'acido oleico e l'acido linoleico trovano ampie applicazioni in cosmesi come rivitalizzanti e anti-età per la pelle, grazie alla loro capacità di stimolare la rigenerazione dei tessuti. Altri acidi grassi essenziali quali ad esempio l'acido eicosapentenoico e l'acido docosaesanoico sono stati riconosciuti dall'FDA (U.S. Food and Drug Administration) come composti in grado di ridurre il rischio di malattie cardiovascolari, artrite e ipertensione, inoltre giocano un ruolo importante nell'abbassamento del contenuto lipidico sanguigno, riducendo la quantità di trigliceridi e aumentando l'HDL e hanno un effetto antiinfiammatorio

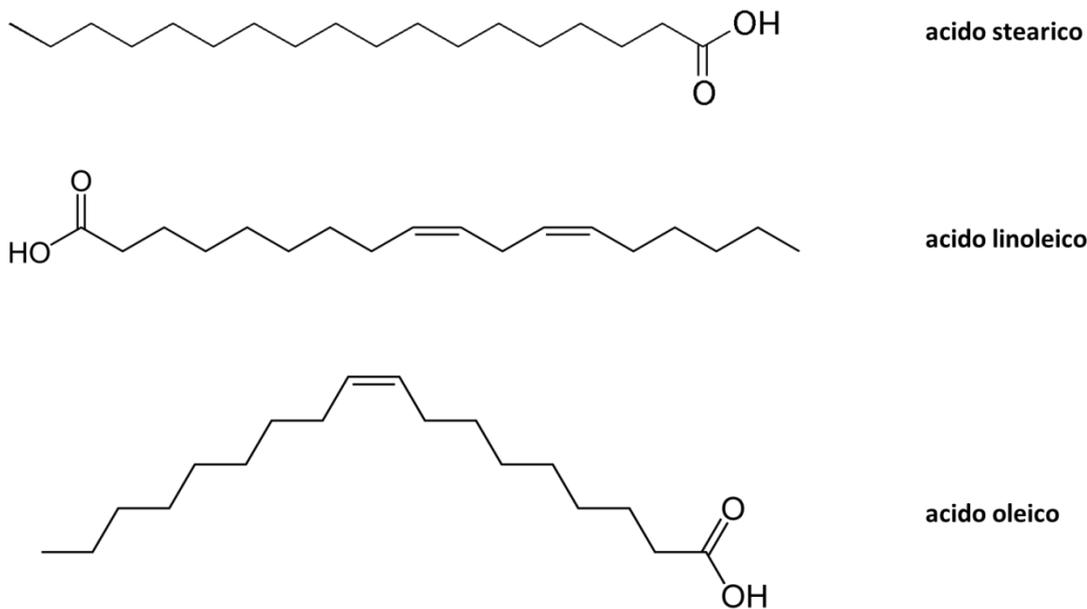


Figura 3 acidi grassi poliinsaturi (PUFAs)

1.2. Applicazioni Commerciali

1.2.1. Digestione anaerobica e produzione di biocarburanti

La digestione anaerobica è particolarmente adatta a trattare gli scarti vitivinicoli in quanto questi presentano un alto contenuto di materia organica ricca in nutrienti ed un potenziale energetico notevole. La digestione anaerobica viene considerata un importante contributo alla futura produzione energetica europea e gli scarti vitivinicoli rappresentano un substrato consistente per questa applicazione. Si stima inoltre che l'uso appropriato di biogas per la generazione di energia può ridurre sia l'emissione in atmosfera di gas effetto serra che il rilascio di metano biogenico.

Nella produzione di bioenergia da sottoprodotti vitivinicoli tuttavia bisogna tenere in considerazione la variabilità della biomassa utilizzata, in quanto differenti caratteristiche del substrato portano a differenti risultati nella produzione di biogas. Il tipo d'uva, l'origine e i trattamenti a cui è stata sottoposta durante il processo di vinificazione sono fattori che influenzano la variabilità del substrato.¹³

Gli scarti derivanti dalle attività di vinificazione inoltre costituiscono una valida alternativa per rimpiazzare i combustibili fossili. Dalla fermentazione degli zuccheri residuali infatti si può ottenere etanolo ed inoltre l'idrolisi dei polisaccaridi complessi in zuccheri più digeribili, che avviene durante il processo di fermentazione, può portare ad un miglioramento dei valori nutrizionali di questi sottoprodotti rendendoli più idonei all'uso nell'alimentazione animale. Le vinacce sono un materiale di scarto ricco in carboidrati, la maggior parte dei quali sono monosaccaridi solubili (glucosio e fruttosio) e polisaccaridi complessi (pectine, eteroxilani, xiloglucani e cellulosa). I carboidrati solubili possono essere direttamente convertiti in etanolo attraverso fermentazione, con rese maggiori a 270 L/ton di etanolo, in alternativa la resa può essere aumentata sottoponendo le vinacce ad un pretrattamento acido e seguito da un'idrolisi enzimatica. Complessivamente la vinaccia ha potenziale per essere una biomassa competitiva per la produzione di biocarburanti, con rese che possono essere superiori anche ai 400 L/ton di etanolo.¹⁴

1.2.2. Agricoltura

La potatura della vite genera un'importante quantità di residui agricoli, che si stima essere di 1.5 tonnellate per ettaro all'anno. In un'area viticola questo può significare 1.530 milioni di tonnellate di biomassa da trattare. Una delle più grandi sfide per le regioni produttrici di vino è quello di creare delle alternative per elaborare la grande quantità di rifiuti prodotti. Gli stralci derivati dalle potature dei vigneti stanno causando ingenti problemi ambientali per quanto riguarda il loro smaltimento. A causa della loro bassa densità e dei prezzi elevati per il trasporto la valorizzazione delle potature della vite è da sempre considerata un'operazione molto difficoltosa e fino a poco tempo fa questi scarti venivano abbandonati nei campi, dal momento che presentavano un basso potenziale di riuso in altri scopi; alternativamente (ma in misura molto minore) venivano triturati e inglobati come concimi organici nel terreno della vigna.³⁹ Pratica invece più comune era quella di disfarsene disponendoli in grandi pile e bruciandoli direttamente sui campi dopo la potatura, causando il rilascio in atmosfera di anidride carbonica ed altri composti tossici derivati dalla combustione

della lignina, dei carboidrati o di componenti esogeni usati come trattamenti fitosanitari.⁶⁰

Negli ultimi anni la popolarità dei pellet in legno come combustibile per il riscaldamento è aumentata esponenzialmente, grazie anche alla loro efficienza energetica e, benché questi possano essere sostituiti da altre fonti di energia, l'uso delle potature della vite per la produzione di pellet rappresenta una opzione interessante per il riuso di questa biomassa.^{40, 41}

1.2.3. cosmesi

Gli effetti benefici dei composti bioattivi dell'uva sono conosciuti da molto tempo, tuttavia il riutilizzo dei sottoprodotti apre nuove ed interessanti opportunità nella conversione di questi in fonti alternative di ingredienti naturali ad alto valore aggiunto per l'industria cosmetica.⁸

Negli ultimi anni la richiesta di cosmetici a base di ingredienti naturali è in forte aumento (green cosmetics),¹⁰ le vinacce e i vinaccioli vengono usati in campo cosmetico per la realizzazione di oli e creme per la cura della pelle in quanto ricchi in polifenoli e acidi grassi. I primi, tra cui troviamo catechina, epicatechina, resveratrolo e proantocianidine, svolgono una funzione antiossidante, antinfiammatoria e antinvecchiamento cutaneo.⁵ Gli acidi grassi come l'acido oleico, l'acido linoleico e l'acido palmitico sono composti idratanti e antinvecchiamento (Figura 4).¹¹

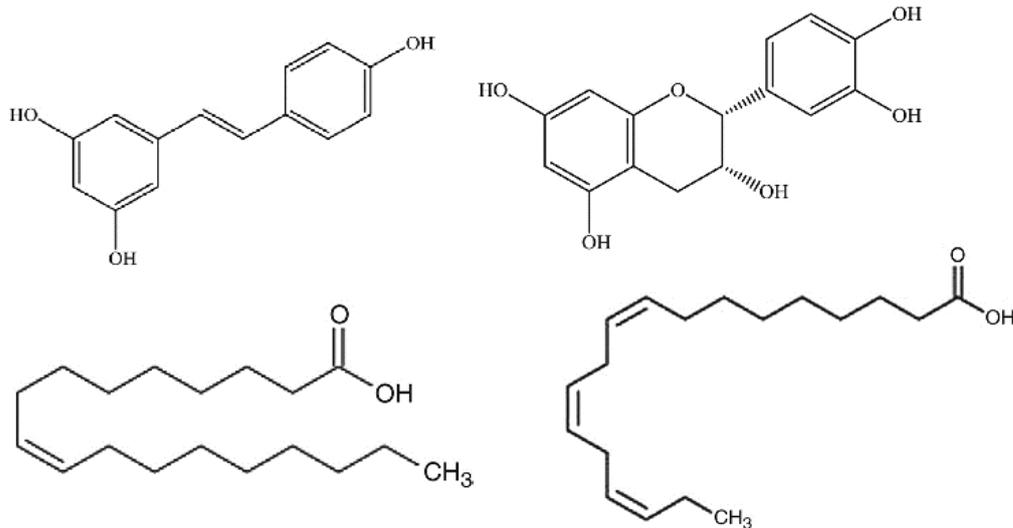


Figura 4 composti bioattivi di interesse cosmetico presenti nei sottoprodotti di attività vitivinicola. In alto resveratrolo ed epicatechina, in basso acidi oleico e linoleico

Al momento la Caudalie è l'unica azienda che produce creme cosmetiche e oli che contrastano l'invecchiamento cutaneo e riducono le rughe utilizzando composti estratti dall'uva. Nel mercato dei cosmetici prodotti con uva o derivati dell'uva si stanno affacciando anche altre aziende, basate soprattutto nei paesi produttori d'uva, come la Uvas Frescas, la Douro SkinCare e la Merlot Natural Grape Seed Skin Care. Tuttavia, nessuna di queste aziende usa sottoprodotti vitivinicoli o estratti.

1.2.4. Nutraceutica

Composti bioattivi estratti dalla vinaccia ed altri sottoprodotti vitivinicoli possono essere usati per produrre prodotti innovativi in campo alimentare in grado di offrire una fonte di ingredienti "health-promoting", come per esempio antiossidanti naturali, coloranti, antimicrobici agenti modificatori di consistenza e ingredienti fortificanti.

Gli antiossidanti derivati da fonti naturali possono ritardare l'auto ossidazione delle componenti dei cibi in condizioni di stress dovuti alla lavorazione e allo stoccaggio inibendo la formazione e la propagazione di radicali liberi, sono spesso multifunzionali e la loro attività e meccanismo di azione in un determinato cibo dipendono sia da fattori esterni come per esempio la temperatura, l'esposizione all'ossigeno e la

presenza o meno di luce sia da caratteristiche intrinseche del cibo in cui si trovano come per esempio il pH e lo stato fisico (solido, liquido, gel, etc...)²⁶

Le antocianine sono composti particolarmente promettenti come coloranti naturali grazie ai loro colori brillanti e alle loro proprietà benefiche.³⁰ Al contrario dei coloranti sintetici però che sono considerati estremamente stabili, la loro stabilità è fortemente condizionata da fattori intrinseci al cibo e dalla matrice in cui sono impiegati. Inoltre le antocianine dell'uva sono meno stabili se comparate alle antocianine provenienti da altri ortaggi (es.: cicoria, ravanelli, patate rosse, cavolo rosso, carote nere, e patate dolci viola) le quali mostrano una stabilità maggiore nei confronti delle variazioni di calore e pH.^{31, 32}

La durata di conservazione degli alimenti può essere compromessa dalla crescita di microorganismi quali *Pseudomonas*, *Lactobacillales*, *Enterobacteriaceae* ed altri batteri che riducono la qualità del cibo producendo aromi indesiderati, inacidimento, gas, viscosità e decolorazione.³³ Inoltre alcuni batteri in grado di crescere su vari cibi come *Campylobacter*, *Salmonella*, *Yersinia* ed *Escherichia* rappresentano un serio pericolo per la salute dei consumatori.^{34, 35} Generalmente l'attività antimicrobica della vinaccia è attribuita al suo contenuto in flavonoidi, acidi fenolici e stilbeni,³⁶ e la loro efficacia è in gran parte dovuta a fattori come il tipo d'uva, i trattamenti che la vinaccia ha subito, i batteri target e le proprietà chimico fisiche del cibo in cui i vari estratti sono utilizzati.^{37, 38}

La vinaccia può essere lavorata senza frazionamenti o, come avviene più comunemente, dopo una separazione della vinaccia dalle bucce e dai vinaccioli. In alcune applicazioni infatti i vinaccioli, separati dal resto della vinaccia, sono spremuti o trattati con n-esano o CO₂ supercritica per estrarne l'olio.²⁷ I vinaccioli trattati, la vinaccia e le bucce sono ancora considerati sottoprodotti riutilizzabili, in quanto ancora ricchi in polifenoli e fibre. Questi sottoprodotti sono trattati con acqua, etanolo o una miscela dei due per estrarre i polifenoli solubili, oppure vengono essiccati e micronizzati per ottenere fibre alimentari antiossidanti (ADF).^{28, 29}

Molti fattori come per esempio la varietà d'uva, il clima, le tecniche di coltivazione e le tecniche di vinificazione (es.: tempo di contatto della vinaccia con il mosto durante la fermentazione) possono influenzare la composizione finale delle vinacce. In genere i composti bioattivi che si possono trovare nella vinaccia essiccata sono:^{27, 29}

- Fibre alimentari (50% - 75% in peso)
- Polifenoli non estraibili (15% - 30% in peso)
- Polifenoli estraibili (1% - 9% in peso)
- Acidi grassi polinsaturi (10% - 17% in peso nei vinaccioli)

Specifici composti fenolici o frazioni fenoliche caratteristiche della vinaccia sono state studiate per lo sviluppo di future applicazioni nel campo della nutraceutica.

Tra i problemi uno dei più complessi è la valutazione della biodisponibilità di questi composti, anche se si crede che i composti fenolici e i loro metaboliti siano assorbiti dalle cellule in quantitativi sufficienti ed in forme prontamente disponibili tali da mostrare attività significative in vivo. L'assorbimento di composti fenolici è caratterizzato da un'estesa biotrasformazione che fa sì che le forme fenoliche presenti nel sangue siano di solito differenti da quelle presenti nei cibi. Infatti, solo una minima parte dei composti fenolici presenti nella vinaccia può essere assorbita dall'intestino tenue, mentre la maggior parte dei composti fenolici sono presenti sotto forma di esteri e glicosidi che sono idrolizzati da enzimi intestinali o dalla microflora del colon prima dell'assorbimento.

1.2.5. Alimentazione animale

I sottoprodotti dell'attività vinicola vengono considerati da sempre una potenziale fonte a basso costo per l'alimentazione animale, dal momento che richiedono pretrattamenti minimi. In generale la vinaccia è povera in energia metabolizzabile per chilogrammo di materia secca se comparata a formulati commerciali specifici per l'alimentazione animale; inoltre la vinaccia rossa ha valori nutrizionali migliori rispetto alla vinaccia bianca per via dei contenuti maggiori in materiale secco, proteine e fibre.⁴² Tuttavia per via della elevata variabilità tra metodi di lavorazione e coltivazione

delle varie varietà d'uva il valore nutrizionale della vinaccia deve essere determinato caso per caso.

In genere non si evidenzia una marcata differenza nella digeribilità tra la vinaccia rossa e la vinaccia bianca⁴³, tuttavia Baumgartel et al. suggeriscono una minor digeribilità della vinaccia rossa.⁴⁴ La presenza di polifenoli e tannini è la causa principale della scarsa digeribilità dei sottoprodotti vinicoli, questi infatti si complessano con le proteine presenti nei cibi e con gli enzimi digestivi portando all'interruzione del processo digestivo e al mancato assorbimento di nutrienti. I tannini inoltre possono interferire con l'assorbimento di minerali (es.: ferro) e causare danni al rivestimento della mucosa del tratto gastrointestinale. L'insilamento è stato usato in Europa occidentale fin dal diciannovesimo secolo come metodo efficiente per preservare la vinaccia per l'alimentazione invernale del bestiame⁴⁶ e può essere considerato una valida tecnica per migliorare i valori nutrizionali dei sottoprodotti vinicoli. Poiché la vinaccia è già acida può essere relativamente facile da insilare,⁴⁸ una buona tecnica per esempio consiste nell'insilamento in sacchi di polietilene sigillati. Tuttavia, la presenza di carboidrati solubili in acqua e di etanolo possono creare condizioni sfavorevoli alla fermentazione acido lattica e può rendersi necessario l'uso di additivi chimici (es.: acido formico, acetico o solforico) o inoculi di batteri lattici.^{45, 49} È stato dimostrato come l'insilamento della vinaccia riduce il quantitativo di composti fenolici, antocianine, saponine e tannini liberi e condensati,^{43, 45, 47} migliorandone così il valore nutrizionale.

Risultati preliminari sul trattamento della vinaccia con glicole polietilenico (PEG) hanno dimostrato come questo processo sia in grado di inattivare i tannini ed aumentarne la digeribilità in vivo; test successivi hanno confermato questi risultati, mostrando un aumento della digeribilità delle proteine in vitro; tuttavia questo trattamento si è rivelato essere antieconomico.^{45, 50, 51}

2. Scopo della tesi

L'obiettivo primario di questo lavoro di tesi è l'estrazione e la valorizzazione di composti bioattivi derivati da sottoprodotti dell'attività vitivinicola, al fine di ottenere estratti con elevato grado di purezza che possano essere usati in vari settori come per esempio agricolo, nutraceutico e cosmetico. I composti su cui è stata focalizzata l'attenzione sono gli acidi grassi polinsaturi e i polifenoli. Le biomasse testate a questo scopo sono:

- Vinaccia: di cui fa parte anche la buccia dell'uva, che ha una elevata concentrazione di composti polifenolici (flavan-3-oli, antocianine, flavonoli e stilbeni) che possono essere utilizzati come antiossidanti
- Vinaccioli: ricchi in acido linoleico (C18:2), particolarmente usato in cosmetica come composto antiaging e con un contenuto di composti polifenolici variabile tra il 5 e l'8%
- Feccia di vino in pasta: non particolarmente ricca in composti di interesse, presenta una piccolissima percentuale di lipidi e polifenoli.

Il presente lavoro è quindi stato articolato in quattro diverse fasi:

1. Estrazione e caratterizzazione della componente lipidica e polifenolica dalle varie biomasse attraverso metodologie tradizionali, al fine di: i) individuare la biomassa più ricca nelle componenti desiderate, ii) confrontare i risultati ottenuti con quelli eventualmente presenti in letteratura, iii) evidenziare la possibilità (o impossibilità) di utilizzare i sottoprodotti dell'attività vitivinicola come fonti di composti bioattivi.
2. Applicazione e messa a punto di metodiche di estrazione green per l'estrazione della frazione lipidica e polifenolica da sottoprodotti dell'attività vitivinicola al fine di ottenere estratti altamente biocompatibili e limitare il rischio di tossicità per l'uomo e per l'ambiente. A questo scopo sono stati usati solventi alternativi come dimetilcarbonato e deep eutectic solvents (DES).

3. sviluppo di nuovi gel bio-based basati su DES ChCl – urea e polisaccaridi per la formulazione di prodotti arricchiti in polifenoli da utilizzare in agricoltura come prodotti a lento rilascio
4. Caratterizzazione degli estratti ottenuti con metodiche green e test su microorganismi acquatici e alghe per stabilire la biodegradabilità e la tossicità degli estratti.

3. Applicazione di metodiche alternative per l'estrazione di composti bioattivi da biomassa residuale da processi di vinificazione

A causa della crescente consapevolezza ambientale, sono stati imposti molti standard nelle industrie in materia di riduzione e smaltimento dei rifiuti. La prevenzione è stata dichiarata come una precedente strategia di gestione dei rifiuti, ad oggi infatti alla prevenzione sono preferiti il riutilizzo o il riciclaggio.⁷³

Poiché dai sottoprodotti di lavorazione dell'uva possono essere recuperate molte molecole di interesse (es.: polifenoli, proteine, zuccheri semplici, acido tartarico, oli essenziali, pectina, emicellulosa e lignina) le industrie sono alla ricerca di una soluzione sostenibile per i loro residui. Inoltre, a seguito del crescente interesse dei consumatori in prodotti arricchiti in molecole con effetto benefico sulla salute, il recupero di biomolecole attive dai sottoprodotti dell'attività vitivinicola potrebbe essere una soluzione di gestione alternativa, in quanto queste molecole possono trovare applicazioni come additivi negli alimenti, nonché componenti preziosi nell'industria agricola, farmaceutica e cosmetica.⁷⁴

In questo scenario il processo estrattivo svolge un ruolo chiave nel recupero di biomolecole in quanto influisce sia sulla loro qualità e quantità. L'estrazione in fase solido-liquida è tradizionalmente utilizzata per ottenere composti target da differenti materiali di scarto. Questa tecnologia tuttavia richiede grandi quantità di solventi organici ed è molto energivora per via dei tempi di trattamento molto lunghi che

avvengono solitamente ad alte temperature. L'uso di solventi organici inoltre rende questa procedura inadatta per via degli effetti negativi che questi ultimi hanno sulla salute umana e sull'ambiente.^{75, 76, 77}

Per questo motivo stanno venendo studiate nuove procedure più eco-compatibili che hanno lo scopo di ridurre il quantitativo di energia utilizzato, i tempi di trattamento ed eliminare, o se impossibile ridurre al minimo, l'uso di solventi nei processi estrattivi; tra i trattamenti più promettenti si ha l'estrazione con ultrasuoni (UAE), con microonde(MAE) e con fluidi supercritici (SFE)

Ultrasound-Assisted Extraction (UAE)

L'estrazione assistita ad ultrasuoni (UAE) si basa sul fenomeno della cavitazione in cui si verifica una propagazione delle onde di pressione ad ultrasuoni e il trasferimento di massa degli estraenti è aumentato da forze di taglio elevate.⁷⁸ L'accelerazione delle diffusioni vorticosi e interne è causata da collisioni di interparticelle, alta velocità, macroturbolenza e perturbazione nelle particelle microporose prodotte dall'implosione delle bolle di cavitazione (Figura 5). Inoltre, la cavitazione vicina alla superficie del prodotto gli trasmette un rapido flusso di liquido, con conseguente rottura delle particelle, erosione e peeling in superficie. Questo effetto di esposizione delle nuove superfici aumenta ulteriormente il trasferimento di massa.⁷⁹ A causa dell'elevata superficie di contatto tra la fase liquida e quella solida (a causa della ridotta dimensione delle particelle), l'UAE è significativamente più veloce delle tecniche classiche.⁸⁰ La cavitazione acustica degli ultrasuoni (gamma di frequenza 18-40 kHz) disgrega la parete cellulare, facilitando il contatto tra il contenuto cellulare e il solvente, migliorando così il trasferimento di massa.⁸¹ Inoltre, è stato confermato che l'UAE è una delle tecniche scelte per quanto riguarda l'ottenimento di estratti vegetali ricchi di polifenoli con elevata attività antiossidante (test DPPH e ORAC).^{82, 83}

Babazadeh et. al.¹¹² ha trattato l'estrazione assistita ad ultrasuoni come metodo per aumentare le rese in polifenoli degli estratti ottenuti da vinaccia rossa.

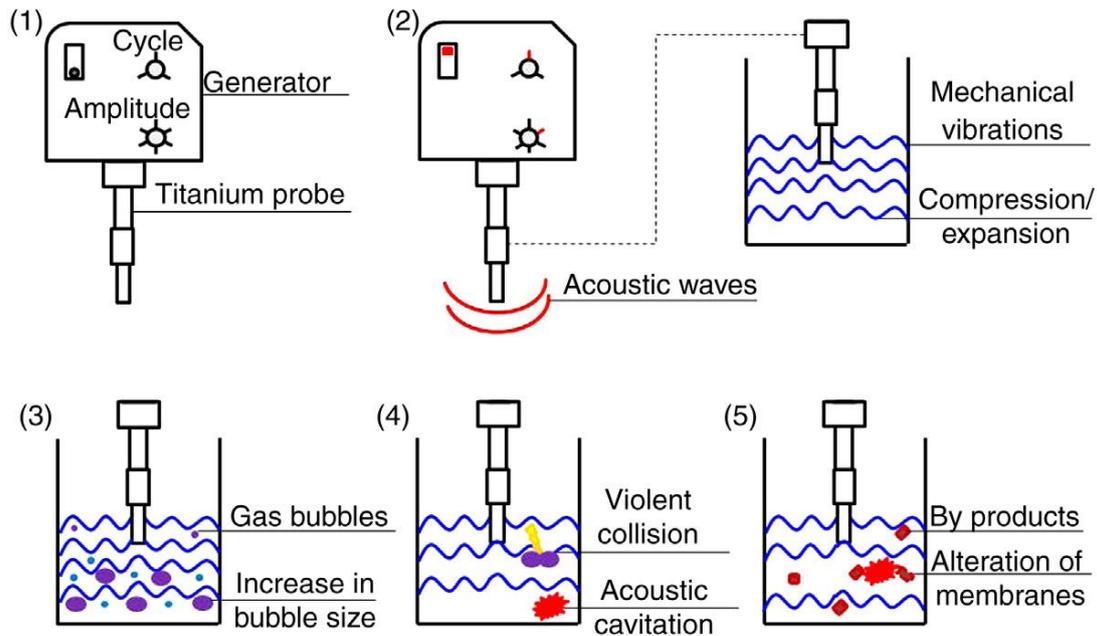


Figura 5 Ultrasound-Assisted Extraction (UAE)

Microwave-Assisted Extraction (MAE)

Le microonde sono onde non ionizzanti di natura elettromagnetica con frequenza compresa tra 300 MHz e 300 GHz. Queste onde si posizionano nello spettro elettromagnetico tra i raggi infrarossi e i raggi X. L'azione diretta di queste onde sulla sostanza è quella di trasformare l'energia elettromagnetica in energia termica. Le microonde (Figura 6) sono costituite da due campi perpendicolari oscillanti: quello magnetico e quello elettrico, responsabile del riscaldamento. L'estrazione con microonde (MAE) dipende dal processo di riscaldamento del solvente e del campione. Inoltre, è governata da due fenomeni: la rotazione di dipolo e la conduzione ionica. Per rotazione di dipolo si intende il riallineamento dei dipoli della molecola con il rapido cambiamento campo elettrico; ciò fa sì che sia materiale dielettrico che solventi con dipoli persistenti vengano riscaldati dall'azione delle microonde. Per conduzione ionica invece si intende il trasferimento degli ioni provocato dal cambiamento del campo elettrico. Di conseguenza la migrazione genera attrito (a causa della resistenza offerta dalla soluzione) responsabile del riscaldamento della soluzione.^{84, 85, 86}

L'estrazione può essere effettuata sia su matrici umide che secche, sfruttando le tracce di umidità presenti nel campione che vengono riscaldate (es. acqua contenuta nelle cellule vegetali di biomasse).⁸⁷ L'evaporazione risultante crea pressioni estremamente

elevate all'interno delle cellule che in fine causano la rottura della parete cellulare, aumentando i rendimenti di recupero di fitocondensati nel mezzo.⁸⁶

Alvarez et. al.¹⁰⁹ ha dimostrato come usando le microonde come pretrattamento per la vinaccia aumentino sia le rese di estrazione che i polifenoli totali estratti. Caldas et. al.¹¹⁰ invece osserva come le rese in polifenoli siano maggiori utilizzando metodiche che prevedano l'uso di microonde come mezzo di estrazione rispetto ai metodi di estrazione convenzionali.

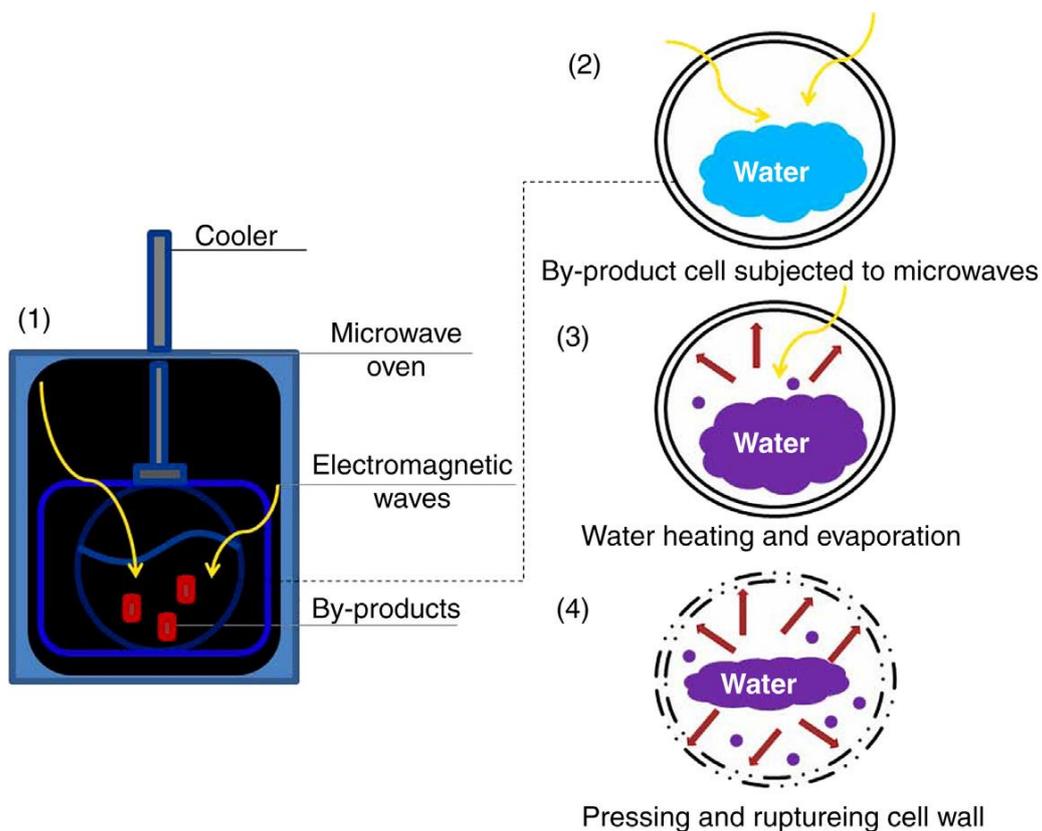


Figura 6 Microwave-assisted extraction (MAE)

Supercritical Fluid Extraction (SFE)

Il punto critico del fluido definisce la fine della curva di coesistenza vapore-liquido. Indipendentemente dalla pressione applicata, un fluido non può passare alla fase liquida a temperature superiori alla temperatura critica. Un fluido è quindi chiamato "supercritico" a qualsiasi pressione e temperatura sopra la pressione e la temperatura del punto critico. I liquidi supercritici hanno caratteristiche uniche con proprietà fisiche e chimiche intermedie tra quelle di gas e liquidi. La CO₂ è uno dei fluidi supercritici più

utilizzati per via delle sue proprietà. Si tratta di un solvente green poco costoso, ecocompatibile, non tossico, non carcinogenico e non infiammabile, con una pressione critica (74 bar) e una temperatura (31 ° C) relativamente facili da raggiungere.^{88, 89, 90} La CO₂ supercritica consente una selettività del processo di estrazione nei confronti dei composti target variando temperatura e pressione.⁹¹ La SFE assistita con CO₂ ha mostrato estratti di alta qualità con rese paragonabili a quelle recuperate da solventi organici;⁹² inoltre l'aggiunta di modificatori, come per esempio etanolo alla CO₂ aumenta la sua polarità ed efficienza, in particolare in termini di estrazione di molecole polari come i composti fenolici.⁹³

In particolare, Da Porto et. al.¹¹¹ ha approfondito le variabili e le cinetiche chimiche dell'estrazione di polifenoli da vinaccioli usando CO₂ supercritica e differenti percentuali di acqua e etanolo come cosolvente al fine di ottenere un processo che permetta il recupero di polifenoli su scala industriale.

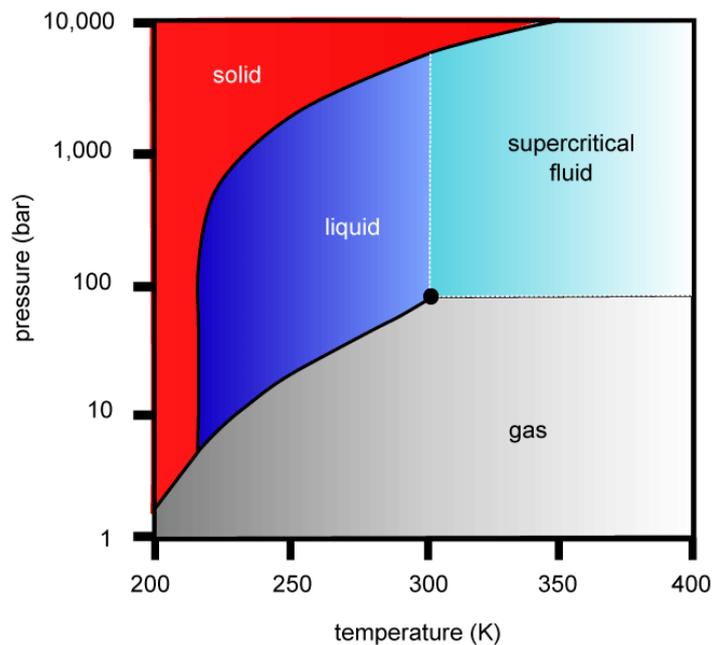


Figura 7 diagramma di fase della CO₂

3.1. Dimetilcarbonato (DMC)

Il dimetilcarbonato è l'estere metilico dell'acido carbonico avente formula $C_3H_6O_3$, è un liquido incolore ed infiammabile. Tra i suoi utilizzi figura quello come agente metilante, con il vantaggio rispetto ad altri composti quali lo iodometano e il dimetilsolfato, di essere biodegradabile e molto meno tossico. Più recentemente si è iniziato ad usarlo come solvente in quanto esente dalle restrizioni poste sulla maggior parte dei composti organici volatili (COV).²³

Il DMC si può sintetizzare facendo reagire il metanolo con fosgene o metilcloroformiato in soluzione concentrata di idrossido di sodio. Questa via sintetica però oggi non viene più adottata per via dell'elevata tossicità del fosgene ed è stata rimpiazzata da altre vie sintetiche molto più sostenibili. Industrialmente è prodotto attraverso la transesterificazione tra metanolo e propilene o etilene carbonato che inoltre genera come sottoprodotti glicole etilenico o propilenico. Un'altra via sintetica percorsa industrialmente consiste nel far reagire monossido di carbonio con metanolo ed ossigeno a formare dimetilcarbonato (Figura 8).^{23, 24}

La produzione mondiale nel 1997 è stata stimata in 158987 litri/giorno; la produzione mondiale avviene in Europa, Asia e Medio Oriente.

Nel 2009 la U.S. EPA ha rimosso dalla lista dei composti organici volatili il dimetilcarbonato,²⁵ così facendo la sua popolarità come solvente è aumentata e si è iniziato ad usarlo come sostituto per vari altri solventi più tossici.

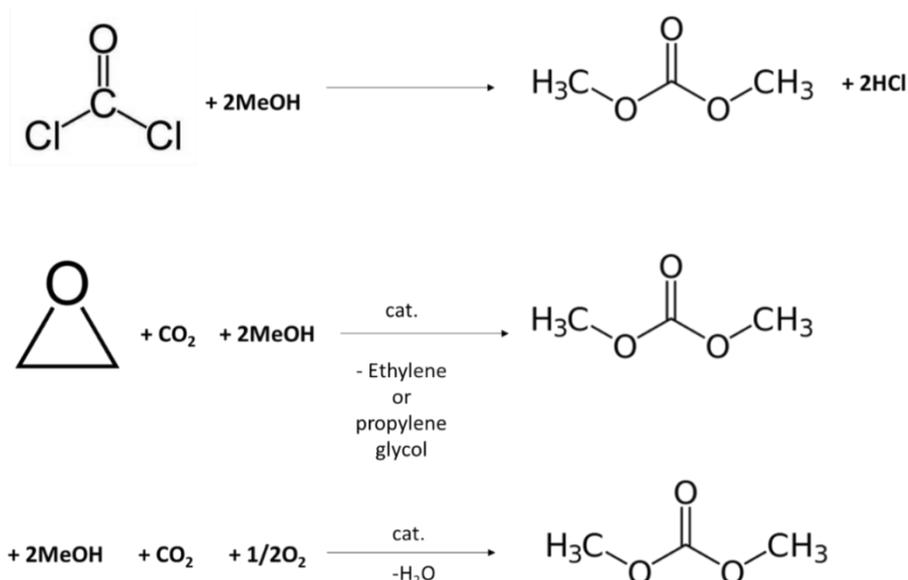


Figura 8 vie sintetiche del dimetilcarbonato

2. Deep Eutectic Solvents (DES)

I Deep Eutectic Solvents (DES) sono liquidi ionici di nuova generazione (Figura 9), studiati negli ultimi anni per superare le problematiche legate all'impiego di quelli tradizionali (prezzo elevato, difficile sintesi ed elevata tossicità).

I liquidi ionici sono coppie ioniche liquide al di sotto dei 100°C poiché costituite da cationi organici ingombrati scarsamente impaccati con piccoli anioni inorganici. Negli scorsi decenni i liquidi ionici sono stati proposti come solventi sostenibili molto promettenti; a differenza dei solventi organici infatti, i liquidi ionici hanno una tensione di vapore trascurabile e quindi tendono a non evaporare a condizioni normali di temperatura e pressione; inoltre non sono infiammabili e molti rimangono stabili a temperature maggiori dei solventi organici tradizionali. Si è quindi ipotizzato un loro ruolo



Figura 9 DES ChCl - urea

significativo per lo sviluppo della green chemistry, sostituendo solventi organici tossici, infiammabili e volatili, riducendo o prevenendo la formazione di scarti chimici e migliorando la sicurezza dei processi chimici in cui vengono adoperati. Nello specifico i liquidi ionici possono essere usati come mezzo di reazione o catalizzatore per un gran numero di reazioni e per separare composti chimici da soluzioni acquose o solventi organici. Le loro proprietà chimiche possono essere regolate scambiando anioni o cationi o miscelando due o più liquidi ionici.⁶⁵

Rispetto ai liquidi ionici i DES presentano numerosi vantaggi:

1. Basso costo
2. Inerzia in acqua
3. Facile preparazione
4. Biodegradabili, biocompatibili e non tossici

Le loro proprietà chimico-fisiche sono molto simili a quelle dei liquidi ionici tradizionali ma non possono essere considerati tali in quanto non tutte le loro componenti sono specie ioniche. I DES infatti sono costituiti da miscele di due o più componenti che interagiscono tra loro attraverso legami a idrogeno; la miscela eutettica risultante è caratterizzata da un punto di fusione inferiore a quelli delle singole componenti e generalmente rimane liquida a temperature comprese tra la temperatura ambiente ed i 70°C.¹⁵

Nella maggior parte dei casi il DES si ottiene mescolando un sale d'ammonio quaternario (es. colina cloruro) con un donatore di legami idrogeno in grado di formare un complesso con l'anione alogenuro del sale d'ammonio. Generalmente le componenti che costituiscono i DES sono biodegradabili, economiche e ottenute da fonti rinnovabili. Per esempio, la colina cloruro (ChCl), è economica (circa 150 €/kg), biodegradabile (93% in 14 giorni)¹⁶, non tossica (LD50=3500mg/kg)¹⁶ e può essere sia estratta dalla biomassa che facilmente ottenuta da fonti fossili. Per quanto riguarda i donatori di legame a idrogeno quelli più comuni sono l'urea, acidi carbossilici (es. acido citrico, ossalico etc.) e polioli (glicerolo, monosaccaridi etc.) ottenuti da fonti rinnovabili.¹⁷

Una piccola quantità di acqua può far parte della struttura supramolecolare costituita dal DES, riducendone sensibilmente la viscosità ma preservandone le caratteristiche (DES acquoso, aDES). In letteratura^{18, 19} sono riportate analisi H-NMR e H-NMR NOESY del DES in presenza di diverse concentrazioni di acqua che dimostrano la presenza della struttura supramolecolare dovuta ai legami ad idrogeno tra le componenti fino a che l'acqua non raggiunge il 43% in peso del DES (oltre la quale si ottiene una semplice soluzione delle componenti).

La polarità dei DES varia in funzione delle caratteristiche delle componenti e può risultare da più polare dell'acqua fino ad avere una polarità confrontabile a quella del metanolo. Grazie alla loro struttura supramolecolare e all'ampio range di polarità i DES sono eccellenti solventi per una gran varietà di metaboliti scarsamente o non solubili in acqua (es. polisaccaridi, proteine, DNA).

Numerose ricerche hanno dimostrato che molte miscele di metaboliti primari ottenuti da una gran varietà organismi viventi formano dei DES naturali (naDES) quando vengono mescolati in rapporti adeguati. Per esempio, si crede che la presenza dei NADES all'interno delle piante possa essere collegata alla biosintesi e accumulo di diversi metaboliti insolubili in acqua all'interno della cellula e alla protezione degli organismi dalle condizioni estreme.¹⁸

Fino ad ora le principali applicazioni dei DES riportate in letteratura²⁰ sono:

- l'elettrochimica, in cui i DES agiscono da elettroliti per l'elettrodeposizione metallica
- la biocatalisi, per alcuni enzimi (es. *Candida antarctica* lipasi B) è stato infatti osservato un aumento dell'attività enzimatica utilizzando DES come mezzo di reazione
- applicazioni biomediche, la biocompatibilità dei DES li rende adeguati per la dissoluzione e il drug-delivery di farmaci poco solubili in acqua (es. ibuprofene)
- come solvente in sintesi organica, può infatti favorire la catalisi acida, basica e metallica e stabilizzando gli stati di transizione
- per l'estrazione di carboidrati e polifenoli da matrici biologiche grazie alla capacità dei DES di interagire con queste molecole attraverso legame a idrogeno

Grazie alle loro caratteristiche e proprietà i DES rappresentano una valida alternativa alle metodiche tradizionali usate per l'estrazione dei polifenoli, in particolare dalla biomassa vitivinicola residuale, con rese che possono arrivare fino al doppio del quantitativo di polifenoli totali estratti con l'uso di solventi organici tradizionali quali etanolo o metanolo.²¹

Bubalo et al.²² hanno dimostrato come le rese di estrazione siano maggiori usando un DES composto da colina cloruro e acido ossalico o acido malico come HDB addizionato al 25% di acqua rispetto all'uso di soluzioni acidificate di metanolo e acqua (70% v/v).

Jeong et al.⁹⁵ hanno messo a punto una metodica estrattiva usando un DES acido citrico – maltosio (2:1) in grado di estrarre più del doppio di antocianine dalle bucce d'uva in tempi estremamente minori rispetto all'uso di solventi organici (come ad esempio metanolo) e che non altera la capacità antiossidante delle antocianine estratte.

Anche Radosevic et al.⁹⁶ ha dimostrato come l'uso di DES a base di colina cloruro e fruttosio o acido malico come HBD permetta di ottenere delle rese di estrazioni in polifenoli totali dalle bucce d'uva superiori rispetto all'uso di soluzioni estraenti a base di metanolo.

4. Risultati e discussione

4.1. caratteristiche e composizione generale della biomassa residuale di interesse

In questo lavoro di tesi sono state analizzate 6 biomasse di scarto e non (Tabella 3), derivanti da matrici vitivinicole, al fine di estrarre due classi di molecole bioattive: acidi grassi polinsaturi e polifenoli.

vinaccioli	vinaccia con vinaccioli
vinaccia rossa	vinaccia senza vinaccioli
vinaccia bianca	feccia di vino in pasta

Tabella 3 biomasse analizzate in questo lavoro di tesi

I vinaccioli rappresentano il seme dell'acino dell'uva e solitamente ne costituiscono il 5% del peso,⁵⁵ vengono impiegati durante il processo di produzione del vino in quanto sono responsabili, assieme alle bucce, del rilascio di polifenoli nel mosto. L'interesse commerciale nei confronti di questa biomassa deriva principalmente dal suo elevato contenuto di oli costituiti da vari acidi grassi tra cui l'acido linoleico (C18:2, ω -6), l'acido oleico (C18:1) l'acido stearico (C18:0) e l'acido palmitico (C16:0) e composti polifenolici con azione antiossidante (Figura 10). L'acido linoleico è un acido grasso essenziale che svolge un ruolo importante nello sviluppo mantenimento del sistema nervoso e delle funzioni fisiologiche negli esseri umani⁵⁸ e sembra essere implicato nell'abbassamento

della colesterolemia agendo sull'assorbimento intestinale del colesterolo.^{56, 57} Inoltre trova ampio utilizzo in cosmetica come composto antiaging.

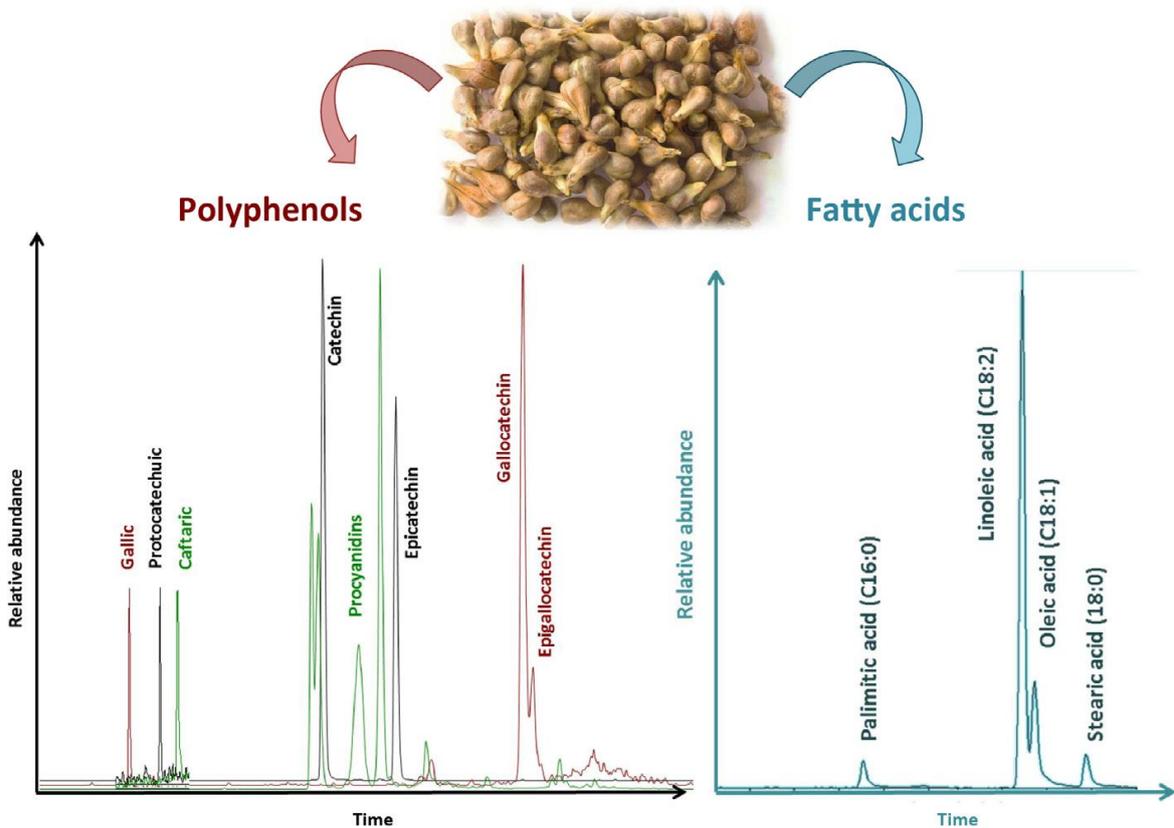


Figura 10 composti bioattivi estratti dai vinaccioli

La vinaccia è uno dei maggiori sottoprodotti solidi dell'attività vitivinicola, costituisce il 10% - 20% del peso dell'uva e include la pelle, i semi e ogni altro materiale solido che vi rimane dopo la spremitura. Questo materiale rappresenta un substrato complesso composto dal 30% di polisaccaridi neutri, 20% di acido pectico e 15% da proantocianidine insolubili, lignina, proteine strutturali e fenoli. Le ultime due componenti sono agglomerate in ammassi ligno-carboidratici e, se frazionati, rappresentano una ricca fonte di biomolecole organiche.¹⁴ Secondo Mendes et al. le bucce rappresentano il maggior componente della vinaccia, rappresentando circa la metà della sua massa; tuttavia la maggior parte delle bucce è rimossa assieme ai vinaccioli dopo la produzione del vino.^{66, 67}

Anche se la composizione fenolica della buccia può variare fortemente in funzione della varietà e delle condizioni di coltivazione, contiene il maggior quantitativo di antocianine e tannini ad elevato grado di polimerizzazione. Nella buccia d'uva i fenoli sono disposti in uno strato interno chiamato ipodermide) e possono essere:

1. fenoli cellulari, legati a polisaccaridi da interazioni idrofobiche e legami di idrogeno
2. fenoli non-cellulari, che comprendono fenoli confinati nei vacuoli di cellule vegetali e fenoli associati al nucleo cellulare

la parete cellulare della buccia d'uva è costituita dal 20% di cellulosa, 12% di emicellulosa (xyloglucano, arabinano, galattano, xilano e mannano), 20% di sostanze pectiniche acidificate, circa il 15% di proantocianidine insolubili, 7,9% di ceneri, 5,0% di estratti solubili in diclorometano e < 5% di proteine strutturali.^{68, 69}

la feccia di vino, che si genera durante la fermentazione e l'invecchiamento del vino, è definita come il residuo che si forma sul fondo di contenitori contenenti vino durante la fermentazione e lo stoccaggio ma anche come residuo ottenuto dalla filtrazione o centrifugazione del vino.⁷⁰ A seconda della dimensione delle particelle la feccia di vino può essere classificata in leggera o pesante.⁷¹ La feccia consiste di una fase solida, principalmente da microorganismi (lieviti e batteri), carboidrati insolubili derivati dalla frazione cellulosica ed emicellulosica, composti fenolici, lignina, proteine, metalli, sali organici (prevalentemente tartrati) e di una fase liquida ricca in etanolo e acidi organici come acido lattico o acido acetico. I composti fenolici che possiamo ritrovare qui dipendono dall'origine dell'uva e dal clima.⁷²

4.1.1. Analisi elementare e del contenuto organico

L'analisi delle ceneri e l'analisi elementare sono state effettuate su tutte le biomasse usate in questo lavoro di tesi. Pre prima cosa però la vinaccia rossa, la vinaccia bianca e la feccia di vino sono state liofilizzate. il contenuto d'acqua nelle biomasse liofilizzate è elencato in tabella 4.

Per quanto riguarda l'analisi elementare e l'analisi delle ceneri ogni biomassa è stata analizzata in duplicato e i risultati sono elencati in Tabella 5.

	pallone + campione (g)	pallone + campione liofilizzato (g)	perdita H₂O (g)
vinaccia rossa	157,98	137,2	20,78
vinaccia bianca	140,44	117,29	23,15
feccia di vino in pasta	202,19	149,62	52,57

Tabella 4 H₂O contenuta nelle matrici liofilizzate

		N	C	H	S	CENERI	O	PROTEINE (DA CHN)
VINACCIA ROSSA	MEDIA	1,91%	50,36%	6,66%	0,95%	3,0%	40,08%	12,45%
	DEVST	0,38%	0,73%	0,16%	0,18%	0,49%		
VINACCIOLI	MEDIA	1,23%	49,32%	5,96%	0,61%	2,5%	42,85%	7,97%
	DEVST	0,30%	2,33%	0,33%	0,21%	0,26%		
VINACCIA BIANCA	MEDIA	2,08%	45,00%	6,20%	0,91%	4,9%	45,76%	13,51%
	DEVST	0,10%	0,40%	0,07%	0,03%	0,15%		
FECCIA DI VINO IN PASTA	MEDIA	2,44%	21,93%	2,87%	0,43%	47,3%	71,86%	15,87%
	DEVST	0,01%	0,24%	0,01%	0,60%	0,28%		
VINACCE CON VINACCIOLI	MEDIA	1,65%	45,26%	5,62%	0,38%	3,2%	47,05%	10,73%
	DEVST	0,19%	0,48%	0,11%	0,54%	0,01%		
VINACCE SENZA VINACCIOLI	MEDIA	2,25%	50,42%	6,32%	0,44%	5,3%	40,52%	14,61%
	DEVST	0,21%	0,10%	0,18%	0,63%	0,08%		

Tabella 5 risultati analisi elementare e delle ceneri

Dai dati ottenuti si può affermare che:

- la biomassa più ricca in acqua è la feccia di vino in pasta che con la liofilizzazione ne ha persi 52,57 g (Tabella 4).
- la feccia di vino in pasta è tra tutte la biomassa con il maggior quantitativo di ceneri (47,3 % sul peso del campione) e proteine con un 15,87 % sul peso del campione ed è anche la più ricca di ossigeno e di azoto con valori rispettivamente del 71,86 % e del 2,44 % sul peso del campione (Tabella 5).
- Le vinacce senza vinaccioli sono la biomassa più ricca in carbonio, questo ne costituisce il 50,42 % del campione (Tabella 5).

- La vinaccia rossa è la biomassa che presenta la maggior percentuale di idrogeno e di zolfo con valori rispettivamente del 6,66 % e dello 0,95 % del peso del campione (Tabella 5).

4.1.2. Analisi dei lipidi

Essendo l'estrazione di composti bioattivi uno degli obiettivi di questo lavoro di tesi, è stata effettuata una caratterizzazione lipidica sulle sei differenti biomasse prese in esame al fine di individuare quella più adatta all'estrazione di acidi grassi insaturi. L'estrazione della frazione lipidica è stata svolta seguendo la metodologia tradizionale descritta da Bligh & Dyer nel 1959 che prevede l'utilizzo di una miscela di cloroformio (o diclorometano) e metanolo. L'estratto ottenuto con questo metodo è costituito da una miscela di componenti a diversa polarità come trigliceridi, acidi grassi liberi, fosfolipidi e glicolipidi. Per individuare la composizione di acidi grassi presenti nell'estratto è stata svolta un'analisi GC-MS successivamente a transesterificazione.

Particolarmente importante è stato evidenziare:

- La percentuale di lipidi estratti rispetto alla biomassa essiccata di partenza determinata tramite gravimetria (% estratto)
- La percentuale di acidi grassi totali presenti nell'estratto (% TFA) e la loro composizione qualitativa determinate tramite analisi GC-MS
- La percentuale di acidi grassi totali presenti nella biomassa essiccata di partenza (% TFA biomassa)

	% estratto		%TFA		%TFA biomassa	
	MEDIA	DEV.ST	MEDIA	DEV.ST	MEDIA	DEV.ST
<i>vinaccioli</i>	24,2%	2%	100%	27%	24,4%	6%
<i>vinaccia rossa</i>	36,8%	12%	32,0%	7%	11,9%	4%
<i>vinaccia bianca</i>	28,0%	0%	11,2%	2%	3,5%	1%
<i>vinaccia con vinaccioli</i>	13,0%	0%	78,8%	2%	10,5%	1%
<i>vinaccia senza vinaccioli</i>	10,5%	1%	91,3%	21%	9,5%	2%
<i>feccia di vino in pasta</i>	5,0%	0%	33,2%	4%	1,9%	0%

Tabella 6 caratterizzazione della porzione lipidica estratta dalle sei biomasse

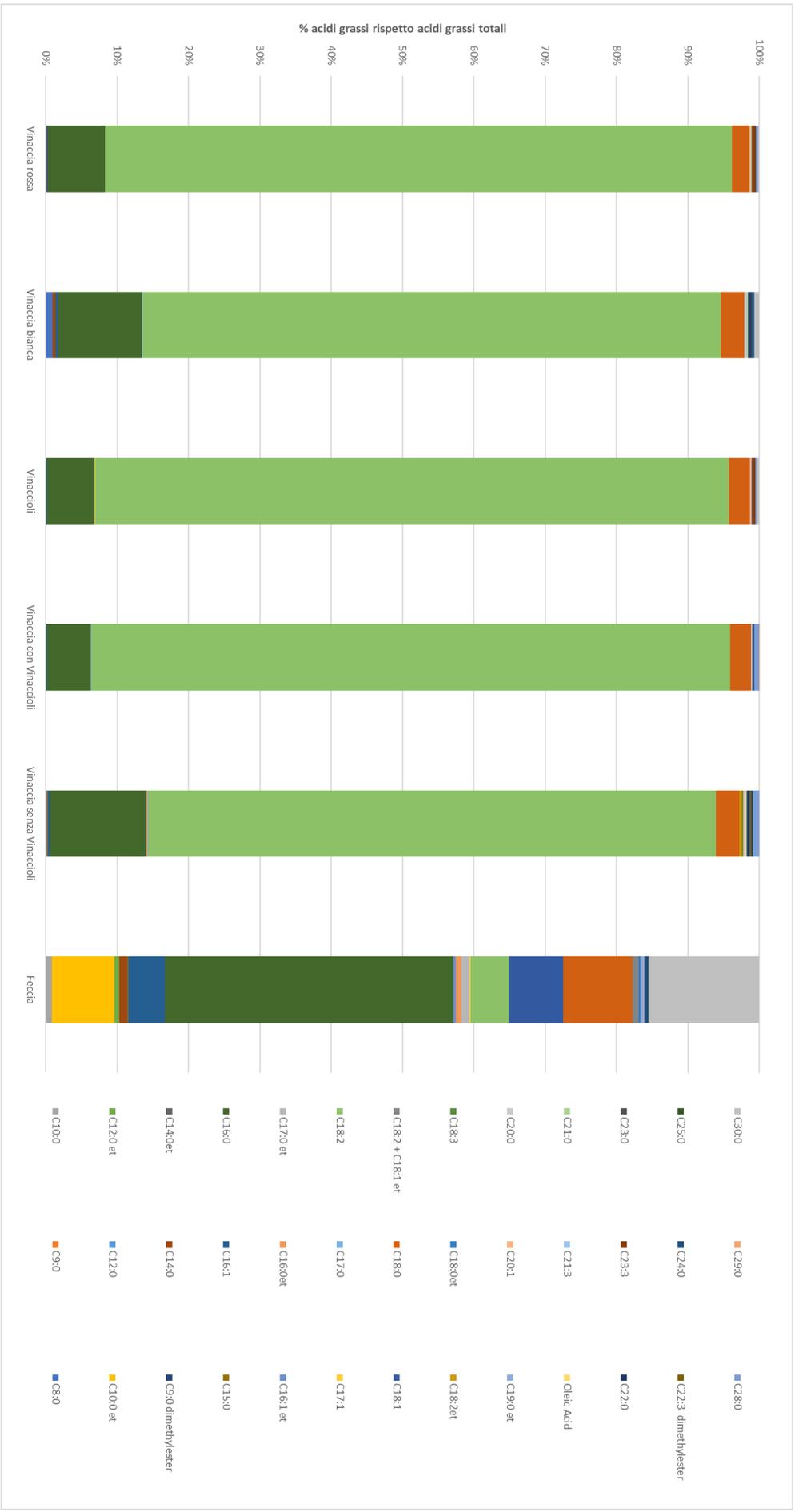


Grafico 1 composizione percentuale degli acidi grassi rispetto agli acidi grassi totali presenti nell'estratto lipidico delle sei biomasse. Media di tre repliche per vinaccia rossa e vinaccioli, due per le altre.

Le analisi condotte sulla frazione lipidica estratta dai vinaccioli hanno permesso le seguenti osservazioni:

1. La componente lipidica estratta applicando il metodo Bligh & Dyer⁵³ rappresenta il 24,2% della biomassa essiccata (Tabella 6), in linea rispetto a quanto riportato in letteratura che prevede una percentuale variabile tra l'8% e il 20%.⁵⁴
2. Gli acidi grassi costituiscono quasi l'intera parte dell'estratto lipidico (Tabella 6); la loro composizione relativa è in accordo con quanto riportato in letteratura e indifferente a seconda della varietà di vite presa in esame (bianca e rossa) anche se ci si possono aspettare delle variazioni dovute al grado di maturazione e di invasatura degli acini. I tre acidi grassi più abbondanti sono il linoleico (C18:2), il palmitico (C16:0) e lo stearico (C18:0) che rappresentano l'89,42%, il 6,70% e il 2,92% degli acidi grassi totali (Grafico 1).
3. Gli acidi grassi costituiscono il 24,4% della biomassa essiccata (Tabella 6).

Analisi della componente lipidica estratta da vinaccia rossa:

1. La componente lipidica rappresenta il 36,8% della biomassa essiccata (Tabella 6).
2. Gli acidi grassi costituiscono il 32% dell'estratto (Tabella 6). I principali sono il linoleico (C18:2), il palmitico (C16:0) e lo stearico (C18:0) che rappresentano l'88,21%, il 7,96% e il 2,45% degli acidi grassi totali (Grafico 1).
3. Gli acidi grassi costituiscono l'11,9% della biomassa essiccata (Tabella 6).

Analisi della componente lipidica estratta da vinaccia bianca:

1. La componente lipidica rappresenta il 28% della biomassa essiccata (Tabella 6).
2. Gli acidi grassi costituiscono l'11,2% dell'estratto (Tabella 6). I principali sono il linoleico (C18:2), il palmitico (C16:0) e lo stearico (C18:0) che rappresentano l'81,7%, l'11,9% e il 3,3% degli acidi grassi totali (Grafico 1).
3. Gli acidi grassi costituiscono il 3,5% della biomassa essiccata (Tabella 6).

Analisi della componente lipidica estratta da vinaccia con e senza vinaccioli:

1. Nella vinaccia con vinaccioli la componente lipidica rappresenta il 13% della biomassa essiccata di partenza, mentre nella vinaccia senza vinaccioli la componente lipidica sul totale della biomassa rappresenta il 10,5% (Tabella 6). Il maggior quantitativo di lipidi nella vinaccia con vinaccioli rispetto alla vinaccia senza vinaccioli è certamente attribuito alla presenza dei vinaccioli.
2. Nella vinaccia con vinaccioli gli acidi grassi costituiscono il 78,8% dell'estratto; nella vinaccia senza vinaccioli gli acidi grassi costituiscono il 91,3% dell'estratto. Sia nella vinaccia con che in quella senza vinaccioli i principali acidi grassi sono il linoleico (C18:2), il palmitico (C16:0) e lo stearico (C18:0) che rappresentano, nella vinaccia con vinaccioli, l'89,89%, il 6,17% e il 3,03% mentre nella vinaccia senza vinaccioli l'80,36%, il 13,69% e il 3,26% degli acidi grassi totali (Grafico 1).
3. Nella vinaccia con vinaccioli gli acidi grassi costituiscono il 10,5% della biomassa essiccata, mentre nella vinaccia senza vinaccioli gli acidi grassi rappresentano il 9,5% della biomassa essiccata (Tabella 6).

Analisi della componente lipidica estratta da feccia di vino in pasta:

1. La componente lipidica rappresenta il 5% della biomassa essiccata (Tabella 6)
2. Gli acidi grassi costituiscono il 33,2% dell'estratto (Tabella 6). I principali sono il palmitico (C16:0), lo stearico (C18:0) e lo squalene (C30:0) che rappresentano il 48,91%, l'11,78% e il 18,8% degli acidi grassi totali (Grafico 1).
3. Gli acidi grassi costituiscono l'1,9% della biomassa essiccata (Tabella 6).

Dal confronto di questi risultati possono essere fatte alcune considerazioni:

- I vinaccioli sono la biomassa che presentano la più alta percentuale di acidi grassi su biomassa essiccata e l'estratto lipidico è composto quasi interamente da acidi grassi.
- La composizione degli acidi grassi è simile in tutte le biomasse, eccezione fatta per la feccia di vino in pasta, con netta prevalenza dell'acido linoleico (C18:2)
- La vinaccia con vinaccioli produce l'estratto più ricco in acido linoleico (89,89% del totale dell'estratto)
- La vinaccia senza vinaccioli produce l'estratto più ricco in acido palmitico (13,69% del totale dell'estratto)
- La feccia di vino in pasta produce l'estratto più ricco in acido stearico (48,91% del totale dell'estratto)
- Solamente nella feccia di vino in pasta sono stati trovati discreti quantitativi di squalene (18,8% del totale dell'estratto)

Ad eccezione della feccia di vino in pasta tutte le altre biomasse presentano estratti lipidici simili tra loro; per questo motivo le due più indicate per l'ottenimento di estratti ricchi in acidi grassi sono vinaccioli e vinaccia rossa, per via della loro percentuale di acidi grassi su biomassa essiccata maggiore rispetto alle altre biomasse. La feccia di vino in pasta è risultata essere la biomassa con il minor contenuto di acidi grassi, quindi la meno adatta all'ottenimento di estratti; tuttavia è l'unica biomassa analizzata in cui è stato trovato lo squalene.

4.1.3. Analisi dei polifenoli

I polifenoli sono importanti composti bioattivi, particolarmente usati nel campo della nutraceutica e della cosmetica come antiossidanti. La loro estrazione viene generalmente svolta usando solventi come etanolo, metanolo, diclorometano, acetone, esano ed etilacetato.^{62, 63, 64} Le rese usando questi solventi sono elevate ed il prodotto ottenuto è di buona qualità. Tuttavia, i processi richiedono tempi di trattamento lunghi e temperature elevate, i solventi utilizzati inoltre sono dannosi per la salute umana e per l'ambiente e per questo gli estratti prima di poter essere utilizzati devono essere sottoposti ad ulteriori trattamenti di rimozione del solvente e purificazione.

Per determinare quale fosse la biomassa più ricca in polifenoli estraibili tra le sei di questo lavoro e per avere un valore di riferimento di quanti polifenoli fossero estraibili con l'uso di solventi organici è stata effettuata una prima estrazione usando una miscela di acqua ed etanolo. L'estratto così ottenuto è composto da una miscela di tutte le componenti polifenoliche estraibili presenti nelle varie matrici. Per determinare il quantitativo totale di polifenoli estratti rispetto alla biomassa essiccata di partenza (% polifenoli) è stata svolta un'analisi spettrofotometrica dopo aver fatto reagire gli estratti con il reattivo di Folin-Ciocalteu.

Dal grafico 2 è possibile vedere come, in accordo con quanto presente in letteratura,¹⁴ la biomassa più ricca in polifenoli estraibili risulti essere la vinaccia rossa.

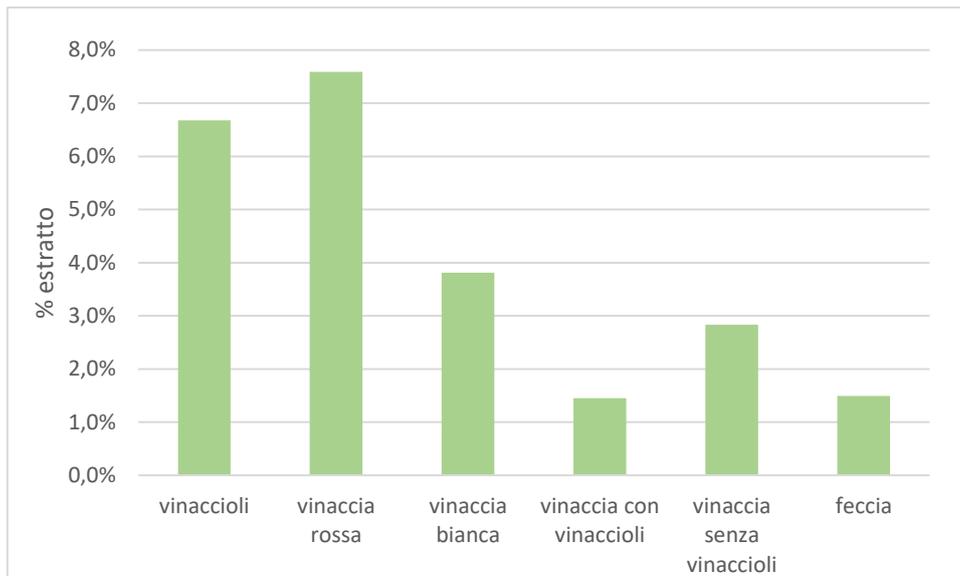


Grafico 2 % di polifenoli estratti rispetto alla biomassa di partenza (% polifenoli) usando una miscela di acqua e etanolo e determinati spettrofotometricamente con il reattivo di Folin – Ciocâlteau

Successivamente sono stati preparati e analizzati estratti polifenolici acqua, etanolo e miscela acqua/etanolo 1:1 in volume a partire dalla vinaccia rossa. I polifenoli estratti con questi solventi sono risultati il 7,6%, il 5,8%, e il 6,8% in peso rispetto alla vinaccia rossa trattata, rispettivamente (Grafico 3).

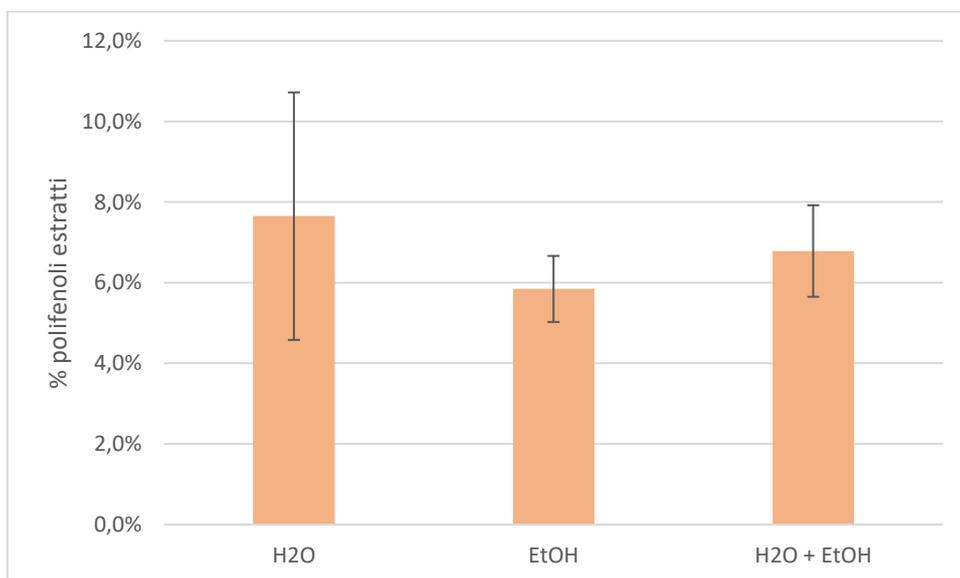


Grafico 3 % di polifenoli estratti da vinaccia rossa usando acqua, etanolo o una miscela 1:1 in volume dei due e determinati spettrofotometricamente con il reattivo di Folin – Ciocâlteau

4.2. Estrazione di composti bioattivi con metodologie green

4.2.1. Estrazione di lipidi con dimetilcarbonato

In questo studio il dimetilcarbonato (DMC) è stato usato come solvente per l'estrazione della componente lipidica dei vinaccioli, la matrice oleaginosa più interessante tra quelle a disposizione, in quanto è considerato un solvente organico sicuro e green ed è già stato riportato in letteratura come buon solvente per l'estrazione di trigliceridi da microalghe (sia puro che in miscela con il metanolo).⁶¹ Paragonando i risultati ottenuti con il metodo Bligh & Dyer è possibile fare le seguenti osservazioni:

- La percentuale di lipidi estratti in DMC è di poco minore a quella ottenuta con il metodo Bligh & Dyer (Grafico 4).
- Gli acidi grassi rappresentano la totalità dell'estratto come quanto ottenuto con il metodo Bligh & Dyer (Grafico 4), ad indicare una ottima selettività del DMC per i lipidi.
- La percentuale di acidi grassi presenti nella biomassa essiccata di partenza, come atteso, risulta comparabile (Grafico 4).
- Gli estratti in DMC sono più ricchi in acido linoleico (C18:2) con una percentuale del 93,37% contro l'89,42% degli estratti ottenuti con il metodo Bligh & Dyer mentre sono più poveri in acido palmitico (C16:0) e stearico (C18:0) 4,63% e 2,06% rispettivamente contro 6,70% e 2,92% (Grafico 5).

Tenuto conto dei risultati quindi si può affermare che il dimetilcarbonato sia un valido solvente alternativo non tossico per l'estrazione di acidi grassi da sottoprodotti di attività vitivinicola, con rese di estrazione confrontabili a quelle di metodi basati sull'utilizzo di solventi clorurati.

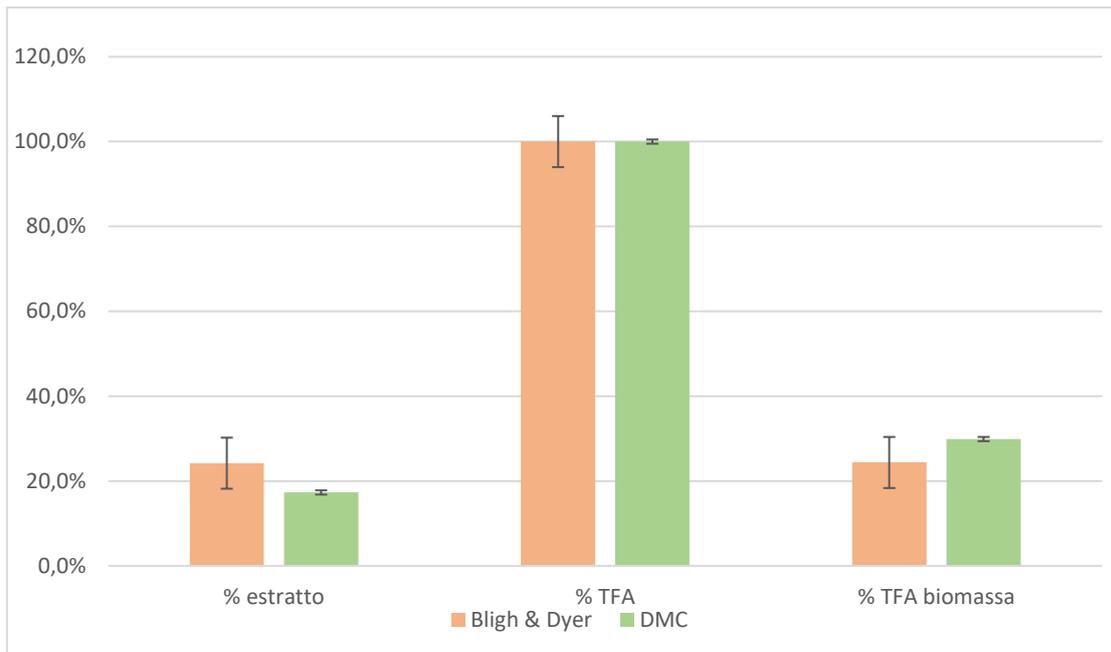


Grafico 4 comparazione tra gli estratti ottenuti con il metodo Bligh & Dyer e gli estratti in DMC

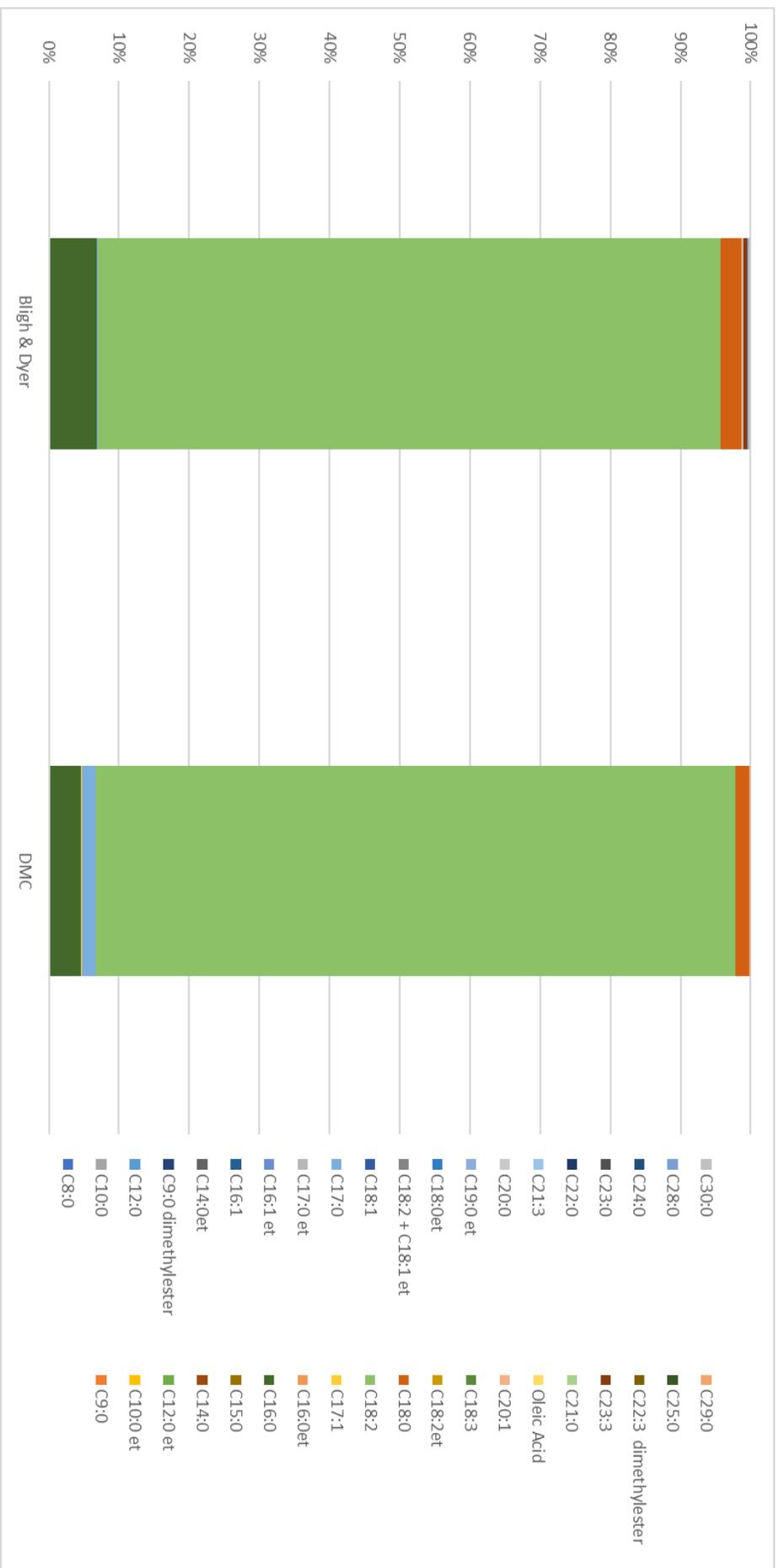


Grafico 5 confronto in composizione percentuale degli acidi grassi rispetto agli acidi grassi totali presenti nell'estratto lipidico ottenuto con il metodo Bligh & Dyer e con DMC

4.2.2. pretrattamento della biomassa con DES e successiva estrazione di acidi grassi con DCM

Al fine di sviluppare nuovi protocolli eco-compatibili per estrarre lipidi da matrici ricche in oli, è stata valutata la possibilità di incrementare le rese di estrazione e operare in condizioni più "mild" tramite l'applicazione di un pretrattamento chimico con Deep Eutectic Solvents (DES).

Lo scopo del pretrattamento è quello di aumentare la diffusione del solvente distruggendo (o almeno indebolendo) le pareti cellulari della biomassa e facilitare la successiva estrazione; per questo si può considerare come un importante passaggio nell'estrazione di biomolecole da fonti naturali.⁹⁷ I pretrattamenti delle biomasse a fini estrattivi si dividono in: chimici (liquidi ionici, deep eutectics solvents, trattamenti acidi o basici, solventi organici), meccanici (ball milling), termici (microonde), fisici (ultrasuoni) e enzimatici.

L'estrazione di molecole bioattive da biomassa lignocellulosica è resa difficile dalla presenza nella biomassa di cellulosa, emicellulosa e lignina assieme ai composti target che devono essere estratti. La cellulosa (β -1-4-glucano) è un polimero polisaccaridico lineare costituito da unità di glucosio legate tra loro da legami β (1 \rightarrow 4) glicosidici. Le catene cellulose sono connesse tra loro attraverso legami a idrogeno in strutture chiamate microfibrille. Queste a loro volta sono connesse le une alle altre dalla emicellulosa, un polimero amorfo costituito da differenti zuccheri e da altri polimeri come la pectina e coperto di lignina. Le microfibrille si trovano spesso in forma di gomitoli o macrofibrille; queste strutture estremamente complesse fanno sì che la cellulosa sia resistente ai trattamenti sia chimici che biologici. A differenza della cellulosa che presenta una struttura cristallina ben definita, l'emicellulosa ha una struttura amorfa e ramificata ed è più facilmente idrolizzabile nei suoi componenti monomerici. La lignina d'altro canto è una molecola molto complessa costruita da unità di fenilpropano ripetute numerose volte e collegate in una struttura tridimensionale particolarmente difficile da degradare. Maggiore è la percentuale di lignina in una biomassa maggiore sarà la sua resistenza alla degradazione.⁹⁸

Precedenti lavori di tesi svolti nello stesso laboratorio hanno dimostrato come le rese di estrazione in dimetilcarbonato di lipidi da biomassa algale risultino raddoppiate rispetto a quanto descritto in letteratura dall'applicazione di pretrattamenti chimici con DES.

In questa fase del lavoro è stata quindi esplorata l'applicazione di vari DES acquosi (aDES) sui vinaccioli, la biomassa più ricca in lipidi tra quelle prese in analisi, per verificare se l'estrazione di olio da vinaccioli con DMC potesse essere migliorata.

Scelta dei DES

Per rappresentare le differenti "classi" di donatori di legami ad idrogeno tipicamente utilizzati nei DES (acidi carbossilici, polioli e ammidi) sono stati scelti 3 differenti DES (Figura 11) a base di colina cloruro con: acido ossalico (ChCl-AO 1:2), urea (ChCl-U 1:2) ed etilenglicole (ChCl-EG 1:2).

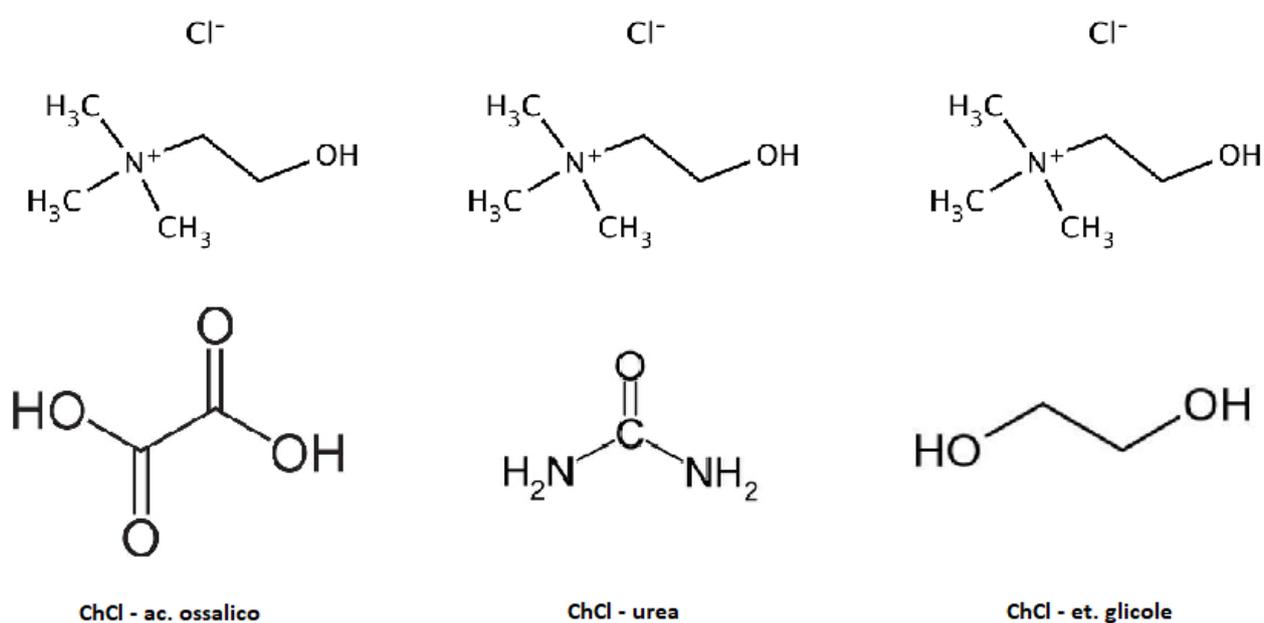


Figura 11 DES utilizzati come pretrattamento

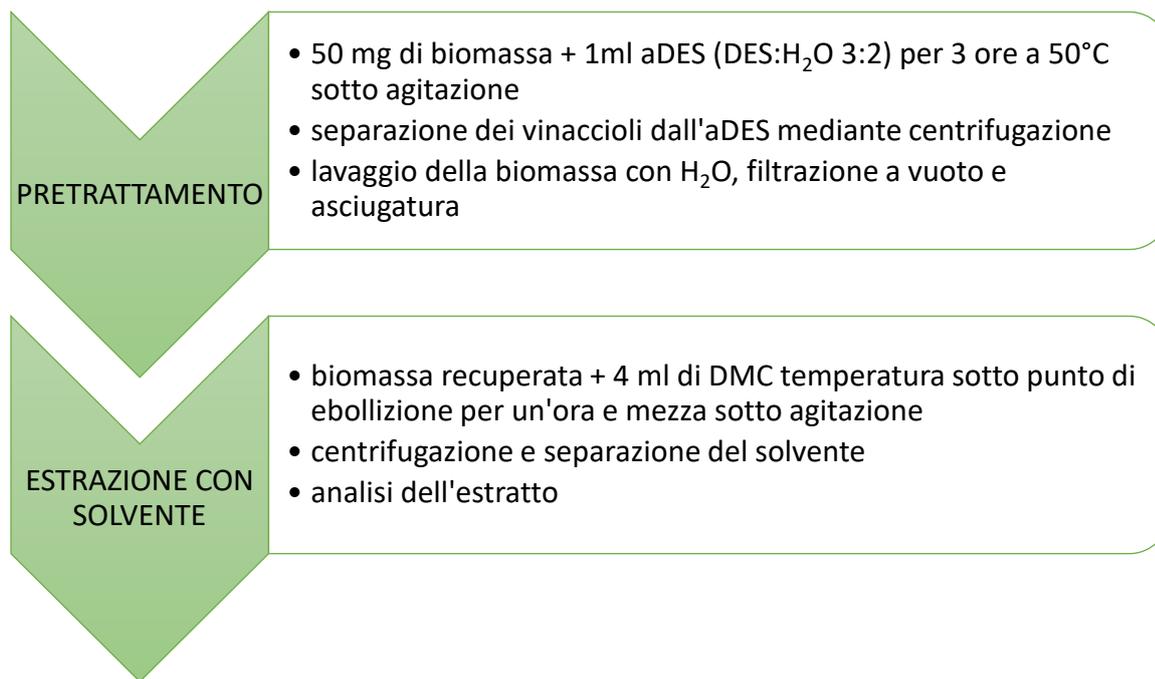


Figura 12 procedura per il pretrattamento e l'estrazione da biomassa utilizzata in questo lavoro

Seguendo la metodologia riassunta in Figura 12, da ogni campione di vinaccioli pretrattato con aDES ed estratto successivamente con DMC sono stati ottenuti degli estratti lipidici che sono stati pesati e analizzati mediante transesterificazione e analisi GC-MS. Le percentuali di lipidi estratti rispetto alla biomassa essiccata di partenza (% estratto) e la percentuale di acidi grassi nell'estratto (% TFA) per i vari trattamenti sono riportate nel grafico 6.

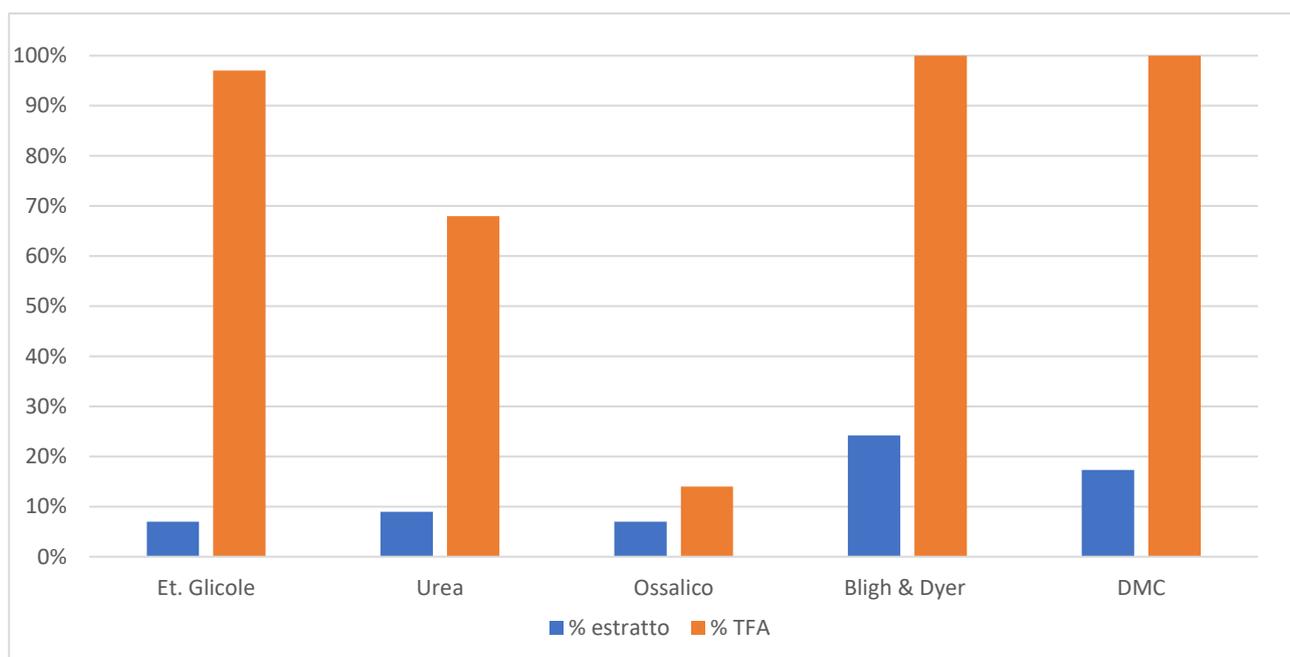


Grafico 6 percentuale di lipidi estratti rispetto alla biomassa essiccata di partenza (% estratto) e la percentuale di acidi grassi nell'estratto (% TFA). Confronto tra due approcci: dopo pretrattamento a base di DES acquosi e senza pretrattamento (Bligh & Dyer e DMC)

Dal confronto tra i risultati ottenuti dopo il pretrattamento con i tre aDES è possibile notare come le rese di estrazione siano diminuite e come sia diminuita anche la percentuale di acidi grassi totali sull'estratto rispetto all'estrazione con diclorometano e metanolo (Bligh & Dyer) sia con DMC. Infatti gli estratti lipidici (% estratto, Grafico 10 in blu) ottenuti dopo il pretrattamento con ChCl – et. glicole, ChCl – Urea, ChCl – ac. ossalico costituiscono rispettivamente il 7%, 9% e 7% della biomassa essiccata di partenza, mentre gli estratti in diclorometano ed etanolo e in DMC costituiscono rispettivamente il 24,2% e il 17,3%.

Un altro aspetto importante da tenere in considerazione è la percentuale di acidi grassi totale nell'estratto (% TFA) estratto dalla biomassa con le differenti metodologie. Gli acidi grassi, in particolar modo quelli insaturi, sono tra i composti bioattivi di interesse in questo lavoro, e per questa ragione è desiderabile ottenere estratti lipidici il più arricchiti possibile in acidi grassi. Come si può notare dal grafico 6 gli estratti ottenuti con dimetilcarbonato e con il metodo Bligh & Dyer sono costituiti interamente da acidi grassi, mentre per quanto riguarda gli estratti ottenuti dopo pretrattamento con aDES si può notare come la percentuale di acidi grassi (% TFA) sia minore o uguale rispetto agli estratti che non hanno subito pretrattamento con valori del 97% per ChCl – et. Glicole, 68% per ChCl – Urea e 14% per ChCl – ac. ossalico.

Una possibile spiegazione a questi inattesi risultati potrebbe risiedere nella presenza di acidi grassi rilasciati nella soluzione di DES dopo il pretrattamento e quindi non estraibili dal DMC. In letteratura⁶² viene riportato che piccole quantità di lipidi polari possono essere rilasciate nel aDES. Per esempio, trattando i vinaccioli con ChCl – ac. ossalico la quantità di lipidi nell'estratto si riduce di circa il 10%. Questo ovviamente influisce sulla quantità di lipidi successivamente estraibili e può in parte spiegare gli scarsi risultati ottenuti. In generale comunque sembra che tutti e tre i DES testati abbiano rimosso una parte della componente lipidica che poi non è stata estratta in DMC.

4.2.3. Estrazione di polifenoli con DES e test di attività antiossidante

Nell'ottica dell'applicazione dei principi della green chemistry che tra i suoi punti prevede l'utilizzo di solventi sicuri e non tossici e la riduzione di energia totale del processo, la vinaccia rossa è stata estratta usando DES a base di colina cloruro e vari HBD al fine di ottenere una metodica di estrazione dei polifenoli da sottoprodotti vitivinicoli che preveda l'uso di DES come solventi per ottenere un prodotto costituito da un solvente funzionale arricchito in polifenoli.

Scelta dei DES

Per poter rappresentare una più ampia gamma possibile di DES partendo dai dati disponibili in letteratura sono stati testati 10 differenti DES a base di colina cloruro (Figura 13) e un DES a base di saccarosio, glucosio e fruttosio in rapporto molare 1:1:1.

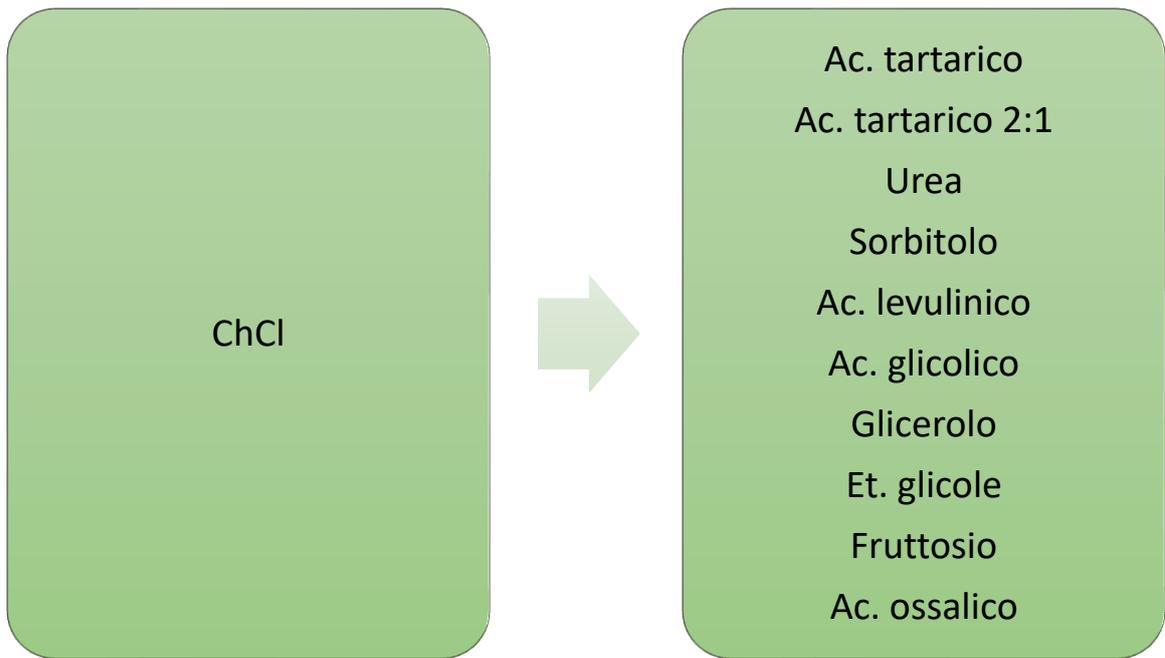


Figura 13 schema degli HBD usati per i 10 DES a base di ChCl

Per controllare l'efficacia del metodo e per determinare quale fosse il DES più adatto all'estrazione dei polifenoli gli estratti sono stati confrontati con estratti ottenuti in etanolo e acqua (capitolo 4.2.1). Una cinetica estrattiva ha permesso di ottimizzare il processo di estrazione individuando una durata ottimale dell'estrazione alle condizioni applicate di 6 ore (Grafico 7).

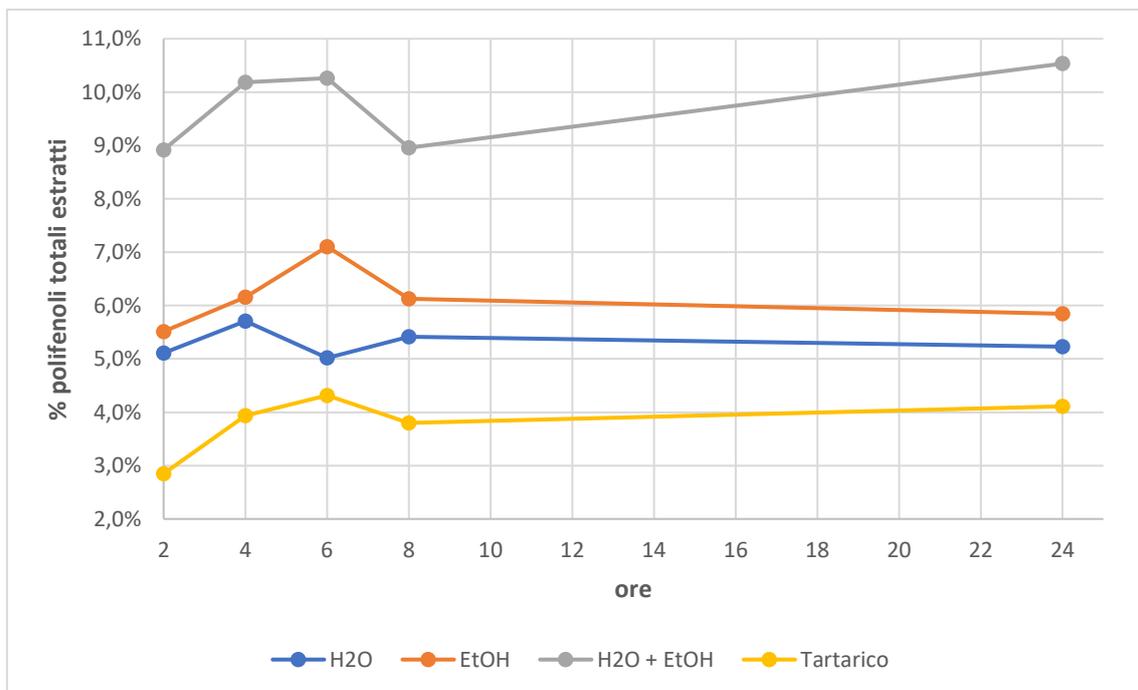


Grafico 7 cinetica estrattiva per polifenoli, campione di vinaccia rossa

Le analisi hanno permesso le seguenti osservazioni:

- La maggior parte dei DES testati mostra un'efficienza maggiore nell'estrazione rispetto ai solventi tradizionali, talvolta arrivando anche a rese doppie rispetto all'estrazione con solo etanolo (Grafico 8).
- Il DES ChCl – Fruttosio da dati di letteratura sembra essere un solvente promettente⁹⁶ ma in questo lavoro non ha dato risultati costanti nell'estrazione; la percentuale di polifenoli estratta infatti è risultata essere dell'8,6% con un'alta deviazione standard del 7,6% (Grafico 8). Probabilmente il fruttosio stesso ha reagito con il reattivo di Folin-Ciocalteu creando dei risultati poco attendibili, tuttavia non sono stati fatti ulteriori approfondimenti.
- I DES con resa minore rispetto agli estratti di controllo sono risultati essere ChCl – etilenglicole che ha estratto il 6,1% dei polifenoli totali e il DES costituito dalla miscela dei tre zuccheri saccarosio, glucosio e fruttosio (S:G:F) 1:1:1 addizionato con 1,8ml di H₂O che ha estratto il 4,1% dei polifenoli totali (Grafico 8).
- Ad esclusione dei DES precedentemente descritti le rese in estrazione degli altri DES testati sono state superiori o almeno uguali a quanto ottenuto con acqua, etanolo e la miscela 1:1 dei due (Grafico 8).
- I DES che hanno estratto il quantitativo maggiore di polifenoli sono risultati essere ChCl – acido levulinico e ChCl – acido tartarico 2:1 che hanno estratto entrambi l'11,4% dei polifenoli totali rispetto alla biomassa essiccata di partenza (Grafico 8). La maggior capacità dei DES con acidi carbossilici come HBD di estrarre polifenoli può essere dovuta al loro pH acido.⁹⁹

Teoricamente gli estratti polifenolici in DES presentano un'elevata stabilità rispetto agli estratti ottenuti con solventi organici. Per determinarne la stabilità dei composti polifenolici gli estratti sono stati conservati in vial chiusi al buio ad una temperatura costante di 4°C e analizzati nuovamente dopo un mese applicando la stessa metodica.

Dal grafico 9 si può vedere che:

- In tutti gli estratti la percentuale di polifenoli estratti sul totale della biomassa essiccata di partenza si è ridotta, probabilmente a causa di una degradazione nel tempo di tali composti e/o ad una reazione con la miscela estraente.
- L'estratto in cui si nota maggiormente la degradazione dei polifenoli è ChCl – acido tartarico 2:1 con una riduzione del 5,9% del quantitativo totale dei polifenoli estratti dalla biomassa di partenza. La percentuale di polifenoli in questo estratto passa dall'11,4% al tempo zero al 5,5% dopo un mese.
- Si può osservare degradazione consistente dei polifenoli anche negli estratti ChCl e acido glicolico, glicerolo, acido levulinico e urea come HBD. Il quantitativo di polifenoli si riduce dal 10,7% al tempo zero al 5,4% nel DES ChCl – acido glicolico (5,3% del quantitativo totale dei polifenoli estratti dalla biomassa di partenza), dall'11% al tempo zero al 6% nel DES ChCl – glicerolo (5% del quantitativo totale di polifenoli estratti dalla biomassa di partenza), dall'11,4% al tempo zero al 7,1% nel DES ChCl – acido levulinico (4,3% del quantitativo totale dei polifenoli estratti dalla biomassa di partenza) e dal 9,2% al tempo zero al 6% nel DES ChCl – urea (3,2% del quantitativo totale dei polifenoli estratti rispetto alla biomassa di partenza).
- L'estratto in cui la degradazione dei composti polifenolici è stata minore è ChCl – etilenglicole con una riduzione che va dal 6,1% al tempo zero al 5,8% dopo un mese (5,3% del quantitativo totale dei polifenoli estratti dalla biomassa di partenza).

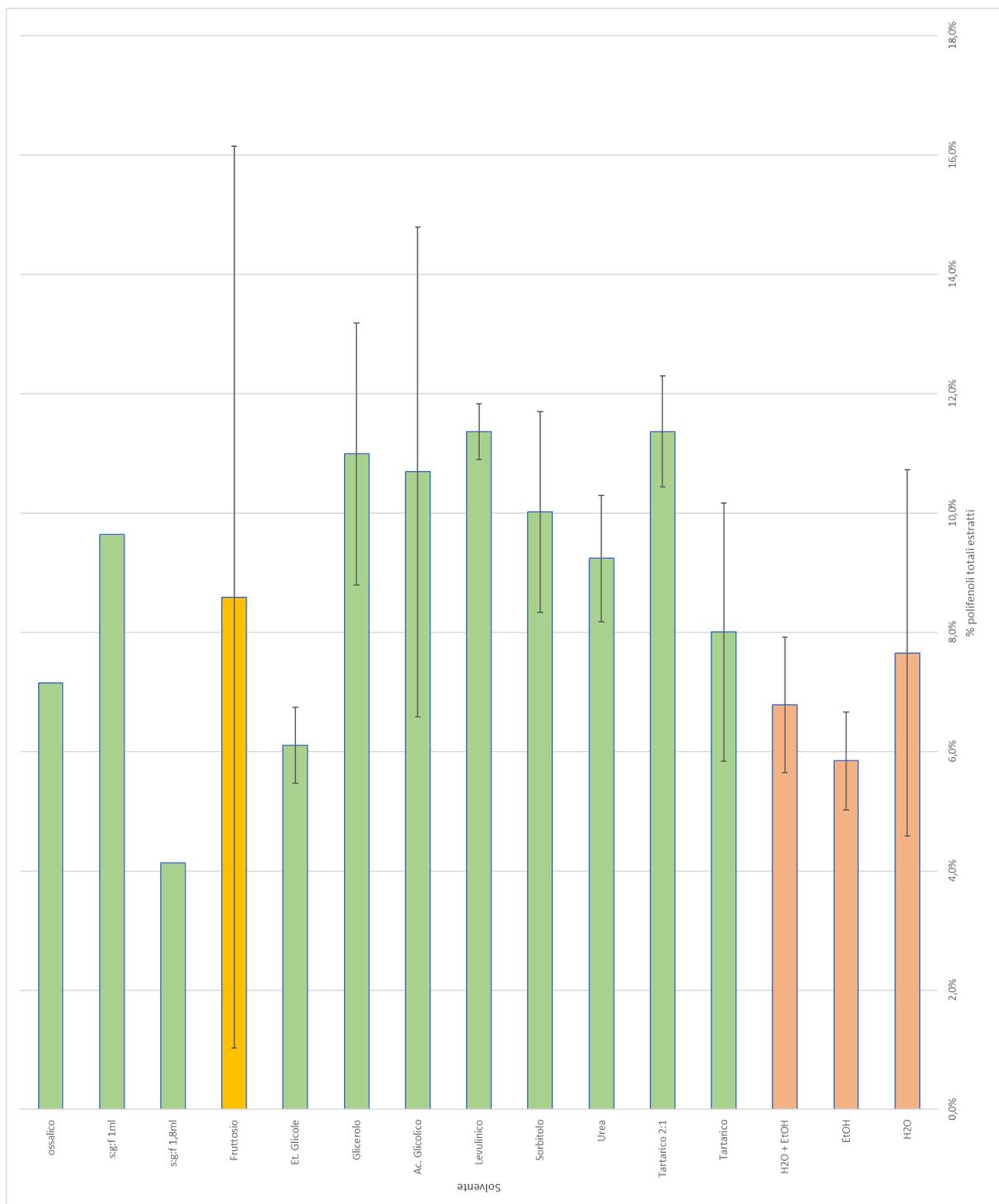


Grafico 5 quantitativo totale di polifenoli estratti rispetto alla biomassa essiccata di partenza

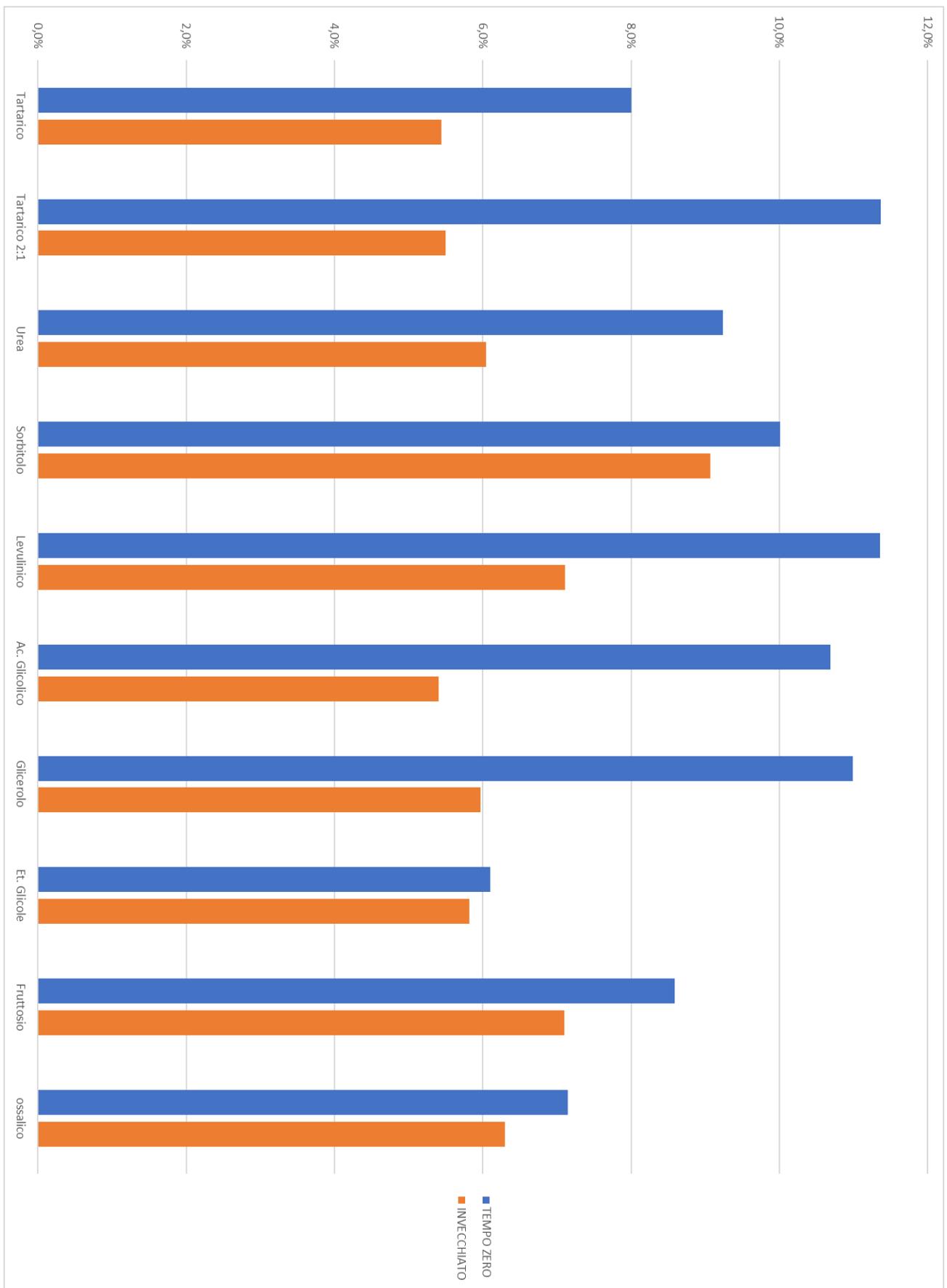


Grafico 6 comparazione estratti polifenolici, analisi al tempo zero in blu analisi stesso estratto dopo un mese in arancione

Studi di letteratura hanno dimostrato come i fitoestratti in DES presentino una maggiore attività antiossidante proprio per via della presenza del DES.¹¹³ L'attività antiossidante degli estratti polifenolici in DES quindi è stata testata per via spettrofotometrica, e dalle analisi effettuate si possono fare le seguenti considerazioni:

- Alla concentrazione più bassa di DES-estratto polifenolico, l'estratto con azione antiossidante maggiore è quello con DES ChCl – Sorbitolo con una % scavenging H₂O₂ del 36,24 % (Grafico 10).
- Ad esclusione di ChCl – acido levulinico la % di H₂O₂ degradata aumenta in modo abbastanza lineare con l'aumentare della concentrazione dell'estratto polifenolico (Grafico 10).
- ChCl – acido glicolico mostra l'andamento più lineare di tutti con un aumento costante dell'attività antiossidante all'aumentare della concentrazione dell'estratto (Grafico 10).
- ChCl – acido levulinico, ChCl – acido glicolico e ChCl – acido tartarico 2:1 a concentrazioni di 50 µl/ml degradano la maggior parte dell'H₂O₂ con percentuali di scavenging H₂O₂ rispettivamente del 99,57 %, 99,06 % e 99,02 % (Grafico 10).

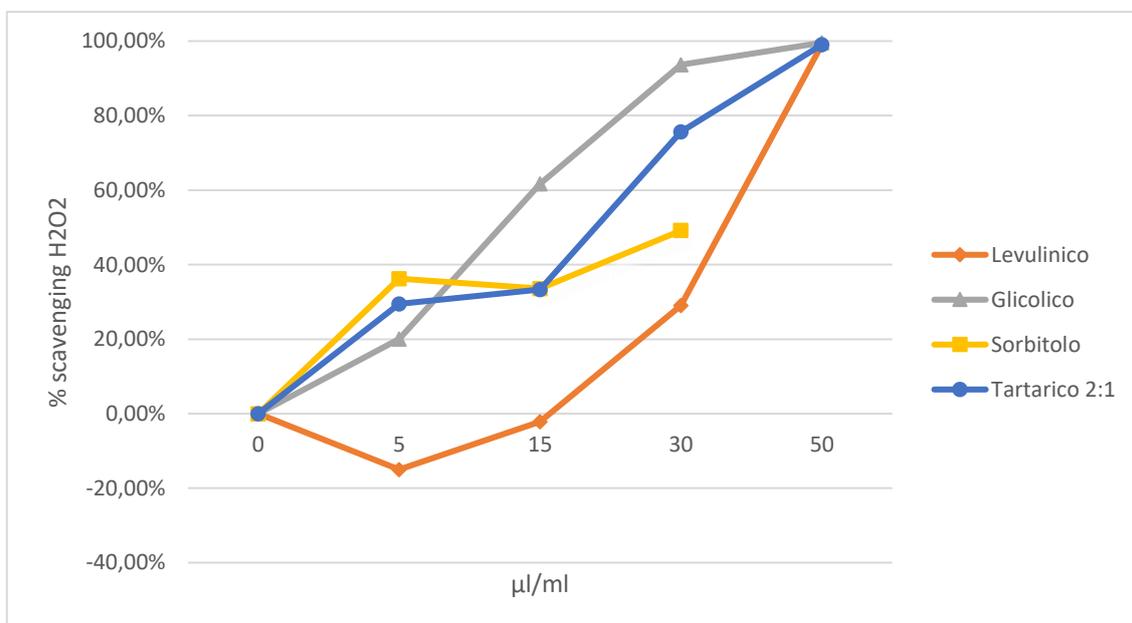


Grafico 10 attività antiossidante degli estratti polifenolici in DES ChCl – acido levulinico, ChCl – acido glicolico, ChCl – sorbitolo e ChCl – acido tartarico

Gli estratti polifenolici in DES ChCl – acido levulinico e ChCl – urea non hanno dato risultati coerenti con quelli degli altri estratti. In particolare, ChCl – acido levulinico mostra un andamento non lineare e una regressione nelle prime due concentrazioni con valori negativi rispettivamente di -15% per la concentrazione 5 $\mu\text{l/ml}$ e -2,16% per la concentrazione 15 $\mu\text{l/ml}$ per poi ritornare a risultati coerenti a 30 $\mu\text{l/ml}$ (Grafico 10).

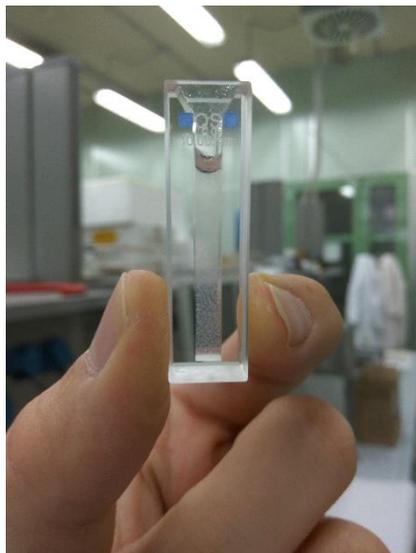


Figura 14 precipitato formatosi durante l'analisi spettrofotometrica dell'attività antiossidante di estratti polifenolici in DES ChCl – urea

Per quanto riguarda l'estratto ChCl – urea, durante il protocollo di analisi si è formato un precipitato (Figura 14) che molto probabilmente ha causato

delle letture errate allo spettrofotometro invalidando l'analisi, tuttavia non sono stati fatti ulteriori approfondimenti.

4.3. preparazione di gel bio-based arricchiti in polifenoli

I gel a base di biopolimeri sono materiali promettenti che hanno molte potenziali applicazioni, come per esempio in ambito cosmetico, biomedicale e agricolo dove possono fungere da supporti o agenti per la veicolazione di molecole bioattive o farmaci.

In un altro lavoro di tesi svolto contemporaneamente a questo nello stesso laboratorio, sono stati sviluppati gel bio-based costituiti da vari polisaccaridi (amido, agar-agar, polisaccaridi da alghe) e DES, per applicazioni nell'ambito dei beni culturali, della cattura della CO_2 e di materiali conduttivi. In particolare, si sono ottenuti ottimi risultati nella formazione di gel con DES ChCl – urea e amido di mais (Figura 15).

Si è già visto come i DES siano risultati buoni solventi per estrarre composti polifenolici dai sottoprodotti di lavorazione dell'attività vitivinicola. Per la formazione di gel arricchiti in polifenoli il DES ChCl – urea è stato caricato di polifenoli come illustrato in precedenza ed è stato poi addizionato in rapporto 1:1 in peso di amido di mais e mescolato fino ad ottenere un composto omogeneo. Il composto poi è stato riscaldato su piastra a 90 °C in capsule petri da 3 cm di diametro o in capsule di stagno per analisi elementare per 7 minuti o fino alla solidificazione del composto.



Figura 15 gel ChCl - urea e amido di mais preparato in capsule di stagno e pesato

4.4. test di tossicità degli estratti polifenolici

Essendo uno degli obiettivi di questo lavoro di tesi la caratterizzazione ecotossicologica degli estratti polifenolici ottenuti con l'uso di metodologie green, sono stati effettuati tre test di tossicità, ritenuti più peculiari vista la destinazione d'uso degli estratti, tra quelli previsti dalla normativa REACH. Poiché è previsto un uso in ambito agricolo dei DES caricati in polifenoli e dei rispettivi DES gelificati e poiché è ragionevole pensare che oltre al comparto suolo queste sostanze possano migrare nel comparto acqua e trasferirsi in ecosistemi acquatici, gli estratti e i gel sono stati testati per la pronta biodegradabilità e per la tossicità acuta nei confronti di *Daphnia magna* e *Raphidocelis subcapitata*.

4.4.1. test di tossicità su *Daphnia magna*

Daphnia magna (Figura 16) è un piccolo crostaceo planctonico appartenente all'ordine Cladocera ma ampiamente distribuito in Nord America, Eurasia e in alcune regioni dell'Africa. Le femmine adulte raggiungono dimensioni fino a 5 mm mentre i maschi tendono a non superare i 2mm e hanno antenne più lunghe. Il corpo è protetto da un carapace traslucido composto di chitina che presenta un'apertura ventrale e 5 paia di arti toracici. La testa è dotata di antenne e di un grande occhio composto impari.



Figura 16 femmina adulta con uova di *Daphnia magna*

D. magna è una specie chiave in molti habitat lentici. La si può trovare nei laghi e negli stagni superficiali ricchi di sedimenti e materia organica. Si alimenta filtrando particelle sospese, un apparato filtrante specializzato formato dalle appendici toraciche genera una corrente d'acqua all'interno dell'apertura toracica del carapace che

consente la raccolta e l'ingestione di alghe e batteri. Come la maggior parte delle altre specie del genere *Daphnia*, *D. magna* si riproduce per partenogenesi ciclica. Questa forma di riproduzione è caratterizzata dall'alternarsi di periodi in cui le femmine

producono uova diploidi partenogenetiche che si sviluppano senza bisogno di essere fecondate e di periodi in cui vengono invece prodotte uova aploidi anfigoniche che devono essere fecondate da individui di sesso maschile per poter iniziare lo sviluppo embrionale. Le uova partenogenetiche si sviluppano normalmente in individui di sesso femminile e in condizioni ambientali favorevoli le popolazioni sono costituite esclusivamente o prevalentemente da femmine. In risposta a condizioni sfavorevoli una frazione rilevante si sviluppa invece in maschi. In coincidenza con la comparsa di maschi all'interno della popolazione, le femmine iniziano a produrre uova anfigoniche. Le uova partenogenetiche si schiudono all'interno del corpo della femmina un giorno dopo essere state deposte e vengono rilasciate dopo tre giorni. I giovani diventano maturi in un periodo compreso tra i 5 e i 10 giorni, a seconda della temperatura. Una femmina adulta è in grado di produrre un tipicamente 6 – 7 uova ogni 3 o 4 giorni fino alla morte. La durata della vita di un individuo in laboratorio a 20°C è solitamente di 3 mesi. Le uova anfigoniche non si sviluppano immediatamente e si depositano sul fondo dei corpi idrici o dei contenitori utilizzati per l'allevamento. Queste uova possono restare quiescenti per anni, resistendo anche al disseccamento e costituiscono una forma di resistenza.¹¹⁸

D. magna presenta numerosi vantaggi se utilizzato come organismo test in saggi ecotossicologici. La trasparenza permette di osservare la sua struttura anatomica interna al microscopio mentre la riproduzione per partenogenesi permette la generazione di popolazioni clonali, costituite da individui molto omogenei, anche per quanto riguarda la sensibilità alle sostanze tossiche. È considerato un organismo facilmente allevabile in laboratorio, la sua alimentazione è semplice e poco costosa ed ha un tempo di generazione molto veloce.

In ecotossicologia *D. magna* è indicato come organismo test nelle linee guida OECD per la sperimentazione di sostanze chimiche nei test 202 e 211.^{114, 115} Il test n° 202 "Daphnia sp., Acute Immobilisation Test" in particolare è uno studio di tossicità acuta della durata di 48 ore in cui degli individui nati da non più di 24 ore sono esposti a diverse concentrazioni della sostanza test per determinare l'EC50, cioè la concentrazione che determina l'immobilizzazione del 50% degli individui esposti.

Colina cloruro e urea sono due sostanze considerate poco tossiche. I valori di EC50 riportati in letteratura sono rispettivamente di 0,5 g/L per la colina cloruro e di 10 g/L per l'urea.^{102, 103} A differenza delle singole componenti invece i DES, in quanto solventi di nuova generazione, non sono ancora pienamente caratterizzati dal punto di vista ecotossicologico e quindi le informazioni reperibili in letteratura riguardo la tossicità a breve termine verso *D. magna* sono scarse. Finora, l'ipotesi che i DES siano benigni si basa su dati di tossicità per i componenti che costituiscono i DES. Tuttavia, questo non tiene conto della possibilità di effetti sinergici derivati dalla combinazione dei composti costituenti i DES che potrebbe avere un impatto significativo sulle proprietà biologiche di tali miscele.¹⁰⁴

A tal proposito Juneidi et. al.¹⁰⁵ ha testato la tossicità del DES ChCl – urea e delle singole sostanze che lo compongono su *Cyprinus carpio* mettendo in evidenza una tossicità maggiore del DES rispetto alla colina cloruro. Tuttavia, il DES è risultato meno tossico se comparato ad una soluzione acquosa di sola urea o ad una soluzione acquosa delle due costituenti del DES.

Ventura et. al.¹⁰⁸ invece ha valutato la tossicità verso *Vibrio fischeri* di 10 DES a base di colina cloruro e i risultati hanno dimostrato come la maggior parte di questi composti possa essere classificata come praticamente innocua nei confronti di questi organismi.

I test effettuati su *D. magna* hanno riguardato le singole componenti del DES, il DES ChCl – urea arricchito e non in polifenoli derivati da vinaccia rossa e i DES arricchiti e non sotto forma di gel. I test si sono svolti seguendo la metodica OECD 202. I test sono stati svolti incubando 5 individui nati da meno di 24 ore in 50 ml di acqua ricostituita preparata secondo le indicazioni del metodo ISO 6341¹¹⁶ arricchito per ogni concentrazione della sostanza da testare. Sono state eseguite un minimo di 4 repliche per ridurre la variabilità interna al sistema. Come endpoint si è utilizzato il numero di individui immobilizzati dopo 48 ore di esposizione. I dati sono stati analizzati con il metodo della regressione probit, utilizzando il software Benchmark Dose Software (BMDS) della US-EPA. Questo ha permesso di stimare il valore di EC50.

Data la scarsità di dati di letteratura si è svolto un primo test con delle concentrazioni esplorative (Tabella 7), per poter successivamente restringere il campo delle concentrazioni testate. Una volta individuato l'intervallo di concentrazioni da saggiare, il test è stato ripetuto quattro volte, utilizzando sempre le stesse concentrazioni.

Codice test	urea	colina	DES	Estratto polifenolico	Gel DES	Gel Estratto polifenolico
Valsovit 1.1	0,300 g/L	0,300 g/L	0,300 g/L	0,300 g/L		
	1 g/L	1 g/L	1 g/L	1 g/L		
	3 g/L	3 g/L	3 g/L	3 g/L		
	10 g/L	10 g/L	10 g/L	10 g/L		
Valsovit 1.2	1 g/L	0,300 g/L	0,300 g/L	1 g/L	0,300 g/L	0,300 g/L
	1,778 g/L	0,448 g/L	0,533 g/L	1,442 g/L	1 g/L	3 g/L
	3,162 g/L	0,669 g/L	0,949 g/L	2,080 g/L	3 g/L	10 g/L
	5,623 g/L	1 g/L	1,681 g/L	3 g/L	10 g/L	
	10 g/L		3 g/L			
Valsovit 1.3		0,300 g/L	0,300 g/L	1 g/L	0,300 g/L	1 g/L
		0,448 g/L	0,533 g/L	1,442 g/L	1 g/L	3 g/L
		0,669 g/L	0,949 g/L	2,080 g/L	3 g/L	10 g/L
		1 g/L	1,681 g/L	3 g/L	10 g/L	
			3 g/L			
Valsovit 1.4	1 g/L	0,562 g/L	0,562 g/L	0,316 g/L	0,178 g/L	0,178 g/L
	1,778 g/L	1 g/L	1 g/L	0,562 g/L	0,316 g/L	0,316 g/L
	3,162 g/L	1,778 g/L	1,778 g/L	1 g/L	0,562 g/L	0,562 g/L
	5,623 g/L	3,162 g/L	3,162 g/L	1,778 g/L	1 g/L	2 g/L
	10 g/L	5,623 g/L	5,623 g/L	3,162 g/L	1,78 g/L	1,78 g/L
Valsovit 1.5	1 g/L	0,562 g/L	0,562 g/L	0,316 g/L	0,178 g/L	0,178 g/L
	1,778 g/L	1 g/L	1 g/L	0,562 g/L	0,316 g/L	0,316 g/L
	3,162 g/L	1,778 g/L	1,778 g/L	1 g/L	0,562 g/L	0,562 g/L
	5,623 g/L	3,162 g/L	3,162 g/L	1,778 g/L	1 g/L	2 g/L
	10 g/L	5,623 g/L	5,623 g/L	3,162 g/L	1,78 g/L	1,78 g/L

Tabella 7 concentrazioni test D. magna

Dai risultati ottenuti è possibile fare le seguenti osservazioni:

- L'EC50 dell'urea è di 9,4 g/L, in linea con quanto presente in letteratura, questo ci dà conferma di come l'urea non sia un composto tossico per *D. magna*. (Grafico 11)
- Colina cloruro è più tossica dell'urea con un EC50 di 2,1 g/L
- Il DES ChCL – Urea mostra una tossicità paragonabile a quella della colina cloruro con un EC50 di 1,8 g/L. questo dato lascia pensare che la tossicità del DES sia dovuta prevalentemente alla colina cloruro ma sono necessari ulteriori approfondimenti.
- Il DES ChCL – urea arricchito in polifenoli disciolto in acqua ISO forma un precipitato persistente che durante le 48 ore del test tende ad agglomerarsi intrappolando al suo interno *D. magna* rendendo complessa l'operazione di conta degli individui immobili. È molto probabile che la mortalità osservata non sia stata dovuta alla tossicità del composto ma alla presenza di questi ammassi che hanno inglobato e immobilizzato gli individui. L'EC50 per l'estratto polifenolico è di 1,3 g/L, leggermente minore del DES non caricato in polifenoli (Grafico 11).
- I gel sono stati testati per via della loro presunta capacità di rilasciare nel mezzo in modo graduale nel tempo i composti polifenolici con cui sono stati caricati. A tal proposito sono stati testati gel caricati di estratto polifenolico e gel non caricati. Tuttavia, anche a basse concentrazioni è stata osservata un'elevata mortalità, confermata da tutte le repliche effettuate. L'EC50 per il gel caricato in polifenoli è 0,61 g/L quello per il gel non caricato invece è 0,57 g/L. L'ipotesi più probabile per l'elevata tossicità dei gel nei confronti di *D. magna* è che l'amido di mais utilizzato per la formazione del gel possa reagire con il DES a formare amido cationico,¹⁰⁶ un flocculante che si disperde nel mezzo di coltura e che cattura e ingloba gli individui di *D. magna* immobilizzandoli (Grafico 11).¹⁰⁷

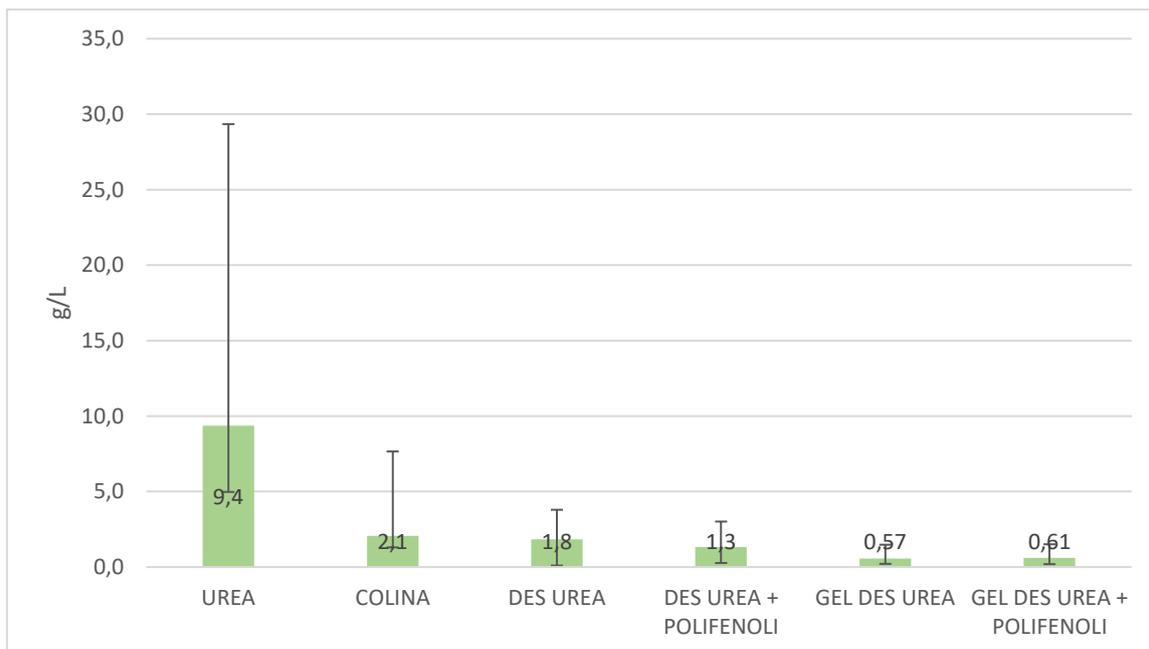


Grafico 11 risultati dei test di tossicità eseguiti su *D. magna*; le barre d'errore rappresentano l'intervallo di confidenza.

In conclusione, nonostante i test eseguiti si possano definire come preliminari, si può affermare come, sebbene le singole componenti non risultino tossiche verso *D. magna*, la colina cloruro sembra avere una tossicità maggiore rispetto all'urea. Inoltre, il DES risultante dalla combinazione delle due sembra esibire una tossicità simile a quella della colina cloruro, mentre il DES caricato in polifenoli presenta problemi dovuti a flocculazione che ha reso imprecisi i risultati del test. I gel in particolare risultano più tossici del DES ChCl – urea e dell'estratto e si ipotizza che la maggior tossicità sia dovuta alla formazione di amido cationico durante la preparazione del gel. Comunque, anche l'EC50 dei gel sono ben al di sopra del limite dei 100 mg/L convenzionalmente utilizzato per identificare una sostanza come *hazardous to the aquatic environment*.¹¹⁷

4.4.2. Test di tossicità su *Raphidocelis subcapitata*

Raphidocelis subcapitata (Figura 17), precedentemente nota come *Selenastrum capricornutum* e *Pseudokirchneriella subcapitata* è una microalga che presenta un aspetto curvo e contorto come una falce. Le cellule si presentano normalmente in forma solitaria ed hanno una lunghezza compresa tra 8 e 14 μm ed una larghezza tra 2 e 3 μm . Viene comunemente usata

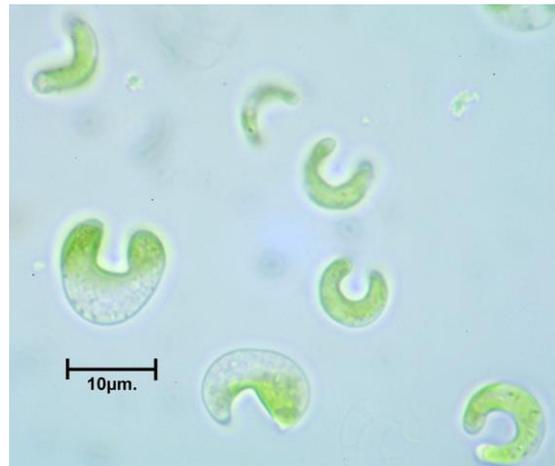


Figura 17 foto al microscopio ottico di *Raphidocelis subcapitata*

come bioindicatore per valutare i livelli di nutrienti o di sostanze tossiche negli ambienti di acqua dolce. Questa specie è abbastanza sensibile alla presenza di sostanze tossiche tra cui metalli e ha una distribuzione ubiquitaria e per questi motivi trova ampio uso in ecotossicologia.

Colina cloruro e urea presentano una bassa tossicità anche nei confronti di *Raphidocelis subcapitata*. In particolare, la concentrazione soglia dell'urea per alghe d'acqua dolce è $> 10000 \text{ mg/L}$ e l'EC50, cioè la concentrazione in grado di dimezzare il tasso di accrescimento, della colina cloruro è $> 500 \text{ mg/L}$.^{102, 103}

I test effettuati su *Raphidocelis subcapitata* hanno riguardato le singole componenti del DES, il DES ChCl – urea arricchito e non in polifenoli derivati da vinaccia rossa e i DES arricchiti e non sotto forma di gel. I test si sono svolti seguendo la metodica OECD 202. In ogni beuta da 100 ml sono stati aggiunti 50 ml di mezzo di coltura sterile arricchito della sostanza da testare, le beute precedentemente sterilizzate sono state fatte ambientare alle condizioni del test per 3 ore prima dell'inoculo di *Raphidocelis subcapitata*. Come endpoint si è osservata l'inibizione della crescita algale dopo 72 ore rispetto ad un bianco di controllo tenuto nelle stesse condizioni dei campioni da analizzare. I dati sono stati analizzati tramite regressione non lineare, assumendo un modello logistico, utilizzando il software STATISTICA prodotto dalla Statsoft.

Le concentrazioni usate nei test sono elencate in tabella 9.

Codice test	urea	colina	des	estratto polifenolico	des gel	estratto polifenolico gel
Valsovit 2.1	0,3 g/L	0,3 g/L	0,3 g/L	0,3 g/L	0,3 g/L	0,3 g/L
	1 g/L	1 g/L	1 g/L	1 g/L	1 g/L	1 g/L
	3 g/L	3 g/L	3 g/L	3 g/L	3 g/L	3 g/L
	10 g/L	10 g/L	10 g/L	10 g/L	10 g/L	10 g/L
Valsovit 2.2	1 g/L	1 g/L	0,3 g/L	0,1 g/L		
	2,15 g/L	2,15 g/L	1 g/L	0,215 g/L		
	4,64 g/L	4,64 g/L	2,15 g/L	0,464 g/L		
	10 g/L	10 g/L	4,64 g/L	1 g/L		
			10 g/L			
Valsovit 2.3					0,3 g/L	0,3 g/L
					1 g/L	1 g/L
					3 g/L	3 g/L
					10 g/L	10 g/L
Valsovit 2.4	0,3 g/L	0,3 g/L	0,3 g/L			
	1 g/L	1 g/L	1 g/L			
	3 g/L	3 g/L	3 g/L			
	10 g/L	10 g/L	10 g/L			
Valsovit 2.5			0,464 g/L	0,215 g/L		
			1 g/L	0,464 g/L		
			2,15 g/L	1 g/L		
			4,64 g/L	2,15 g/L		

Tabella 8 concentrazioni usate nei test di tossicità con *Raphidocelis subcapitata*

Dai risultati del test presentati nella tabella 10 è stato possibile evidenziare che:

- Per quanto riguarda le singole componenti che costituiscono il DES l'urea non presenta particolare tossicità nei confronti di *Raphidocelis subcapitata*, infatti dai test effettuati è emerso un EC50 > 10 g/L ed in alcuni casi si sono osservati fenomeni di accrescimento algale maggiore del controllo nelle soluzioni contenenti urea a basse concentrazioni. Anche la colina cloruro ha mostrato bassa tossicità con un EC50 stimato 5,7 g/L ed un intervallo di confidenza che è stato calcolato da un minimo di 3,9 g/L (Lo. Conf) ad un massimo di 8,5 g/L (Up. Conf).

- Per il DES ChCl – urea è stato calcolato un EC50 di 8,2 g/L con un intervallo di confidenza che si estende da un minimo di 6,4 g/L (Lo. Conf) ad un massimo di 10,4 g/L (Up. Conf). Si può quindi definire il DES ChCl – urea praticamente innocuo nei confronti di *Raphidocelis subcapitata*.
- Anche in questo caso come per *D. magna* il DES ChCL – urea diluito nel mezzo di coltura algale ha formato un precipitato che ha inglobato la maggior parte delle alghe lasciate crescere nella beuta, falsando sia la lettura della densità ottica allo spettrofotometro che la conta manuale con camera di Burker al microscopio ottico. È stato calcolato un EC50 di 1,3 g/L con un intervallo di confidenza che si estende da un minimo di 1,1 g/L (Lo. Conf) ad un massimo di 1,5 g/L (Up. Conf). Tuttavia, nonostante la maggior tossicità riscontrata dell'estratto polifenolico rispetto al DES non caricato in polifenoli, non sembra sensato attribuirlo ai polifenoli in sé, quanto al precipitato che ha inglobato al suo interno la maggior parte di *Raphidocelis subcapitata*. Non si è approfondita la natura del precipitato.
- Dai test è emerso come anche il DES ChCL – urea sotto forma di gel sia praticamente innocuo nei confronti di *Raphidocelis subcapitata* con un EC50 calcolato di 8,6 g/L e un intervallo di confidenza che si estende da un minimo di 5,7 g/L (Lo. Conf) ad un massimo di 12,9 g/L (Up. Conf). In alcuni casi *Raphidocelis subcapitata* ha usato il gel come substrato di accrescimento, formando un sottile strato verde di alghe sulla superficie dei campioni di gel messi nelle beute assieme al mezzo di coltura.
- Il DES ChCL – urea caricato in polifenoli sotto forma di gel invece mostra una tossicità maggiore rispetto al gel non caricato in polifenoli con un EC50 calcolato di 3,1 g/L e un intervallo di confidenza che si estende da un minimo di 2,4 g/L (Lo. Conf) ad un massimo di 4,0 g/L (Up. Conf). Anche qui come nel caso del DES caricato in polifenoli il GEL aggiunto al mezzo di coltura e tenuto in agitazione costante ha formato un flocculato che ha inglobato la maggior parte di *Raphidocelis subcapitata* falsando sia la lettura della densità ottica che la conta con camera di Burker. Anche in questo caso non sembra il caso di attribuire la maggior tossicità ai polifenoli aggiunti al DES quanto piuttosto al precipitato.

sostanza	EC50 g/L		
	Estimate	Lo. Conf	Up. Conf
urea	> 10		
colina	5,7	3,9	8,5
DU	8,2	6,4	10,4
DUP	1,3	1,1	1,5
GDU	8,6	5,7	12,9
GDUP	3,1	2,4	4,0

Tabella 9 EC50 *Raphidocelis subcapitata*

In conclusione, nonostante i test eseguiti si possano definire come preliminari per via dei problemi riscontrati e per il poco tempo a disposizione, si può affermare che il DES ChCL – urea sia gelificato che non, risulta praticamente innocuo nei confronti di *Raphidocelis subcapitata*. Caricare il DES con polifenoli sembra aumentarne la tossicità nei confronti dell'alga ma dai risultati ottenuti non è stato possibile determinare se la tossicità fosse dovuta all'aggiunta di polifenoli al DES. Tutti i valori di EC50 stimati sono comunque almeno un'ordine di grandezza al di sopra del limite dei 100 mg/L convenzionalmente utilizzato per identificare una sostanza come *hazardous to the aquatic environment*.¹¹⁷

4.4.3. Test di pronta biodegradabilità in acqua

Per poter caratterizzare appieno l'estratto polifenolico in DES ChCl – urea e visto l'interesse verso un suo possibile uso in campo agricolo, soprattutto sotto forma di gel per il rilascio controllato nel tempo di polifenoli, si è voluta esplorare la capacità degli estratti, del DES, delle componenti del DES prima della sua formazione e dei gel di essere prontamente biodegradati da microorganismi aerobi

La capacità di essere degradati da microorganismi aerobici dell'estratto polifenolico in DES ChCl – urea, il DES tal quale, le singole componenti e i gel è stata testata seguendo la metodica OECD 301D closed bottle test.¹¹⁹

Urea e colina cloruro secondo quanto riportato in letteratura sono definite sostanze prontamente biodegradabili con tassi di biodegradazione del 100 % dopo 21 giorni per l'urea e del 75 – 90 % dopo 5 giorni per la colina cloruro.^{102, 103}

Per il test sono stati usati batteri aerobici (fango attivato) presi dal depuratore locale e ambientati in laboratorio per 5 giorni. Le concentrazioni delle sostanze testate sono elencate nella tabella 8.

UREA	50 mg/L
COLINA	50 mg/L
DES	50 mg/L
ESTRATTO POLIFENOLICO	50 mg/L
GEL DES	100 mg/L
GEL ESTRATTO	100 mg/L
GLUCOSIO	100 mg/L

Tabella 10 concentrazioni delle sostanze testate

Dai risultati del test è stato possibile evidenziare che:

- Il gel a base di DES ChCL – urea ha raggiunto il 51 % di biodegradazione (60 % ThOD) dopo due giorni ed è stato completamente degradato in 3 giorni. Il gel arricchito in estratto polifenolico dopo due giorni ha raggiunto il 66 % di biodegradazione (60 % ThOD) ed è stato completamente degradato dopo 3 giorni (Grafico 12).
- Per quanto riguarda le singole componenti del DES prima della sua formazione, la colina cloruro ha raggiunto il 70,4 % di biodegradazione (60 % ThOD) dopo due giorni. Il test è stato eseguito due volte sull'urea ma in entrambi i casi non è stata degradata completamente. Nel primo test l'urea ha raggiunto il 10 % del ThOD dopo 13 giorni con una percentuale massima di degradazione del 51 % dopo 21 giorni mentre nel secondo test ha raggiunto il 10 % del ThOD dopo 11 giorni con una percentuale massima di degradazione del 15 % dopo 12 giorni (Grafico 12).
- Il DES ChCL – urea ha raggiunto il 10 % del ThOD dopo 2 giorni ed è stato degradato al 64 % raggiungendo il 60% del ThOD dopo 15 giorni (Grafico 12).
- Anche il DES arricchito in polifenoli ha raggiunto il 10 % del ThOD dopo due giorni ma è stato degradato al circa il 53 % raggiungendo il 60% del ThOD dopo 8 giorni (Grafico 12).

Poiché un composto possa essere definito prontamente biodegradabile deve raggiungere il 60% del ThOD entro 10 giorni dal raggiungimento del 10 % del ThOD. I gel sia arricchiti che non in polifenoli quindi si possono definire prontamente biodegradabili, probabilmente per via della presenza dell'amido di mais. Al contrario il DES ChCl – urea non può essere definito prontamente biodegradabile (15 giorni per raggiungere il 60% del ThOD) mentre il DES caricato in polifenoli raggiunge il 60% del ThOD dopo 8 giorni e quindi si può definire prontamente biodegradabile.

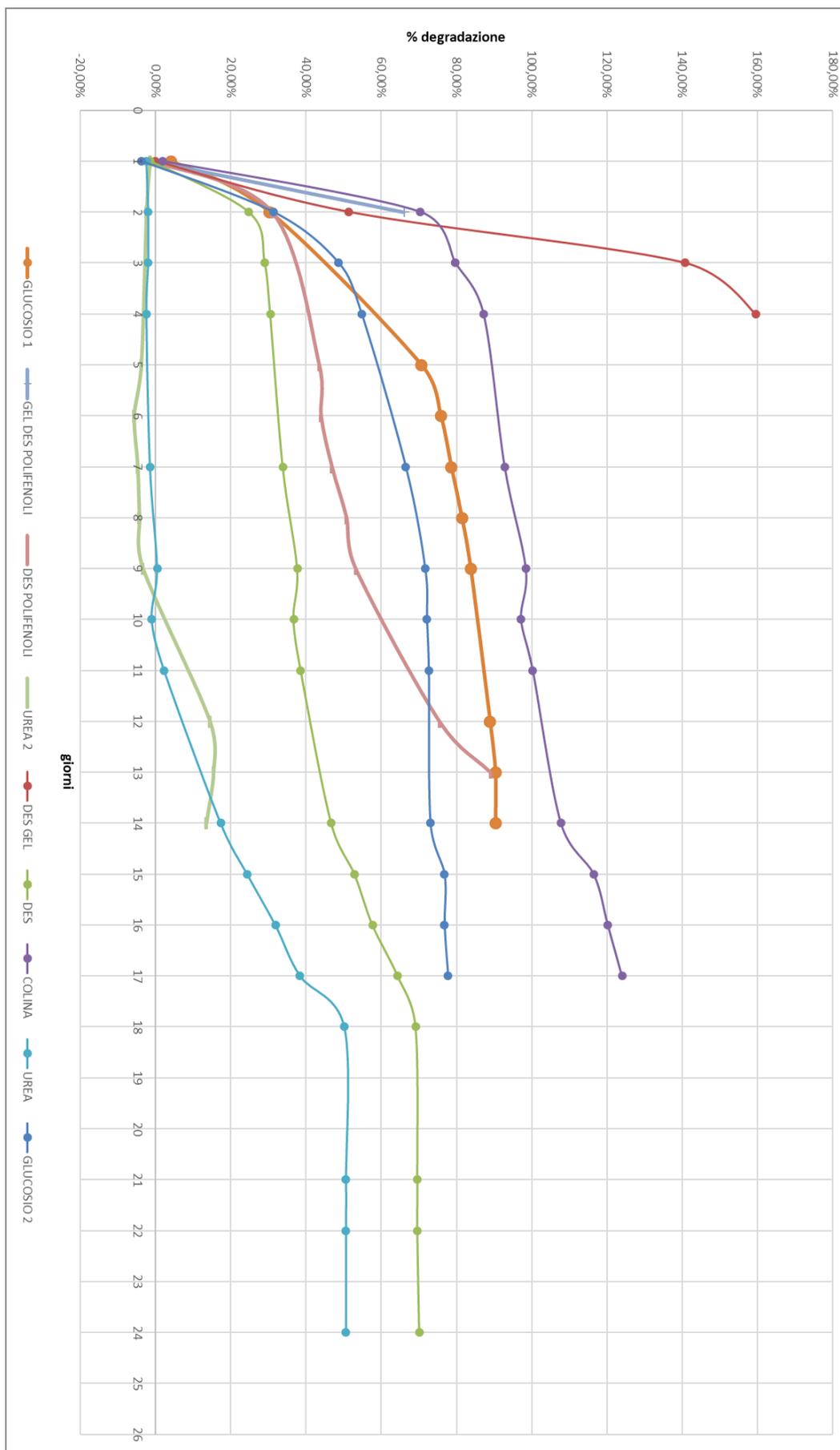


Grafico 8 risultati test BOD

5. Conclusioni

In questo lavoro di tesi ci si è focalizzati sul recupero di molecole bioattive da sottoprodotti dell'attività vitivinicola sviluppando protocolli sostenibili basati sull'utilizzo di solventi green quali dimetilcarbonato (DMC) e deep eutectics solvents (DES). Sono stati sviluppati anche gel bio-based in cui i polifenoli sono stati inclusi al fine di ottenere materiali che ne permettano un rilascio mediato nel tempo e che possano essere usati in vari campi come per esempio in quello agricolo o cosmetico.

Il dimetilcarbonato si è rivelato essere un ottimo solvente per l'estrazione di lipidi, con rese paragonabili rispetto a quanto ottenuto con la metodica Bligh e Dyer. La composizione degli estratti in DMC inoltre non ha presentato sostanziali differenze rispetto a quella degli estratti ottenuti con la metodica classica. Il pretrattamento della biomassa con DES invece ha portato ad un forte calo delle percentuali di lipidi recuperati ed in alcuni casi anche ad una riduzione della percentuale degli acidi grassi presenti nell'estratto lipidico.

L'utilizzo di DES per l'estrazione di polifenoli da biomassa residuale derivante attività vitivinicola invece risulta essere molto vantaggioso, con rese maggiori o talvolta doppie rispetto a quanto ottenibile con una miscela di acqua e etanolo. Dai test effettuati è risultato come i DES ChCl – acido levulinico e ChCl – acido tartarico 2:1 siano i più efficaci nell'estrazione di polifenoli da vinaccia rossa.

La stabilità dei polifenoli negli estratti a base di DES è stata misurata e si può concludere che i polifenoli in questi estratti non sono stati soggetti ad eccessiva degradazione nel tempo; l'estratto che si è degradato di meno è ChCl – etilenglicole (degradazione del 5.3% dei polifenoli estratti) mentre quello in cui si è osservata una maggiore degradazione dei polifenoli è ChCl – acido tartarico (degradazione del 5.9% dei polifenoli estratti).

Per quanto riguarda l'attività antiossidante i DES caricati in polifenoli hanno mostrato buone capacità di degradare H_2O_2 arrivando a rimuovere nel caso dei DES ChCl – acido tartarico 2:1 e ChCl – acido glicolico più della metà dell'acqua ossigenata a concentrazioni di 30 μ l/ml e nel caso dei DES ChCl – acido levulinico, ChCl – acido

tartarico 2:1 e ChCl – acido glicolico la totalità dell'acqua ossigenata aggiunta nel campione a concentrazioni di 50 µl/ml.

Dal punto di vista dell'impatto ambientale, i gel a base di ChCl – urea e amido di mais sia caricati in polifenoli che non, possano essere definiti prontamente biodegradabili; in linea con quanto presente in letteratura inoltre anche la colina cloruro si è dimostrata prontamente biodegradabile. Anche il DES ChCl – urea caricato in polifenoli è risultato essere prontamente biodegradabile mentre al contrario il DES ChCl – urea non caricato in polifenoli non è risultato prontamente biodegradabile.

I test di tossicità, benché solamente preliminari hanno dimostrato come il DES ChCl – urea presenti una tossicità nei confronti di *Daphnia magna* simile a quella della colina cloruro, mentre l'urea non ha mostrato particolare tossicità in accordo a quanto presente in letteratura. Il DES ChCl – urea caricato in polifenoli invece ha presentato una tossicità più elevata nei confronti di *D. magna* dovuta però con grande probabilità alla formazione di un flocculato che ha immobilizzato gli individui e non alla aggiunta dei polifenoli al DES; tuttavia sono necessari ulteriori approfondimenti sull'argomento. Anche i gel, sia caricati in polifenoli che non, sono risultati relativamente tossici verso *D. magna* molto probabilmente per via della formazione di amido cationico all'interno della miscela che poi è stato rilasciato nel mezzo di coltura.

Dai test effettuati su *Raphidocelis subcapitata*, benché solamente preliminari anche questi, è emerso come il DES ChCl – urea sia gelificato che non risulti praticamente innocuo nei confronti della microalga, tanto che in alcuni test è stato usato come substrato di crescita. Il DES ChCl – urea sia gelificato che non se caricato in polifenoli presenta una tossicità maggiore nei confronti di *Raphidocelis subcapitata* dovuta sempre alla formazione di flocculato che ingloba al suo interno le microalghe. Tuttavia, dai risultati ottenuti non è stato possibile definire con precisione se la maggior tossicità fosse dovuta, come sembra, solamente alla presenza del flocculato o se l'aggiunta di polifenoli al DES giochi un ruolo importante nella tossicità dei DES.

Sulla base dei risultati ottenuti con le due specie saggiate, comunque, nessuna delle sostanze saggiate risulta *hazardous to the aquatic environment*.¹¹⁷

5.1. prospettive future

Il fine principale di questo lavoro di tesi è stato quello di valutare la possibilità di estrarre biomolecole attive da sottoprodotti dell'attività vitivinicola applicando protocolli estrattivi sostenibili che prevedessero l'uso di solventi green come il dimetilcarbonato e i deep eutectics solvents al fine di produrre degli estratti che possano essere utilizzati in vari campi tra cui quello agricolo. Le metodiche applicate si sono dimostrate efficaci ed i solventi utilizzati si sono rivelati buone alternative green ai solventi tradizionali.

In futuro si potranno svolgere altre attività per completare il lavoro come:

- Valutare la tossicità e la biodegradabilità degli estratti ottenuti anche sul suolo, utilizzando anche organismi terrestri.
- Continuare ed approfondire i test di tossicità in acqua già iniziati in questo lavoro di tesi, risolvendo le problematiche riscontrate e migliorando i dati raccolti.
- Valutare il potenziale effetto benefico degli estratti prodotti nei confronti delle piante (es.: test di germinazione).
- Ampliare i test sulla capacità antiossidante dei DES arricchiti in polifenoli risolvendo le problematiche riscontrate.

6. materiali e metodi

6.1. composti chimici

Tutti i reagenti ed i solventi usati in questo lavoro sono stati acquistati da Sigma-Aldrich, fluka analytical e Carlo Erba Reagents (purezza $\geq 99\%$) e sono stati utilizzati senza ulteriori trattamenti o purificazioni

6.2. materiali

La biomassa utilizzata è stata fornita da Caviro Distillerie s.r.l..

Daphnia magna e le microalghe *Raphidocelis subcapitata* utilizzate nei test di tossicità sono state fornite entrambe dal laboratorio di ecotossicologia del Centro Interdipartimentale di Ricerca per le Scienze Ambientali (CIRSA), Università di Bologna, sede di Ravenna.

Daphnia magna è stata allevata in una camera termostatica a temperatura di 20°C, in vasche da 8L, in acqua Guizza, con 50 o 75 individui per vasca e fotoperiodo diviso in 8 h di luce e 16 h di buio.

Raphidocelis subcapitata è stata coltivata in una camera termostatica a temperatura di 20°C, in beute da 100 ml, terreno di coltura OECD TG 201 e fotoperiodo di 24 h.

6.3. metodi

Analisi elementare

La composizione elementare delle biomasse analizzata è stata determinata su un campione di 2-3 mg utilizzando un analizzatore elementare configurato per la determinazione CHNS-O (Thermo Scientific, Flash 2000, Organic Elemental Analyzer) attraverso una tecnica di combustione flash. Per la calibrazione è stato utilizzato come standard il 2,5-bis-(5-tert- butil-2-benzo-ossazol-2-il) tiofene (BBOT). Tutte le analisi sono state eseguite in duplicato.

Analisi del contenuto di ceneri

Un'aliquota di 250 mg di biomassa è stata posta in un crogiuolo portato a peso costante e tarato. Il crogiuolo e la biomassa sono stati posti in muffola e portati ad una temperatura di 600 °C per 6 ore. Dopo un breve raffreddamento le ceneri sono state

Estrazione dei lipidi con diclorometano e metanolo

Un'aliquota variabile di 50mg o 100mg di biomassa è stata estratta con 1ml di metanolo e 2ml di DCM in un tubo da centrifuga per 1 ora e 30 minuti ad una temperatura compresa tra i 50°C ed i 60°C sotto agitazione magnetica. Il campione è stato centrifugato, la fase organica è stata raccolta in un vial pesato e seccata sotto azoto. La procedura viene ripetuta per un totale di 3 volte, aggiungendo la fase organica sempre nello stesso vial. La quantità di lipidi totale è stata determinata per pesata in rapporto alla biomassa usata per l'estrazione.

Preparazione dei DES

DES ChCl + HBD	HBD	Rapporto stechiometrico ChCl/HBD	mmol ChCl	mmol HBD	g ChCl	g HBD	ml H ₂ O
ChCl-U	Urea	1:2	7.73	15.46	1.08	0.92	1.2
ChCl-TAR	Acido tartarico	2:1	7.16	3.58	1	0.54	1.2
ChCl-FRU	Fruttosio	2:1	8.74	4.37	1.22	0.78	1.2
ChCl-OSS	Acido ossalico	1:1	8.74	8.74	1.22	0.78	1.2
ChCl-GLI	Glicerolo	1:2	6.16	16.32	0.86	1.14 (910 µl)	1.2
ChCl-EG	Etilen glicole	1:2	7.58	15.16	1.06	0.94 (850µl)	1.2
ChCl-AG	Acido glicolico	1:2	6.87	13.74	0.96	1.04	1.2
ChCl-S	Sorbitolo	1:2	3.94	7.88	0.55	1.45	1.2
ChCl-AL	Acido levulinico	1:2	7.16	14.32	1	1.69 (1.45ml)	1.2
ChCl-AM	Acido malico	1:2	4.94	9.88	0.69	1.32	1.2

Tabella 11 rapporti stechiometrici e in peso delle componenti che costituiscono i diversi DES

I DES sono stati preparati mescolando in rapporto stechiometrico adeguato la colina cloruro ed il donatore di legami ad idrogeno (HBD). La miscela è stata lasciata in agitazione ad una temperatura compresa tra i 70°C e gli 80°C fino alla formazione di una fase omogenea; al DES successivamente è stata aggiunta acqua fino ad ottenere un rapporto DES/H₂O in peso di 3:2. Con questa procedura sono stati preparati DES a base di ChCl e urea (U), acido tartarico (TAR), fruttosio (FRU), acido ossalico (OSS), glicerolo (GLI), etilenglicole (EG), acido glicolico (AG), sorbitolo (S), acido levulinico (AL), acido malico (AM).

È stato inoltre preparato, sempre seguendo la medesima procedura un DES a base di saccarosio, glucosio e fruttosio in rapporto 1:1:1

DES	Rapporto stechiometrico	mmol saccarosio	mmol glucosio	mmol fruttosio	g saccarosio	g glucosio	g fruttosio	ml H ₂ O
S:G:F	1:1:1	2.83	2.83	2.83	0.97	0.51	0.51	1.2

Tabella 12 rapporti stechiometrici e in peso delle componenti che costituiscono il DES S:G:F

Pretrattamento della biomassa con DES

A 100 mg di biomassa è stato aggiunto 1ml di aDES (DES:H₂O 3:2) in un tubo da centrifuga e la miscela è stata tenuta in agitazione su agitatore magnetico per 3 ore ad una temperatura di circa 50°C. I campioni sono poi stati centrifugati ed il DES è stato separato dalla biomassa; questa è stata lavata per due volte con un'aliquota minima di acqua ed essiccata.

Estrazione di lipidi con dimetil carbonato (DMC)

500 mg di biomassa e 20 ml di DMC vengono tenuti in agitazione a riflusso a T < 90°C per un'ora e mezza in un pallone. La fase organica è stata poi concentrato al rotavapor e la procedura è stata ripetuta una seconda volta aggiungendo nuovamente 20ml di DMC. L'estratto concentrato è stato poi trasferito in un tubo da centrifuga e centrifugato per separare l'estratto dalla biomassa. La fase organica è stata raccolta in un vial pesato e seccata successivamente sotto azoto. La quantità di lipidi totale è stata determinata per pesata in rapporto alla biomassa usata per l'estrazione.

Analogamente 100mg di biomassa pretrattati con DES sono stati aggiunti in un tubo da centrifuga 4 ml di DMC. Il tutto è stato tenuto sotto agitazione per un'ora e mezza a T

< 90°C. I campioni sono stati poi centrifugati e la parte organica surnatante è stata raccolta in un vial, seccata sotto azoto e successivamente pesata.

Analisi dei metilesteri degli acidi grassi (FAME)

All'estratto lipidico sono stati aggiunti 0,4 ml di DMC, 0,1 ml di dimetossi propano e 0,1 ml di KOMe (1,2 M) e la miscela è stata posta a 70°C per un massimo di 30 minuti sotto agitazione magnetica. Successivamente sono stati aggiunti 0,7 ml di MeOH-BF₃ e si è proseguito il riscaldamento a temperatura compresa tra i 60°C ed i 70°C per altri 30 minuti sotto agitazione magnetica. Alla miscela sono stati infine aggiunti 50 µL di standard interno (soluzione 1000 ppm del metilestere dell'acido nonadecanoico C19:0 in esano), 1 ml di esano e 2 ml di soluzione satura di NaCl. La fase organica è stata prelevata e posta in un vial da GC per le successive analisi previa diluizione dell'estratto.

Analisi GC-MS

Le analisi GC-MS sono state effettuate utilizzando un gas cromatografo 6850 Agilent HP interfacciato ad uno spettrometro di massa a quadrupolo 5975 Agilent HP. Gli analiti sono stati separati da una colonna fused-silica HP-5MS (fase stazionaria poli[5% difenil/95%dimetil]silossano, 30 m × 0.25 mm ID, 0.25 µm film) e utilizzando elio come fase mobile (a pressione costante 33 cm s⁻¹ velocità lineare a 200°C). Gli spettri di massa sono stati acquisiti in condizioni di ionizzazione elettronica (EI) a 70 eV, con una frequenza di 1scan s⁻¹ nel range 12-600 m/z.

Programmata per metilesteri degli acidi grassi (FAME): da 50 a 180°C a 50°C min⁻¹, poi da 180 a 300°C a 5°C min⁻¹.

Estrazione dei polifenoli

50 mg di biomassa sono stati estratti con 2 ml di solvente (acqua etanolo; acqua:etanolo 1:1) in un tubo da centrifuga. La miscela è stata tenuta in agitazione a temperatura ambiente per 24 h. I campioni sono poi stati centrifugati per un minuto ed il surnatante è stato separato dalla biomassa e immediatamente analizzato. Nel caso non fosse stato possibile analizzare subito l'estratto questo è stato conservato al

Estrazione dei polifenoli con DES

50 mg di biomassa sono stati estratti con 2 g di aDES 3:2 in H₂O in un tubo da centrifuga. La miscela è stata tenuta in agitazione a temperatura ambiente per 6 h. I campioni sono poi stati centrifugati e l'aDES è stato separato dalla biomassa e immediatamente analizzato. Nel caso non fosse stato possibile analizzare subito l'estratto questo è stato conservato al buio a 4 °C per non più di 18 ore prima di venire utilizzato.

Sono state provate variazioni della temperatura di estrazione (T 50-60°C) senza ottenere significativi miglioramenti. Una cinetica chimica dell'estrazione ha mostrato che il tempo ottimale di estrazione è di 6 h.

Per la formazione dei gel e per i test di tossicità invece, 50 mg di biomassa sono stati estratti con 2 g di aDES in un tubo da centrifuga. La miscela è stata tenuta in agitazione a temperatura ambiente per 6 h. I campioni sono poi stati centrifugati e l'aDES è stato separato dalla biomassa e immediatamente gelificato o utilizzato per la preparazione delle soluzioni per i test di tossicità. Nel caso non fosse stato possibile gelificare o utilizzare subito l'estratto questo è stato conservato in vial ben chiusi al buio a 4 °C per non più di 18 ore prima di venire utilizzato

Analisi dei polifenoli estratti con il reattivo di Folin-Ciocalteu

A 10 µl di estratto diluiti in 190 µl di acetone al 70% v/v sono stati aggiunti 200 µl di reattivo di Folin-Ciocalteu diluito 1:1 in volume con acqua e 4 ml di una soluzione di Na₂CO₃ al 6%. la miscela è stata lasciata a reagire per 30 minuti al buio a temperatura ambiente. Le miscele contenenti estratti a base di aDES sono state filtrate con cotone per gravità per rimuovere il residuo che si è formato.

Le analisi allo spettrofotometro sono state effettuate utilizzando uno spettrofotometro UV-vis Jasco V-650 calibrato a 720 nm. Le concentrazioni sono state riferite ad una curva di calibrazione realizzata con soluzioni a concentrazione nota di floroglucino (1,3,5-triidrossibenzene) in acetone al 70% v/v

Test capacità antiossidante (hydrogen peroxide radical scavenging activity):

Ad una soluzione 4mM di H₂O₂ in buffer fosfatico a pH 7.4 vengono aggiunte varie aliquote di estratto polifenolico per ottenere le seguenti concentrazioni di H₂O₂:

- 0 µl/ml
- 5 µl/ml
- 15 µl/ml
- 30 µl/ml
- 50 µl/ml

I bianchi sono preparati aggiungendo le stesse aliquote di estratto polifenolico in 2 ml di buffer fosfatico senza H₂O₂.

La miscela viene lasciata reagire per 10 minuti al buio a temperatura ambiente.

Le analisi allo spettrofotometro sono state effettuate utilizzando uno spettrofotometro UV-vis Jasco V-650 calibrato a 230 nm. Le concentrazioni sono state riferite ai singoli bianchi. La percentuale di scavenging dell'acqua ossigenata da parte dei polifenoli viene calcolata con la seguente formula:

$$\%scavenging (H_2O_2) = \left[\frac{A_c - A_s}{A_c} \right] \times 100$$

Test di tossicità su *Daphnia magna*

Soluzioni a concentrazione nota di urea, colina, DES ed estratto polifenolico sono preparate in acqua ISO. 5 individui nati da meno di 24 h contate a partire dalla rimozione di tutti gli individui non adulti dalla vasca di allevamento, sono stati tenuti alla stessa temperatura di 20°C (non si è variata ne temperatura ne fotoperiodo) in un beaker coperto con parafilm con 50 ml di ogni soluzione test per ognuna delle concentrazioni saggate. Al termine delle 48 h del test si contano e si registrano gli individui immobili. Per individuo immobile si intende un individuo fermo, che non presenta il tipico movimento natatorio per più di 5 secondi e che non reagisce a stimoli esterni (es.: picchiare il beaker con una penna). Ogni concentrazione è stata saggiata con 4 repliche.

Test di tossicità su *Raphidocelis subcapitata*

Soluzioni a concentrazione nota di urea, colina, DES ed estratto polifenolico sono preparate in mezzo di coltura sterile. 50 ml di mezzo di coltura OECD TG 201 “spiked” per ogni concentrazione di ogni sostanza da testare sono stati lasciati ambientare su di un tavolino oscillante in una camera termostatica tarata a 23°C per almeno 3 h prima di procedere con un inoculo di alghe da una soluzione madre tenuta in allevamento nelle stesse condizioni del test. Come endpoint è stato utilizzato il tasso di accrescimento della coltura, calcolato assumendo l'accrescimento potenziale.

Dopo 72 h si fa una lettura della densità ottica allo spettrofotometro seguita da una conta cellulare con camera di Burker al microscopio ottico. La densità ottica delle soluzioni algali è stata misurata con uno spettrofotometro Jasco V-650 calibrato a 750 nm. Nel caso di soluzioni colorate o in cui vi è interferenza da parte della sostanza testata i campioni sono stati riferiti ad un bianco composto di mezzo di coltura e sostanza in analisi tenuti in condizioni di temperatura ed agitazione analoghe al campione ma senza inoculo algale.

Bibliografia

- 1) Bruno Pàstena, *Trattato di Viticoltura italiana*, 3ª ed., Bologna, Edizioni agricole, 1990.
- 2) FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2017). <http://www.fao.org/faostat/en/#home> consultato il 17/08/17
- 3) OIV. Organizzazione Internazionale della Vigna e del Vino. (2017). <http://www.oiv.int/it/> consultato il 17/08/17
- 4) ANPA ONR. *I rifiuti del comparto agroalimentare, studio di settore*. (2001)
- 5) Maria Antónia Nunes, Francisca Rodrigues, Maria Beatriz P.P. Oliveira. (2017). *Grape Processing By-Products as Active Ingredients for Cosmetic Proposes*. Handbook of Grape Processing By-Products. 267–292
- 6) Chouchouli, V., Kalogeropoulos, N., Konteles, S.J., Karvela, E., Makris, D.P., Karathanos, V.T., (2013). *Fortification of yoghurts with grape (Vitis vinifera) seed extracts*. LWT—Food Sci. Technol. 53, 522–529
- 7) Fiume, M.M., Bergfeld, W.F., Belsito, D.V., Hill, R.A., Klaassen, C.D., Liebler, D.C., Marks, Jr., J.G., Shank, R.C., Slaga, T.J., Snyder, P.W., Andersen, F.A., (2014). *Safety assessment of Vitis vinifera (grape)-derived ingredients as used in cosmetics*. Int. J. Toxicol. 33, 48S–83S
- 8) Ky, I., Lorrain, B., Kolbas, N., Crozier, A., Teissedre, P.-L., (2014). *Wine by-products: Phenolic characterization and antioxidant activity evaluation of grapes and grape pomaces from six different french grape varieties*. Molecules 19, 482–506.
- 9) Barba, F.J., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant'ana, A.S., Orlie, V., (2016). *Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: a review*. Trends Food Sci. Technol. 49, 96–109

- 10) Kraus, A., (2015). *Development of functional food with the participation of the consumer. Motivators for consumption of functional products*. Int. J. Consum. Stud. 39, 2–11.
- 11) Lachman, J., Hejtmánková, A., Táborský, J., Kotíková, Z., Pivec, V., Strěalková, R., Vollmannová, A., Bojněanská, T., Deřina, M., (2015). *Evaluation of oil content and fatty acid composition in the seed of grapevine varieties*. LWT—Food Sci. Technol. 63, 620–625.
- 12) Rebecchi, S., Bertin, L., Vallini, V.A., Bucchi, G., Bartocci, F., Fava, F., (2013). *Biomethane production from grape pomaces: a technical feasibility study*. Environ. Eng. Manag. J. 12 (S11), 105–108.
- 13) Da Ros, C., Cavinato, C., Bolzonella, D., Pavan, P., (2016). *Renewable energy from thermophilic anaerobic digestion of winery residue: preliminary evidence from batch and continuous lab-scale trials*. Biomass Bioenergy 91, 150159.
- 14) Dávila, I., Robles, E., Egüés, I., Labidi, J., Gullón, P., (2017). *The Biorefinery Concept for the Industrial Valorization of Grape Processing By-Products*. Handbook of Grape Processing By-Products. 29-53
- 15) Q. Zhang, K. De Oliveira Vigier, S. Royer and F. Jerome, *Chem. Soc. Rev.*, (2012), 41, 7108-7146.
- 16) SIDS Initial Assessment Report For SIAM 19, 2004.
- 17) García, A., Rodríguez-Juan, E., Rodríguez-Gutiérrez, G., Rios, J. J., & Fernández-Bolaños, J. (2016). *Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESS)*. Food chemistry, 197, 554-561.

- 18) Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). *Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology*. *Analytica chimica acta*, 766, 61-68.
- 19) Gutiérrez, M. C., Ferrer, M. L., Mateo, C. R., & del Monte, F. (2009). *Freeze-drying of aqueous solutions of deep eutectic solvents: a suitable approach to deep eutectic suspensions of self-assembled structures*. *Langmuir*, 25(10), 5509-5515.
- 20) Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., & Duarte, A. R. C. (2014). *Natural deep eutectic solvents—solvents for the 21st century*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(5), 1063-1071.
- 21) Jeong, K.M., Zhao, J.a, Jin, Y.a, Heo, S.R.b, Han, S.Y.a, Yoo, D.E.a, Lee, J., (2015). *Highly efficient extraction of anthocyanins from grape skin using deep eutectic solvents as green and tunable media*. *Arch. Pharm. Res.* (2015) 38:2143–2152
- 22) Marina Cvjetko Bubalo, Natka C´urko, Marina Tomašević, Karin Kovac´ević Ganić, Ivana Radojčić Redovniković, (2016). *Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents*. *Food Chemistry* 200 (2016) 159–166
- 23) Pietro Tundo, Maurizio Selva. (2002). *The Chemistry of Dimethyl Carbonate*. *Acc. Chem. Res.*, vol. 35, nº 9, 2002, 706–16
- 24) Pacheco, Michael A.; Marshall, Christopher L. (1997). *Review of Dimethyl Carbonate (DMC) Manufacture and Its Characteristics as a Fuel Additive*. *Energy Fuels* 11: 2–29.
- 25) U.S. EPA <https://www.federalregister.gov/documents/2009/01/21/E9-1150/air-quality-revision-to-definition-of-volatile-organic-compounds-exclusion-of-propylene-carbonate> consultato il 25/09/2017

- ²⁶⁾ Frankel, E.N., Meyer, A., (2000). *The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants*. J. Sci. Food Agric. 80 (13), 1925–1941.
- ²⁷⁾ Fiori, L., Lavelli, V., Duba, K.S., Sri Harsha, P.S.C., Mohamed, H.B., Guella, G., (2014). *Supercritical CO₂ extraction of oil from seeds of six grape cultivars: modeling of mass transfer kinetics and evaluation of lipid profiles and tocol contents*. J. Supercrit. Fluids 94, 71–80.
- ²⁸⁾ Marinelli, V., Padalino, L., Nardiello, D., Del Nobile, M.A., Conte S A., (2015). *New approach to enrich pasta with polyphenols from grape marc*. J. Chem., article number 734578.
- ²⁹⁾ Saura-Calixto, F., (1998). *Antioxidant dietary fiber product: a new concept and a potential food ingredient*. J. Agric. Food Chem. 46 (10), 4303–4306.
- ³⁰⁾ Patras, A., Brunton, N.P., O'Donnel, C., Tiwari, B.K., (2010). *Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation*. Trends Food Sci. Technol. 21 (1), 3–11.
- ³¹⁾ Giusti, M.M., Wrolstad, R.E., (2003). *Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems*. Biochem. Eng. J. 14 (3), 217–225.
- ³²⁾ Lavelli, V., (2008). *Antioxidant activity of minimally processed red chicory (Cichorium intybus L.) evaluated in xanthine oxidase-, myeloperoxidase-, and diaphorase-catalyzed reactions*. J. Agric. Food Chem. 56 (16), 7194–7200.
- ³³⁾ Reineccius, G., (1991). *Off-flavors in foods*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 29 (6), 381–402.
- ³⁴⁾ EFSA, 2015. *The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013*. EFSA J. 13 (1), 1–165.

- ³⁵⁾ Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.-A., Roy, S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M., (2011). *Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens*. *Emerg. Infect. Dis.* 17 (1), 7–15.
- ³⁶⁾ Friedman, M., (2014). *Antibacterial, antiviral, and antifungal properties of wines and winery byproducts in relation to their flavonoid content*. *J. Agric. Food Chem.* 62 (26), 6025–6042.
- ³⁷⁾ Katalinic', V., Možina, S.S., Skroza, D., Generalic', I., Abramovic', H., Miloš, M., Ljubenkovic, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpinč, P., Boban, M., (2010). *Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 Vitis vinifera varieties grown in Dalmatia (Croatia)*. *Food Chem.* 119 (2), 715–723.
- ³⁸⁾ Oliveira, D.A., Salvador, A.A., Smânia, Jr., A., Smânia, E.F.A., Maraschin, M., Ferreira, S.R.S., (2013). *Antimicrobial activity and composition profile of grape (Vitis vinifera) pomace extracts obtained by supercritical fluids*. *J. Biotechnol.* 164 (3), 423–432.
- ³⁹⁾ Jiménez Gómez, S., Cartagena Causapé, M.C., Arce Martínez, A., (1993). *Distribution of nutrients in anaerobic digestion of vine shoots*. *Bioresour. Technol.* 45, 93–97.
- ⁴⁰⁾ Mendivil, M.A., Muñoz, P., Morales, M.P., Juárez, M.C., García-Escudero, E., (2013). *Chemical characterization of pruned vine shoots from la Rioja (Spain) for obtaining solid bio-fuels*. *J. Renew. Sust. Energ.* 5, 033113.
- ⁴¹⁾ Mediavilla, I., Fernández, M.J., Esteban, L.S., (2009). *Optimization of pelletisation and combustion in a boiler of 17.5 kWth for vine shoots and industrial cork residue*. *Fuel Process. Technol.* 90, 621–628.
- ⁴²⁾ Dairy, N.Z. (2014). Feed values. <http://www.dairynz.co.nz/feed/supplements/feed-values/>. Consultato il 28/10/2017.

- 43) Spanghero, M., Salem, A.Z.M., Robinson, P.H. (2009). *Chemical composition, including secondary metabolites, and rumen fermentability of seeds and pulp of Californian (USA) and Italian grape pomaces*. *Animal Feed Science and Technology*, 152, 243–255.
- 44) Baumgartel, T., Kluth, H., Epperlein, K., Rodehutsord, M. (2007). *A note on digestibility and energy value for sheep of different grape pomace*. *Small Ruminants Research*, 67, 302–306.
- 45) Alipour, D., Rouzbehan, Y. (2007). *Effects of ensiling grape pomace and addition of polyethylene glycol on in vitro gas production and microbial biomass yield*. *Animal Feed Science and Technology*, 137, 138–149.
- 46) Cornevin, C., (1892). *Des résidus industriels dans l'alimentation du bétail*. Firmin-Didot, Paris
- 47) Winkler, A.; Weber, F.; Ringseis, R.; Eder, K.; Dusel, G., (2015). *Determination of polyphenol and crude nutrient content and nutrient digestibility of dried and ensiled white and red grape pomace cultivars*. *Arch. Anim. Nut.*, 69 (3): 187-200
- 48) Göhl, B., (1982). *Les aliments du bétail sous les tropiques*. FAO, Division de Production et Santé Animale, Roma, Italy
- 49) Zheng Yi ; Lee, C. ; Yu, ChaoWei ; Cheng, YuShen ; Simmons, C. W. ; Zhang RuiHong ; Jenkins, B. M. ; VanderGheynst, J. S., (2012). *Ensilage and bioconversion of grape pomace into fuel ethanol*. *J. Agric. Food Chem.*, 60 (44): 11128–11134
- 50) Larwence, A. ; Hammouda, F. ; Salah, A. ; Abada, S. ; Ouchai, N., (1984). *Valeur alimentaire des marcs de raisin. III. - Rôle des tanins condensés dans la faible valeur nutritive des marcs de raisin chez le mouton: effet d'une addition de polyéthylène glycol 4000*. *Ann. Zootech.*, 33 (4): 533-543

- ⁵¹⁾ Molina-Alcaide, E.; Moumen, A.; Martín-García, A. I., (2008). *By-products from viticulture and the wine industry: Potential as sources of nutrients for ruminants*. J. Sci. Food Agric., 88 (4): 597–604
- ⁵²⁾ Guaadaoui, A., Benaicha, S., Elmajdoub, N., Bellaoui, M., & Hamal, A. (2014). *What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus*. International Journal of Nutrition and Food Sciences, 3(3), 174-179.
- ⁵³⁾ Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Canadian journal of biochemistry and physiology, 37(8), 911-917.
- ⁵⁴⁾ Ovcharova, T., Zlatanov, M., & Dimitrova, R. (2016). *Chemical composition of seeds of four Bulgarian grape varieties*. Ciência e Técnica Vitivinícola, 31(1), 31-40.
- ⁵⁵⁾ Choi, Y., & Lee, J. (2009). *Antioxidant and antiproliferative properties of a tocotrienol-rich fraction from grape seeds*. Food Chemistry, 114(4), 1386-1390.
- ⁵⁶⁾ Morise, A., Sérougne, C., Gripois, D., Blouquit, M. F., Lutton, C., & Hermier, D. (2004). *Effects of dietary alpha linolenic acid on cholesterol metabolism in male and female hamsters of the LPN strain*. The Journal of nutritional biochemistry, 15(1), 51-61.
- ⁵⁷⁾ Rassias, G., Kestin, M., & Nestel, P. J. (1991). *Linoleic acid lowers LDL cholesterol without a proportionate displacement of saturated fatty acid*. European journal of clinical nutrition, 45(6), 315-320.
- ⁵⁸⁾ Rubio, M., Alvarez-Ortí, M., Alvarruiz, A., Fernández, E., & Pardo, J. E. (2009). *Characterization of oil obtained from grape seeds collected during berry development*. Journal of agricultural and food chemistry, 57(7), 2812-2815.
- ⁵⁹⁾ Anastas, P., & Eghbali, N. (2010). *Green chemistry: principles and practice*. Chemical Society Reviews, 39(1), 301-312.

- ⁶⁰⁾ Font, R., Esperanza, M., & García, A. N. (2003). *Toxic by-products from the combustion of Kraft lignin*. *Chemosphere*, 52(6), 1047-1058.
- ⁶¹⁾ Jo, Y. J., Lee, O. K., & Lee, E. Y. (2014). *Dimethyl carbonate-mediated lipid extraction and lipase-catalyzed in situ transesterification for simultaneous preparation of fatty acid methyl esters and glycerol carbonate from Chlorella sp. KR-1 biomass*. *Bioresource technology*, 158, 105-110.
- ⁶²⁾ Latoui, M., Aliakbarian, B., Casazza, A. A., Seffen, M., Converti, A., & Perego, P. (2012). *Extraction of phenolic compounds from Vitex agnus-castus L.* *Food and bioproducts processing*, 90(4), 748-754.
- ⁶³⁾ Bhangar, M. I., Bukhari, S. B., & Memon, S. (2008). *Antioxidative activity of extracts from a Fenugreek seeds (Trigonella foenum-graecum)*. *Pakistan Journal of Analytical & Environmental Chemistry*, 9(2), 6.
- ⁶⁴⁾ Webster, D. E., Lu, J., Chen, S. N., Farnsworth, N. R., & Wang, Z. J. (2006). *Activation of the μ -opiate receptor by Vitex agnus-castus methanol extracts: Implication for its use in PMS*. *Journal of ethnopharmacology*, 106(2), 216-221.
- ⁶⁵⁾ Freemantle, M. (2010). *An introduction to ionic liquids*. Royal Society of chemistry.
- ⁶⁶⁾ Mendes, J. A., Prozil, S. O., Evtuguin, D. V., & Lopes, L. P. C. (2013). *Towards comprehensive utilization of winemaking residues: Characterization of grape skins from red grape pomaces of variety Touriga Nacional*. *Industrial crops and products*, 43, 25-32.
- ⁶⁷⁾ Kuck, L. S., & Noreña, C. P. Z. (2016). *Microencapsulation of grape (Vitis labrusca var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents*. *Food chemistry*, 194, 569-576.

- 68) Pinelo, M., Arnous, A., & Meyer, A. S. (2006). *Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release*. Trends in Food Science & Technology, 17(11), 579-590.
- 69) Mendes, J. A., Xavier, A. M., Evtuguin, D. V., & Lopes, L. P. (2013). *Integrated utilization of grape skins from white grape pomaces*. Industrial crops and products, 49, 286-291.
- 70) Pérez-Serradilla, J. A., & De Castro, M. L. (2011). *Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract*. Food Chemistry, 124(4), 1652-1659.
- 71) Tao, Y., Wu, D., Zhang, Q. A., & Sun, D. W. (2014). *Ultrasound-assisted extraction of phenolics from wine lees: modeling, optimization and stability of extracts during storage*. Ultrasonics sonochemistry, 21(2), 706-715.
- 72) Perez-Bibbins, B., Torrado-Agrasar, A., Salgado, J. M., de Souza Oliveira, R. P., & Dominguez, J. M. (2015). *Potential of lees from wine, beer and cider manufacturing as a source of economic nutrients: An overview*. Waste Management, 40, 72-81.
- 73) Sanchez-Gomez, R., Zalacain, A., Alonso, G. L., & Salinas, M. R. (2014). *Vine-shoot waste aqueous extracts for re-use in agriculture obtained by different extraction techniques: phenolic, volatile, and mineral compounds*. Journal of agricultural and food chemistry, 62(45), 10861-10872.
- 74) Fontana, A. R., Antonioli, A., & Bottini, R. (2013). *Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics*. Journal of agricultural and food chemistry, 61(38), 8987-9003.
- 75) Galanakis, C. M. (Ed.). (2015). *Food Waste Recovery: Processing Technologies and Industrial Techniques*. Academic Press.

- ⁷⁶⁾ Luque-Rodríguez, J. M., Pérez-Juan, P., & Luque de Castro, M. D. (2006). *Extraction of polyphenols from vine shoots of Vitis vinifera by superheated ethanol– water mixtures*. Journal of agricultural and food chemistry, 54(23), 8775-8781.
- ⁷⁷⁾ Sanchez-Gomez, R., Zalacain, A., Alonso, G. L., & Salinas, M. R. (2014). *Vine-shoot waste aqueous extracts for re-use in agriculture obtained by different extraction techniques: phenolic, volatile, and mineral compounds*. Journal of agricultural and food chemistry, 62(45), 10861-10872.
- ⁷⁸⁾ Ji, J. B., Lu, X. H., Cai, M. Q., & Xu, Z. C. (2006). *Improvement of leaching process of Geniposide with ultrasound*. Ultrasonics Sonochemistry, 13(5), 455-462.
- ⁷⁹⁾ Vilkuh, K., Mawson, R., Simons, L., & Bates, D. (2008). *Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—A review*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 9(2), 161-169.
- ⁸⁰⁾ Casazza, A. A., Aliakbarian, B., Mantegna, S., Cravotto, G., & Perego, P. (2010). *Extraction of phenolics from Vitis vinifera wastes using non-conventional techniques*. Journal of Food Engineering, 100(1), 50-55.
- ⁸¹⁾ Novak, I., Janeiro, P., Seruga, M., & Oliveira-Brett, A. M. (2008). *Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection*. Analytica chimica acta, 630(2), 107-115.
- ⁸²⁾ Khan, M. K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Dangles, O., & Chemat, F. (2010). *Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (Citrus sinensis L.) peel*. Food Chemistry, 119(2), 851-858.

- 83) Ghafoor, K., Choi, Y. H., Jeon, J. Y., & Jo, I. H. (2009). *Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (Vitis vinifera) seeds*. Journal of agricultural and food chemistry, 57(11), 4988-4994.
- 84) Ch m At, F., & Cr Avotto, G. A. A. (2013). *Microwave-assisted extraction for bioactive compounds*.
- 85) Letellier, M., & Budzinski, H. (1999). *Microwave assisted extraction of organic compounds*. Analisis, 27(3), 259-270.
- 86) Mandal, V., Mohan, Y., & Hemalatha, S. (2007). *Microwave assisted extraction—an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research*. Pharmacognosy reviews, 1(1), 7-18.
- 87) Wang, L., & Weller, C. L. (2006). *Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants*. Trends in Food Science & Technology, 17(6), 300-312.
- 88) Ghafoor, K., AL-Juhaimi, F. Y., & Choi, Y. H. (2012). *Supercritical fluid extraction of phenolic compounds and antioxidants from grape (Vitis labrusca B.) seeds*. Plant foods for human nutrition, 67(4), 407-414.
- 89) Reid, R. C., & Prausnitz, J. M. (1977). *TK Sherwood The properties of gases and liquids*.
- 90) Savage, P. E., Gopalan, S., Mizan, T. I., Martino, C. J., & Brock, E. E. (1995). *Reactions at supercritical conditions: applications and fundamentals*. AIChE Journal, 41(7), 1723-1778.
- 91) Babovic, N., Djilas, S., Jadranin, M., Vajs, V., Ivanovic, J., Petrovic, S., & Zizovic, I. (2010). *Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs and their antioxidant capacity*. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 11(1), 98-107.

- ⁹²⁾ Sovová, H., Kučera, J., & Jež, J. (1994). *Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO₂—II. Extraction of grape oil.* *Chemical Engineering Science*, 49(3), 415-420.
- ⁹³⁾ Salgin, U. (2007). *Extraction of jojoba seed oil using supercritical CO₂+ ethanol mixture in green and high-tech separation process.* *The Journal of Supercritical Fluids*, 39(3), 330-337.
- ⁹⁴⁾ Allen, V. G., Pond, K. R., Saker, K. E., Fontenot, J. P., Bagley, C. P., Ivy, R. L., ... & Ayad, J. Y. (2001). *Tasco: Influence of a brown seaweed on antioxidants in forages and livestock—A review.* *Journal of Animal Science*, 79(E-Suppl), E21-E31.
- ⁹⁵⁾ Jeong, K. M., Zhao, J., Jin, Y., Heo, S. R., Han, S. Y., Yoo, D. E., & Lee, J. (2015). *Highly efficient extraction of anthocyanins from grape skin using deep eutectic solvents as green and tunable media.* *Archives of pharmacal research*, 38(12), 2143-2152.
- ⁹⁶⁾ Radošević, K., Čurko, N., Srček, V. G., Bubalo, M. C., Tomašević, M., Ganić, K. K., & Redovniković, I. R. (2016). *Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity.* *LWT-Food Science and Technology*, 73, 45-51.
- ⁹⁷⁾ Tommasi, E., Cravotto, G., Galletti, P., Grillo, G., Mazzotti, M., Sacchetti, G., ... & Tagliavini, E. (2017). *Enhanced and Selective Lipid Extraction from the Microalga *P. tricornutum* by Dimethyl Carbonate and Supercritical CO₂ Using Deep Eutectic Solvents and Microwaves as Pretreatment.* *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(9), 8316-8322.
- ⁹⁸⁾ Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2008). *Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review.* *International journal of molecular sciences*, 9(9), 1621-1651.

- ⁹⁹⁾ Lafka, T. I., Sinanoglou, V., & Lazos, E. S. (2007). *On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes*. Food Chemistry, 104(3), 1206-1214.
- ¹⁰⁰⁾ Zhao, H. X., Zhang, H. S., & Yang, S. F. (2014). *Phenolic compounds and its antioxidant activities in ethanolic extracts from seven cultivars of Chinese jujube*. Food Science and Human Wellness, 3(3), 183-190.
- ¹⁰¹⁾ Charis M. Galanakis. (2017). *Membrane Technologies for the Separation of compounds Recovered From Grape Processing By-Products*. Handbook of grape processing by-products. 137-154.
- ¹⁰²⁾ ECHA. European Chemicals Agency. 2017. <https://echa.europa.eu/it/registration-dossier/-/registered-dossier/5360/6/2/4> consultato il 16/11/2017
- ¹⁰³⁾ ECHA. European Chemicals Agency. 2017. <https://echa.europa.eu/it/registration-dossier/-/registered-dossier/16152/6/2/4> consultato il 16/11/2017
- ¹⁰⁴⁾ Radošević, K., Bubalo, M. C., Srček, V. G., Grgas, D., Dragičević, T. L., & Redovniković, I. R. (2015). *Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents*. Ecotoxicology and environmental safety, 112, 46-53.
- ¹⁰⁵⁾ Juneidi, I., Hayyan, M., & Hashim, M. A. (2015). *Evaluation of toxicity and biodegradability for cholinium-based deep eutectic solvents*. RSC Advances, 5(102), 83636-83647.
- ¹⁰⁶⁾ Wang, Y., & Xie, W. (2010). *Synthesis of cationic starch with a high degree of substitution in an ionic liquid*. Carbohydrate Polymers, 80(4), 1172-1177.
- ¹⁰⁷⁾ Pal, S., Mal, D., & Singh, R. P. (2005). *Cationic starch: an effective flocculating agent*. Carbohydrate Polymers, 59(4), 417-423.

- ¹⁰⁸⁾ Ventura, S. P., e Silva, F. A., Gonçalves, A. M., Pereira, J. L., Gonçalves, F., & Coutinho, J. A. (2014). *Ecotoxicity analysis of cholinium-based ionic liquids to Vibrio fischeri marine bacteria*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 102, 48-54.
- ¹⁰⁹⁾ Álvarez, A., Poejo, J., Matias, A. A., Duarte, C. M., Cocero, M. J., & Mato, R. B. (2017). *Microwave pretreatment to improve extraction efficiency and polyphenol extract richness from grape pomace. Effect on antioxidant bioactivity*. *Food and Bioproducts Processing*, 106, 162-170.
- ¹¹⁰⁾ Caldas, T. W., Mazza, K. E., Teles, A. S., Mattos, G. N., Brígida, A. I. S., Conte-Junior, C. A., ... & Tonon, R. V. (2018). *Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods*. *Industrial Crops and Products*, 111, 86-91.
- ¹¹¹⁾ Da Porto, C., & Natolino, A. (2017). *Supercritical fluid extraction of polyphenols from grape seed (Vitis vinifera): Study on process variables and kinetics*. *The Journal of Supercritical Fluids*.
- ¹¹²⁾ Babazadeh, A., Taghvimi, A., Hamishehkar, H., & Tabibiazar, M. (2017). *Development of new ultrasonic–solvent assisted method for determination of trans-resveratrol from red grapes: Optimization, characterization, and antioxidant activity (ORAC assay)*. *Food Bioscience*.
- ¹¹³⁾ Durand, E., Lecomte, J., Upasani, R., Chabi, B., Bayrasy, C., Baréa, B., ... & Wrutniak-Cabello, C. (2017). *Evaluation of the ROS inhibiting activity and mitochondrial targeting of phenolic compounds in fibroblast cells model system and enhancement of efficiency by natural deep eutectic solvent (NADES) formulation*. *Pharmaceutical research*, 34(5), 1134-1146.

- ¹¹⁴⁾ OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Test No. 202, *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test, 2004.
- ¹¹⁵⁾ OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Test No. 211, *Daphnia magna* Reproduction Test, 2008.
- ¹¹⁶⁾ ISO (International Organization for Standardization) (2012) *Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) Acute toxicity test. 4th edition. Ref. ISO 6341:2012(E)*. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland
- ¹¹⁷⁾ United Nations 2013. *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)*. Fifth edition. United Nations, New York and Geneva.
- ¹¹⁸⁾ Peters, R. H., & De, B. (1987). *Daphnia. Memorie dell'Ist. ital. di idrobiologia dott. Marco de Marchi*.
- ¹¹⁹⁾ OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Test No. 301, Ready Biodegradability, 1992