ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGROALIMENTARI

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

Uso di NaDES per l'estrazione di composti fenolici dalle bucce di avocado Hass: influenza della luce sulla stabilità e potenziali applicazioni come arricchimento antiossidante e protezione anti-imbrunimento dell'avocado di IV gamma

Tesi di laurea magistrale in 69166 - Analisi Fisiche e Reologiche Degli Alimenti

Relatore

Prof. Pietro Rocculi

Correlatore

Dott. Giulio Giannini

Dott. Junior Bernardo Molina Hernandez

Presentata da

Matteo Silvestrelli

Sessione marzo 2026

Anno Accademico 2024/2025

Indice

1. L' avocado (*Persea americana*)…….. 2
1.1 Origine, Storia e inquadramento botanico …….. 2
1.2 Composizione chimica e aspetti nutrizionali ……..... 4
1.2.1 Composti fenolici dell'avocado e benefici per la salute…….. 5
1.3 Importanza commerciale…….. 8
1.3.1 Mercato……. 8
1.3.2 Destinazione d'uso, trasformazione…….. 9
1.4 IV gamma……..... 12
1.4.1 L'imbrunimento enzimatico …….. 13
1.4.2 Avocado: Criticità della IV gamma …… 15
1.5 Scarti della lavorazione dell'avocado: Problemi e Opportunità…….. 17
2. Estrazione di composti bioattivi da scarti d'avocado ……..…… 22
2.1 Composti fenolici: …… 22
2.2 Estrazione Solido-Liquido…… 23
2.3 Tecnologia di estrazione assistita …… 24
2.4 Estrazione assistita da ultrasuoni……..... 25
2.5 Solventi verdi e chimica sostenibile …… 29
2.6 Natural Deep Eutectic Solvents (NaDES) …….. 30
2.7 Stabilità dei composti fenolici in sistemi NaDES……. 34
3. Scopo della tesi …… 37
4. Materiali e Metodi…… 38
4.1.1 Farina di bucce avocado…….. 38
4.1.2 Avocado…… 38
4.2 Preparazione dell'estratto fenolico…….. 38
4.2.1 Solventi utilizzati……..... 38
4.2.2 Estrazione assistita da ultrasuoni……. 38
4.3 Applicazione estratto su avocado IV gamma…….. 39
4.3.1 Preparazione dei campioni…… 39
4.4 Determinazioni analitiche……. 40
4.4.1 Colore …….. 40
4.4.2 Attività dell'acqua…….. 40
4.4.3 pH…….. 40
4.4.4 Analisi dimensione delle particelle…….. 40
4.4.5 Analisi dell'immagine…….. 41
4.4.6 Contenuto di fenoli totali (TPC)…….. 41
5 Risultati e discussioni…….. 43
5.1 Stabilità dell'estratto …… 43
5.2 Applicazione su avocado di IV gamma……..... 46
6 Conclusioni……..... 55
Bibliografia……..... 57

CAPITOLO 1

L' avocado (*Persea americana*)

1.1 Origine, Storia e inquadramento botanico

L ' avocado (Persea americana Mill) è una pianta tropicale originaria del Messico e dell'America centrale. Con molta probabilità la sua domesticazione è avvenuta tra il 7000 e 5000 a.C. nella zona mesoamericana dove vi sono state ritrovate tracce del suo consumo 10.000 anni fa a Coaxcatlan (Nyakang'i et al., 2023; Forestiero, 2003)

Gli Inca introdussero il frutto in Sud America nel XVI secolo, divenendo alimento fondamentale per le popolazioni mesoamericane (Huang et al., 2023).

Il nome comune "Avocado" deriva dalla parola spagnola "aguacate", parola composta delle parole azteche "Ahuacatl" e "ahoacaquahuitl" e significa testicolo per la sua forma che richiama una parte dell'anatomia umana (Ayaia et al., 2014).

L'avocado è sconosciuto dagli europei prima della scoperta dell'America, fu in seguito molto apprezzato dagli spagnoli che lo documentarono in molti testi. La prima testimonianza storica risale al 1518 nella "*Suma De Geographia Que Trata*" di Martin Fernàndez de Enciso (Ayaia et al., 2014).

Dalla zona d'origine, la pianta è stata introdotta in Indonesia nel 1750, in Brasile nel 1809 e nel Levante nel 1908 e infine in Australia alla fine del XIX secolo (Ayaia et al., 2014).

Dal punto di vista tassonomico (Pedreschi et al., 2019), l'avocado appartiene all'ordine delle *Rhanale*s, genere *Persea*, e alla famiglia delle *Lauraceae* come all'incirca altre 2.500-3.000 specie (Figura 1).

Esistono tre razze orticole ben note (Pedreschi et al., 2019) che si sviluppano ad altitudini diverse come la razza messicana *(P. americana var. drymifolia*) che si adattata agli altopiani tropicali o la razza guatemalteca (*P. americana var. guatemalensis*), presente nelle medie altitudini dei tropici oppure la razza delle Indie Occidentali (*P. americana*), che prende il nome dal luogo dove viene coltivata, dove la varietà *Persea americana* CV, Hass rappresenta la varietà maggiormente impiegata al mondo (95%). (Pedreschi et al., 2019).

Il frutto dell'avocado è classificato botanicamente come una bacca composta dal seme e dal pericarpo. Il pericarpo è composto dall' esterno verso l 'interno dall'esocarpo o buccia poi dal mesocarpo o polpa e dall'endocarpo (Figura 2) (Seymour et al., 1993).

Figura 1 pianta avocado

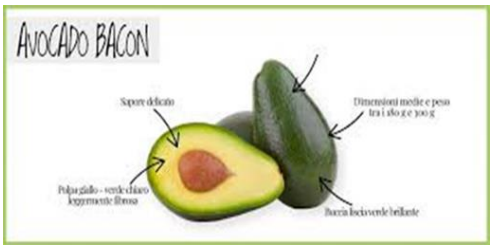


Figure 2 pianta e frutti avocado

Sono stati indentificati oltre 500 varietà di avocado, tra cui le più coltivate sono: Hass, Lamb Hass, Shepard, Reed Wurtz, Fuerte, Sharwil, Zutano, Ettinger e Edrano. A seconda delle varietà i frutti differiscono per forma e dimensione, ma anche dal sapore e dal colore della buccia che cambia durante il periodo di maturazione del frutto (Figura 3) (Nyakang'i et al., 2023).

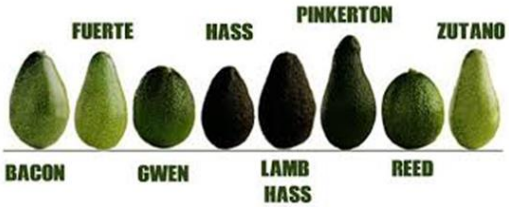


Figura 3 Varietà avocado

1.2 Composizione chimica e aspetti nutrizionali

Il frutto del avocado dal punto di vista nutrizionale ha un contenuto di (Takenaga et al., 2008):

- umidità (67% - 78%)
- lipidico (12% - 24%)
- carboidrati (0,8% - 4,8%)
- fibre (1,4% - 3,1%)
- energetico (140 -228 kcal).

Il contenuto lipidico nel mesocarpo dell'avocado varia in base alle varietà. Infatti si è riscontrato che la varietà Bancon ha un contenuto di lipidi totali all'incirca dell 22 % ed è molto maggiore rispetto alle concentrazioni delle varietà Fuerta (18,7%) e Hass (18,1%) (Fumio Takenagaÿ et al., 2008).

La componente lipidica del frutto dell'avocado è caratterizzata dalla presenza di acidi grassi monoinsaturi, tra cui l'acido oleico che è l'acido grasso predominante nell'avocado fresco (59% del totale) e di acidi grassi polinsaturi, tra cui l'acido linoleico (11%). Esso contiene anche acidi grassi saturi (acido palmitico 16% e stearico). Piccole tracce di acido linoleico, di acido eicosapentaenoico e di acido miristico sono presenti nell'olio di avocado, questi sono importanti per l'apporto nella dieta, come le vitamine beta-carotene, retinolo, vitamina E, acido ascorbico, riboflavina, tiamina, acido folico, niacina e piridossina (Nyakang'i et al., 2023).

Il frutto dell'avocato presenta una significativa frazione polare rappresentata principalmente dai fitosteroli in particolare beta-sitosterolo, cicloartenolo e campesterolo. Il beta-sitosterolo è quello maggiormente presente. I fitosteroli sono molecole nutrizionalmente rilevanti in quanto abbassano riduce il colesterolo LDL e aumentare il colesterolo HDL.

Esso contiene pochi carboidrati in quanto durante la maturazione del frutto il loro quantitativo diminuisce a causa dell'aumento della componente grassa del frutto. Nella polpa il contenuto dei carboidrati è formato soprattutto da fibra insolubile per il 70% e da fibra solubile per il 30%, come cellulosa, emicellulosa e pectina. Il principale carboidrato nell'avocado è il D-mannoeptulosio che è uno zucchero tipico di questo frutto insieme al perseitolo: la loro concentrazione dipende dal grado di maturazione e dalla stagione. Infatti, la stagionalità e i tassi di maturazione comportano una concentrazione di mannoeptulosio diversa: i frutti acerbi a fine stagione hanno una concentrazione di mannoeptulosio minore rispetto ai frutti acerbi a inizio stagione (Nikki A. Ford et al2023).

L’avocado contiene magnesio, fosforo, calcio, potassio e sodio, oltre ad altri minerali come zinco e ferro, in quantità inferiori a 1 mg per grammo nel frutto fresco fresco, mentre si riscontrano elevati contenuti di potassio e bassissimi contenuti di sodio rendendo l’avocado consigliato nelle diete povere di sodio e per la prevenzione delle malattie cardiovascolari. Per quanto riguarda l’apporto vitaminico l’avocado fornisce beta-carotene, retinolo, vitamina E, acido ascorbico, riboflavina, tiamina, acido folico, niacina, piridossina e vitamina K (Nyakang'i et al., 2023).

La presenza di folato nell’avocado può abbassare il rischio di cancro alla prostata e al colon. inoltre esso può prevenire il rischio di osteoporosi e ridurre l’artrosi, mentre, nelle giuste dosi, è importante per le donne in gravidanza per prevenire la spina bifida. La presenza nel frutto della vitamina K aiuta nella coagulazione del sangue e a ridurre il rischio malattie cardiovascolari e la salute delle ossa.

L’avocado è un alimento la cui composizione chimica può variare in base a vari fattori come la varietà, la stagionalità e l’ambiente di crescita. È consigliato nella dieta umana in quanto è un frutto povero di carboidrati ma ricco di fibre e di acidi grassi insaturi che hanno un effetto che hanno benefico alla salute umana (Nikki A. Ford et al., 2023).

1.2.1 Composti fenolici dell’avocado e benefici per la salute

La componente fenolica dell'avocado è distribuita tra polpa, semi e buccia. Il 78% dei composti fenolici è tra semi e buccia, ma solo quest'ultima contiene la maggior parte (348 composti rilevati) e ha maggiore attività antiossidante (Rosero et al., 2019). I composti fenolici, grazie alla loro attività antiossidante naturale, hanno un ruolo importante nella stabilità ossidativa degli alimenti agendo tramite meccanismi:

- Donazione di idrogeno ai radicali perossilici e stabilizzazione dei radicali fenossilico;
- Chelazione dei metalli;
- Scavenging dell’ossigeno singoletto.

L'avocado contiene notevoli quantità di sostanze fitochimiche, in particolare acidi fenolici e flavonoidi. Il contenuto fenolico è influenzato dall’esposizione, dalla zona geografica di provenienza della pianta, dal clima, ma anche dalla varietà e maturità del frutto (Rosero et al., 2019).

Un totale di 134 composti, tra cui 36 acidi fenolici, 70 flavonoidi, 11 Lignani, 2 stilbeni e altri 15 polifenoli, sono stati estratti principalmente da bucce e semi, tramite LC-ESI-QTOF-MS/MS (Lyu et al.,2023)

La quantità di fenoli nel frutto è tra i 60 mg e 140 mg, per 30 grammi di prodotto (Fan et al., 2022).

Tra i flavonoidi ritrovati nell'avocado Hass troviamo catechina, epicatechina, quercetina e kaempferolo. Il gallato di epicatechina è stato quantificato solo negli avocado Wurtz e Reed (Figura 4) (Figura 4) (Fan et al., 2022).

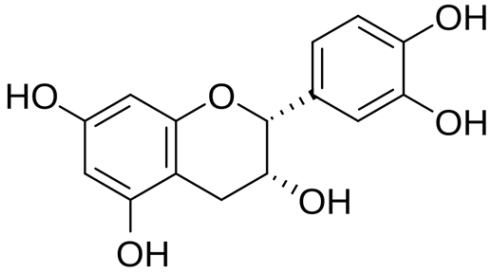


Figura 4 epicatechina

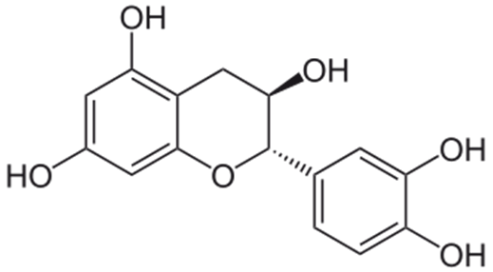


Figura 5 catechina

Le foglie, la buccia e i semi di avocado contengono la maggior parte dei polifenoli, mentre nella polpa sono stati trovati esclusivamente carotenoidi, steroli e tocoferoli (Lyu et al., 2023).

Nel frutto dell'avocado sono rintracciabili cinque acidi fenolici ovvero acido gallico, acido protocatechico, acido p -idrossibenzoico, acido clorogenico (predominante nell'avocado) e acido caffeico e cinque flavonoidi, ovvero catechina, epicatechina, gallato di epicatechina, quercetina e kaempferolo. Nella polpa di avocado Hass, non è stato rintracciato l'acido p –idrossibenzoico, mentre l'acido gallico, l'acido clorogenico e l'acido caffeico erano significativamente più alti rispetto alle varietà Wurtz e Reed (Figura 6) (Figura 7) (Fan et al., 2022).

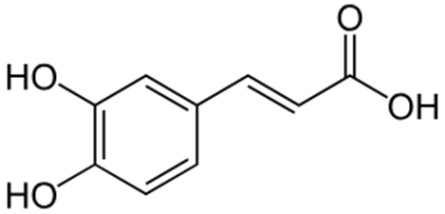


Figura 6 acido caffeico

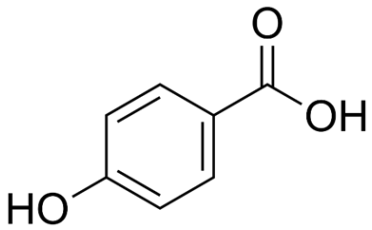


Figura 7 acido para idrossibenzoico

La polpa di avocado è ricca di acidi idrossibenzoici, idrossicinnamici e procianidine; mentre nei semi, la principale capacità antiradicalica, è stata attribuita alla presenza di (+) -catechina, (−) -epicatechina e acido 3- O –caffeoilchinico. Tra gli altri composti flavonoidi sono stati rintracciati procianidine e acidi idrossicinnamici (Fan et al., 2022).

La stima dei composti fenolici dell'avocado nella polpa, nella buccia e nel seme può essere ottenuta mediante diversi metodi analitici che sono il contenuto di fenoli totali (TPC), il contenuto di flavonoidi totali (TFC) e il contenuto di tannini totali (TTC) (Fan S et al., 2022).

La buccia matura di Hass ha registrato i valori più elevati di TPC (77,85 mg GAE/g), di TTC (148,98 mg CE/g) e di DPPH (71,03 mg AAE/g) rispetto alle varietà Wurtz e Reed (Fan et al., 2022).

I flavonoidi esistono nelle piante come derivati glicosilati.

ll consumo di alimenti ricchi di tannini, può ridurre l'incidenza del cancro grazie alle proprietà antiossidanti. Nella buccia matura di Hass, secondo lo studio di Rosero, J. C., (2019), è più elevato il contenuto di tannini (148,98 mg CE/g), seppur essi siano presenti anche nei semi e nelle bucce.

Nella buccia di avocado Hass acerbi è stata osservata una concentrazione più elevata di TFC (3,44 mg di QE/g). Gli intervalli di TFC in seme, buccia e polpa erano rispettivamente 0,06-2,75 mg, 0,38-3,44 mg e 0,01-0,09 mg di QE/g (Rosero et al., 2019).

Per concludere. studi precedenti hanno dimostrato che l'avocado è una ricca fonte di composti polifenolici considerati benefici per la salute umana. Infatti, ci sono prove che dimostrano che questi polifenoli presentano attività antibatteriche, antiallergeniche, antiossidanti, antinfiammatorie, antiossidanti, antinfiammatorie, chemioprotettive contro il cancro e migliorano anche il metabolismo lipidico. Inoltre, diverse ricerche suggeriscono che i fenoli riducono il rischio di malattie cardiovascolari riducendo lo stress ossidativo e infiammatorio, migliorando così il flusso sanguigno (Dreher et al., 2013).

1.3 Importanza commerciale

1.3.1 Mercato

L'avocado è coltivato nelle zone tropicali e sub tropicali. Il 71,9% della produzione proviene dalle Americhe in particolare dal Messico per il 28%, in particolare dalla zona Michoacán che grazie ai sui terreni e clima ha l'80% della produzione nazionale, seguito dalla Colombia e dal Perù come secondo e terzo produttore di avocado al mondo (Pedreschi, R., 2019) (Nyakang'i, CO., 2023).

Da una ricerca svolta da Huang et al. (2023), il consumo di avocado nel continente americano ha rappresentato quasi i due terzi del consumo mondiale, mentre il resto del mondo (Europa, Asia-Oceania e Africa) ha rappresentato il restante 36%. Quasi un 1/3 degli avocado prodotti al mondo vengono consumati dal mercato nordamericano, dove gli USA sono i principali consumatori seguiti dal Messico dove è alto il consumo pro capite, essendo un alimento tipico della loro cultura, seguito poi dal Canada. L'altro terzo viene consumato da Colombia (30%), Brasile (10%), Perù (9%), Venezuela (5%) e Cile (4%).

Le tendenze del consumo di avocado in particolare nei paesi del Nord America sono cresciute costantemente nell'ultimo decennio, e si prevede che il consumo aumenterà in futuro in quanto il consumatore ritiene che sia un frutto sano e benefico per la salute (Huang et al., 2023).

L'Europa, dove negli ultimi anni vi è una ricerca di stile di vita più salutare basata su una dieta rivolta ad una alimentazione a base vegetale, è divenuta un mercato emergente per gli avocado, e l'assenza di una produzione locale nella maggior parte dei paesi europei comporta la necessità di aumentare le importazioni per soddisfare la domanda. Il consumo è quasi triplicato nell'ultimo decennio pari al 10% del consumo mondiale, determinando un incremento nelle importazioni.

I cinque principali mercati di consumo di avocado in Europa sono: Francia, Spagna, Germania, Regno Unito e Russia (FAO, 2022). Questi cinque paesi insieme rappresentavano oltre il 60% del consumo europeo di avocado nel 2020 (Huang et al., 2023). I Paesi Bassi restano il principale centro di riesportazione e distribuzione dell'avocado. (FAO–OCSE, 2026)

In Africa, il consumo totale di avocado è aumentato del 72% in dieci anni. Questa crescita è più moderata rispetto ad altri mercati. Nel 2020, i principali paesi africani consumatori di avocado sono stati Kenya ed Etiopia, ciascuno dei quali rappresentava il 27% del consumo totale africano, seguiti da Malawi (10%), Repubblica Democratica del Congo (7%) e Sudafrica (6%). La crescita demografica nei paesi africani, non ha comportato un aumento del consumo pro capite dell'avocado, infatti in Kenya e nella Repubblica Democratica del Congo, questo è diminuito rispettivamente del 6% e del 33% dal 2010 al 2020 (FAO, 2022).

L'Asia e Oceania hanno consumato nel 2020, il 15% del consumo mondiale di avocado. Come il resto del mondo, il consumo di avocado in Asia-Oceania è aumentato rapidamente, raddoppiando dal 2010 al 2020, e continua a crescere. In Cina, il consumo è aumentato del 40%. Il principale mercato di consumo di avocado in Asia e Oceania è l'Indonesia. Nel 2020, l'Indonesia da sola rappresentava circa la metà del consumo dell'Asia Oceania, Cina (12%), Israele (9%), Australia (8%) e Giappone (8%) (FAO, 202) (Huang et al., 2023).

Con la crescente popolarità della cucina occidentale e la consapevolezza di diete e stili di vita sani tra i consumatori asiatici, il consumo di avocado dovrebbe continuare ad aumentare costantemente negli anni a venire. (Huang et al., 2023).

Secondo le proiezioni FAO-OCSE aggiornate al 2026, la filiera globale dell'avocado sta vivendo una fase di espansione massiccia con previsioni che lo indicano come il frutto tropicale più venduto al mondo entro il 2030.

1.3.2 Destinazione d'uso, trasformazione

L'avocado Hass è la principale varietà destinata all'esportazione, mentre il Fuerte è preferito per la trasformazione (Figura 8) (Nyakang'i et al., 2023).

Figura 8 Stadi di maturazione avocado Hass

L'avocado viene consumato soprattutto come prodotto fresco (Figure 9), ma viene anche lavorato con l'ottenimento di diversi prodotti commerciali tra cui: olio di avocado, prodotti surgelati, IV gamma, gelato, marmellate, succhi di frutta, maionese, chutney, salse, creme spalmabili e guacamole (Figura 10) (Figura 11). Importante è l'utilizzo nel settore della cosmetica e come ingrediente funzionale per gli alimenti (Nyakang'i et al., 2023) (Vergas-Garcia et al., 2020).

Figure 9 Esempi di piatti con utilizzo di frutto fresco avocado

Figura 10 Olio di Avocado

Figura 11 prodotto avocado IV gamma

Tra i prodotti trasformati più consumati troviamo il guacamole. La polpa del frutto, dopo aver subito un processo di omogeneizzazione, viene mescolata con altri elementi (cipolla, aglio, pomodoro e sale) per ottenere infine la salsa guacamole, venduta come alimento ready-to-eat (Figure 12) (Vergas-Garcia et al., 2020).

Figura 12 Guacamole fresco e confezionato

L'olio di avocado si ottiene dalla polpa del frutto ed è un prodotto relativamente nuovo nel panorama culinario. Gli usi principali dell'olio di avocado sono nell'industria cosmetica, grazie alla sua stabilità e all'elevato contenuto di vitamina E (α-tocoferolo) in una varietà di combinazioni: lozioni naturali per la cura della pelle in particolare per la pelle secca, invecchiata per la dermatite e danneggiata dal sole, trattamenti per capelli, creme da massaggio, oli muscolari, saponi e shampoo (Bhore et al., 2021).

L'estrazione dell'olio di avocado avviene generalmente ad alta temperatura con solvente, generalmente seguita da fasi di raffinazione. Al contrario è possibile ottenere un olio di alta qualità tramite spremitura a freddo utilizzando solitamente frutti maturi e di ottima qualità (Woolf et al., 2009).

L'olio di avocado, così come l'olio di oliva, è classificato in base al metodo di estrazione e alla qualità del frutto (Figura 13) (Flores et al., 2019):

- "Extra Vergine": ottenuto da frutti di alta qualità, estratto solo con metodi meccanici, utilizzando una temperatura inferiore a 50 °C e senza l'uso di solventi chimici.
- "Vergine": prodotto con frutti di qualità inferiore (con piccole aree di marciume e alterazioni fisiche), estratti con metodi meccanici, utilizzando una temperatura inferiore a 50°C e senza l'uso di solventi chimici
- "Puro": prodotto senza considerare la qualità della materia prima; è un olio che subisce un processo di raffinazione come sbiancamento, deodorazione e può essere addizionato con aromi
- "Misto" olio combinato con oli di oliva e oli di altre fonti vegetali.

Figura 13 olio di avocado

Inoltre, nella tradizione popolare frutti e altre parti dell'albero di avocado sono stati utilizzati come medicina erboristica per lungo tempo, in particolare nelle località dove cresce selvatico (Bhore et al., 2021); l'infuso di avocado, ricavato dalle sue foglie, oltre i semi di avocado ritenuti antibatterici e antimicotici, sono stati tradizionalmente utilizzati per trattare diarrea, gonfiore, disturbi legati alla produzione di gas, per purificare il fegato e abbassare la pressione sanguigna. Gli estratti di foglie di avocado per inibire i virus dell'herpes.

In Messico le tisane di foglie di avocado sono state utilizzate per secoli per trattare i disturbi mestruali e come contraccettivo, in quanto si ritiene che accelerino le mestruazioni e possono portare all'aborto (Bhore et al., 2021).

1.4 IV Gamma

I prodotti alimentari appartenenti alla categoria della IV gamma sono prodotti che subiscono una blanda lavorazione prima di essere confezionati in buste o vaschette di plastica con diversa permeabilità, conservandole a basse temperature fino alla loro vendita (Figura 14) (Colelli et al., 2020).

Questi prodotti mantengono molte caratteristiche in comune con i prodotti freschi (I gamma) ma, rispetto a questi ultimi, i prodotti di IV gamma sono già lavati e pronti al consumo, dando un valore di servizio aggiunto al consumatore che si trova a ridurre gli scarti rispetto al prodotto fresco. Inoltre essi sono molto apprezzati perché si adattano perfettamente agli stili di vita frenetici e alla richiesta di un pasto già pronto e da consumare ovunque (Colelli et al., 2020).

I prodotti di IV gamma più diffusi e conosciuti sono le insalate in busta e le carote, ma sul mercato sono presenti anche ortaggi, tuberi e frutta (Colelli et al., 2020).

Figura 14 Prodotti IV gamma

Le fasi di preparazione dei prodotti di IV gamma sono la cernita, la mondatura, il lavaggio il taglio dei prodotti freschi, l'asciugatura, la pesatura con infine il l confezionamento per la commercializzazione che deve avvenire nel tempo più breve possibile. (Colelli et al., 2020).

Con l'eseguimento di una minima lavorazione sui prodotti freschi, si innescano, dal punto di vista fisiologico, dei processi degradativi che possono essere ad esempio un'alterazione cromatica dei frutti e verdure, con conseguente decadimento qualitativo che influenza nell'acquisto il consumatore (Colelli et al., 2020).

1.4.1 L'imbrunimento enzimatico

L'imbrunimento enzimatico, si manifesta nella zona di taglio, dove viene rotta la compartimentalizzazione cellulare e gli enzimi, responsabili dell'imbrunimento, vanno a contatto con O2 e i substrati specifici, causando un danno estetico e una perdita di commercialità del prodotto. (Colelli et al., 2020). Il polifenolo ossidasi (PPO) e la perossidasi (POD) sono i principali enzimi responsabili dell'imbrunimento. Il PPO (EC1.10.3.1) è un enzima contenente con quattro atomi di rame come gruppo prostetico, appartenente alla famiglia delle ossidoreduttasi, classificate in EC1.14.18.1 (monofenolo monoossigenasi, cresolasi o tirosinasi) ed EC1.10.3.1 (difenolo ossidasi, catecol ossidasi o o-difenolo ossigeno ossidoreduttasi) dalla Enzyme Commission (EC) in base alla specificità del substrato. In generale, PPO si riferisce a un enzima appartenente a EC1.10.3.1, che catalizza l'ossidazione del gruppo OH funzionale legato all'atomo di carbonio dell'anello benzenico dei monoidrossifenoli (fenolo, tirosina, p -cresolo) a o-diidrossifenoli (catecolo, dopamina, adrenalina) e la deidrogenazione degli o-diidrossifenoli a o- chinoni. L'ossidazione dei composti fenolici a chinoni e la produzione di melanina danno origine a una colorazione scura negli alimenti.

Esso è presente nei tessuti di piante e animali, in particolare di frutta (mela, pesca, pera, banana, albicocca, bacche, mango, avocado e uva) e verdura (patata, lattuga, bardana, guava, melone, melanzana e funghi). Poiché l'attività della PPO è fondamentale per il controllo dell'imbrunimento enzimatico, i fattori che influenzano la loro attività, tra cui il tipo e la quantità di composti fenolici endogeni, la presenza di ossigeno e il pH, vengono presi di mira per prevenire l'imbrunimento enzimatico (Moon et al., 2020).

L'approccio per la prevenzione dell'imbrunimento enzimatico della frutta e verdura, inibendo l'attività della PPO si divide in metodi fisici e chimici (Moon et al., 2020):

- esclusione dell'ossigeno
- aggiunta di sostanze chimiche
- aggiustamento del pH refrigerazione
- trattamento termico che è uno dei più efficaci, tuttavia con delle controindicazioni su alcuni prodotti.

I metodi chimici per inibire l'attività del PPO includono l'acidificazione o la riduzione utilizzando antiossidanti, agenti chelanti o estratti naturali. Il PPO ha un'attività ottimale a pH 5–7, mostra inibizione al di sotto del pH 3,0. Agenti acidificanti, come acido citrico, acido ascorbico e glutatione possono inattivare il PPO abbassando il pH. L'agente riducente, solfato, e i suoi derivati, agiscono come inibitori irreversibili del PPO. Agenti antiossidanti tra cui acido ascorbico, l-cisteina e 4-silresorcinolo, sono in grado di prevenire la formazione di melanina legandosi agli intermedi. Agenti chelanti del rame, come acido citrico e ossalico, sono in grado di sopprimere l'attività del PPO legandosi ai cofattori metallici nella struttura enzimatica del PPO (Moon et al, 2020).

Gli acidi organici come malico, fosforico, tartarico, citrico e ascorbico possono agire come inibitori dell'attività della PPO a causa di un abbassamento del pH e della chelazione del rame nel gruppo prostetico della PPO. L'acido sorbico, seppur inibisce l'attività della PPO, tuttavia il suo utilizzo come agente antimicrobico comporta un'elevata concentrazione di ossigeno nell'ambiente, che favorisce l'azione enzimatica. Generalmente, l'effetto inibitorio dell'acido ascorbico è dovuto anche alla riduzione degli o-chinoni, generati dall'azione della PPO, al substrato fenolico. Grazie alla sua elevata capacità di chelare i metalli, l'acido etilendiamminotetracetico (EDTA) può essere utilizzato per prevenire l'imbrunimento enzimatico. Atmosfere con basso O_2 e alto CO_2, che non superano la soglia di tolleranza fisiologica del frutto, rallentano l'imbrunimento enzimatico a causa del ritardo della decompartimentalizzazione cellulare che impedisce l'interazione tra composti fenolici e PPO (Soliva et al., 2000).

I metodi fisici possono interrompere l'attività della PPO e queste tecnologie includono la pastorizzazione, il trattamento ad alta pressione idrostatica (HHP), la liofilizzazione, la radiazione,

l'applicazione di onde elettromagnetiche o meccaniche (Jimenez et al., 2025).
Il Trattamento termico (metodo fisico) sull'avocado induce sia perdite di vitamine, quindi di composti termolabili, che lo sviluppo di odori sgradevoli, alterazioni del colore, perdita di consistenza nonché cambiamenti non desiderabili nel sapore della polpa di avocado (Soliva et al., 2000).
Il trattamento termico, come lo sbiancamento, viene raramente utilizzato per la frutta congelata consumata senza cottura., in quanto inibisce l'attività enzimatica de-naturizzandola.
Quando lo sbiancamento non può essere utilizzato, la reazione di imbrunimento può essere soppressa eliminando l'ossigeno. La sostituzione dell'aria con un gas inerte (N_2 e CO_2), l'uso di pellicole di imballaggio impermeabili all'ossigeno o di rivestimenti commestibili, o l'immersione degli alimenti in una soluzione di zucchero o sale di una certa concentrazione possono essere utilizzati per evitare il contatto con l'ossigeno (Moon et al., 2020).
Altre tecniche potenziali per sopprimere l'imbrunimento enzimatico (Moon et al., 2020) sono l'abbassamento della temperatura mediante preraffreddamento, refrigerazione e congelamento e l'uso di raggi ultravioletti C e raggi gamma.

1.4.2 Avocado: Criticità della IV gamma

L'avocado rientra tra i prodotti di IV gamma e nelle fasi della sua lavorazione, devono essere affrontate le criticità, che possono portare a una perdita del valore qualitativo del prodotto.
Le alterazioni fisiologiche che possono interessare questi prodotti dipendono da fattori (Colelli et al., 2020):

- pre-raccolta: la cultivar, la maturazione, le pratiche agronomiche
- post- raccolta: la temperatura di conservazione, trattamenti.

Le lavorazioni meccaniche comportano una perdita di integrità della parete e della membrana della materia prima e una perossidazione dei lipidi della membrana con perdita della sua funzionalità. Con i danni meccanici si ha una perdita di acqua con aumento della produzione di etilene e respirazione cellulare; queste ferite e perdita di liquido favorisce la penetrazione di microorganismi (Colelli et al., 2020).
Durante la filiera di lavorazione questi prodotti hanno, per una loro diminuzione della biosintesi o aumento della loro degradazione, una diminuzione di composti nutrizionali e nutraceutici come carotenoidi, acido ascorbico e fenoli (Colelli et al., 2020).
La flora microbica di questi prodotti non differisce molto da quella dei prodotti freschi, possiamo trovare lieviti, batteri lattici e batteri Gram negativi della famiglia delle pseudomonadacee che sono responsabili di fermentazioni indesiderate e fenomeni degradativi. Un aumento della carica microbica comporta un aumento del fenomeno degradativo e sviluppo di cattivi odori e questi vengono

incrementati da operazioni come il taglio o incompleta asciugatura. Per abbattere la carica microbica si usano sanificanti e più lavaggi (Colelli et al., 2020).

A causa della sua composizione, la polpa di avocado ha una conservabilità molto breve ed è soggetta all'imbrunimento enzimatico (Figura 15) (Jimenez et al., 2025), causando significative perdite economiche e sprechi alimentari.

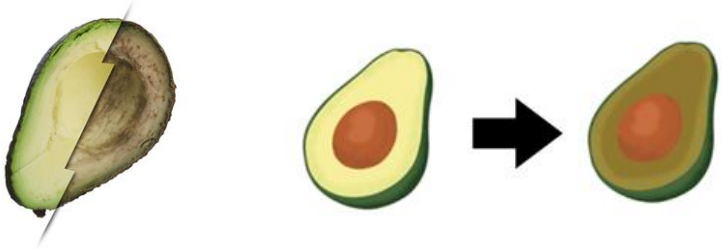


Figura 15 Avocado fresco e Avocado ossidato

Per affrontare le criticità delle varie fasi di lavorazione, gli avocado una volta raccolti, vengono lavati con soluzione di ipoclorito di sodio e selezionati per essere tagliati a metà con successiva sbucciatura e denocciolamento. La polpa viene tagliata in fette o a cubetti per essere immersa in una soluzione di clorito di calcio allo 0,5% e cisteina allo 0,5% per evitare l'imbrunimento prima del confezionato in plastica rigida ricoperta da una pellicola di plastica in PVC (Figure 16) (Pinheiro et al., 2009).

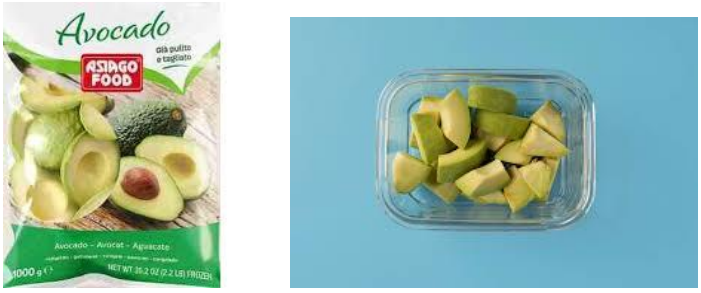


Figura 16 Prodotti avocado IV gamma

1.5 Scarti della lavorazione dell'avocado: Problemi e Opportunità

Il frutto di avocado è composto da epicarpo (buccia), mesocarpo (polpa) ed endocarpo (nocciolo); in termini di distribuzione in peso la polpa rappresenta circa il 65-72% del frutto, il nocciolo il 20-21% e la buccia il 7-15% (Figura 17).

Figura 17 Componenti botaniche frutto avocado

L'avocado è ampiamente consumato e lavorato in tutto il mondo (Colombo & Papetti., 2019).

L'industria dell''avocado produce come risultato della sua lavorazione un'enorme quantità di rifiuti: per ogni 1000 kg di avocado trasformato, vengono prodotti solo circa 78 kg o 85 L di olio di avocado spremuto a freddo (Vargas et al., 2020).

La lavorazione degli avocado genera circa 2,42 milioni di tonnellate di sottoprodotti (bucce e semi) che vengono rilasciati nell'ambiente. Secondo Araújo et al. (2018), questi sottoprodotti rappresentano circa il 30% del peso fresco del frutto di avocado (Figura 18). Pertanto, la produzione e la lavorazione dell'avocado generano grandi quantità di rifiuti che comportano sfide ambientali poiché richiedono lunghi periodi di degradazione.

Figura 18 Scarti lavorazione avocado

Attualmente è fattibile l'uso di tecnologie ecocompatibili per estrarre composti dai sottoprodotti ottenuti dalla lavorazione di avocado (buccia, nocciolo e polpa esausta), riducendo gli effetti negativi sulla bioattività e sulle modifiche strutturali dei composti bioattivi (Araújoa et al., 2018).

Dai residui della lavorazione dell'avocado si possono estrarre oltre a oli, fibre, oli essenziali che vengono usati come ingredienti per produrre alimenti e altri prodotti, diversi composti bioattivi che derivano dal metabolismo secondario della pianta. Troviamo soprattutto composti fenologici come i glicosidi della quercetina, i dimeri di procianidina di tipo A e B, trimeri di procianidina di tipo A, catechina, acido caffeoilchinico, acido cumar-oilchinico, le quali grazie alle loro proprietà bioattive vengono applicate in vari settori tra cui l'ambito nutraceutico, cosmetico, farmaceutico e alimentare. (Araújoa et al., 2018).

La composizione chimica dei semi e della buccia dell'avocado dipende da vari fattori tra cui la cultivar, il clima, la zona di produzione, la maturazione del frutto, l'andamento delle precipitazioni e i fattori genetici (Araújo et al., 2018). Questi sottoprodotti contengono quantità relativamente significative di carboidrati, proteine, lipidi, fibre e elevate quantità di composti bioattivi. Le componenti principali della buccia e del nocciolo sono: lignina (35,0% e 15,3%), zuccheri polimerici (rispettivamente 23,6% e 43,9%) ed estratti acquosi (rispettivamente 15,5% e 16,9%). Entrambe le biomasse contengono lipidi e proteine, ma in proporzione minore del 6% della composizione totale; la buccia ha una percentuale maggiormente elevata di azoto e ossigeno rispetto al nocciolo.

I semi sono ricchi di nutrienti come carboidrati, proteine, lipidi e ceneri. Essi hanno un potenziale utilizzo come agente addensante, gelificante, bioplastico ed emulsionante nei sistemi alimentari,

nonché come possibile ingrediente in polimeri biodegradabili per imballaggi alimentari. Inoltre, essendo una fonte di amido pari al 30%, questo biopolimero è fonte di energia per la piana e può essere usato per ottenere biogas di seconda generazione. (Araújo et al., 2018). I noccioli sono una ricca fonte di glucosio (93,2% della frazione polimerica), che potrebbe essere utilizzato per ottenere biocarburanti o derivati di interesse (Vargas et al., 2020).

I noccioli dell'avocado possono essere utilizzati anche nell'ambito alimentare sia per migliorare il prodotto che per la sua conservazione. Infatti essi possono essere macinati è usati per migliorare le proprietà funzionali e nutrizionali dei prodotti da forno. Il residuo fibroso del nocciolo può essere usato nell'industria della panificazione come additivo per aumentare la morbidezza del prodotto finito. La farina dei noccioli di avocado ha un basso contenuto proteico e si può usare per realizzare prodotti croccanti e teneri come biscotti e torte e sembrerebbe che questa farina ha una resa all'incirca del 47 % ed è ricca di sostanze nutritive, rendendola una fonte alternativa per preparar biscotti, torte e pane. La sostituzione della farina di frumento con la farina del nocciolo del avocado per preparare i prodotti da forno, riduce i costi di cottura, migliora le proprietà fitochimiche. e promuove un'economia circolare (Nyakang'**y** et al., 2023).

Un esempio di applicazione del seme dell'avocado nel miglioramento della conservazione attraverso l'utilizzo degli antiossidanti estratti dai noccioli del avocado riguarda la carne e i prodotti a base di carne che sono suscettibili al deterioramento microbiologico e all'ossidazione dei grassi che riducono la loro shelf life. Infatti si è visto che con dei trattamenti con la farina di semi dell'avocado allo 0,5% sulla carne da hamburger, questo ha comportato la protezione control ossidazione dei grassi maggiore del 90%(Nyakang'y et al., 2023).

La farina del nocciolo del avocado è una fonte naturale del colore arancione che può essere usato nell'arricchire le bevande. Diversi ricercatori hanno studiato i semi di avocado come fonte di composti bioattivi nel settore delle bevande. Ad esempio, è stato studiato il seme di avocado in una bevanda istantanea incorporata con maltodestrina e zenzero. L'amido presente nei noccioli del avocado (75% del suo peso) può essere idrolizzato con l'uso degli enzimi per ottenere zuccheri semplici che vengono fermentati durante la fermentazione alcolica per ottenimento della birra (Nyakang'y et al., 2023).

La farina del nocciolo del avocado può avere anche un consumo diretto, infatti fatta essiccare a 50 °C per due ore si ottiene il tè di avocado.

Sebbene la maggior parte delle attività biologiche dei sottoprodotti dell'avocado siano legate al seme (Araújo et al., 2018), è stato dimostrato che le bucce hanno un contenuto di fenoli più elevato (63,5 mg/g GAE) rispetto al seme (57,3 mg/g GAE) e sono stati identificati più di settanta composti fenolici nella sola buccia della varietà Hass. Inoltre la buccia ha un'attività antiossidante maggiore del seme con un valore IC50 di 9,5. Per questo motivo, la buccia ha dimostrato di avere numerosi benefici

essendo una fonte abbondante e rinnovabile di ingredienti bioattivi, inclusi polifenoli, per l'industria alimentare, per la formulazione di alimenti funzionali, e farmaceutica promuovendo al contempo l'agenda dell'economia circolare per rifiuti zero (Hurtado-Fernández et al., 2018).

Gli estratti della buccia di avocado sono stati ampiamente studiati per i molti composti fenolici, tra cui flavanoli, antociani (Ramos-Aguilar et al., 2021). Le bucce, pertanto, hanno dimostrato di avere proprietà antiossidanti e possono essere utilizzate come conservanti nei prodotti alimentari (Tremocoldi et al., 2018). Inoltre, Figueroa et al. (2021) hanno studiato la potenziale applicazione degli estratti di buccia di avocado, dimostrando che l'estratto ha un'elevata attività antimicrobica contro i batteri sia Gram-positivi che Gram-negativi e, pertanto, può essere utilizzato negli alimenti come conservante naturale per prevenirne il rapido deterioramento. In uno studio che confrontava le bucce della varietà Hass e di un avocado autoctono, Ramos-Aguilar et al. (2021) hanno riportato che le bucce di entrambe le varietà contenevano composti bioattivi, tra cui perseitolo, β-sitosterolo, α-tocoferolo, epicatechina, carotenoidi e cianidrina-3-glucoside. Inoltre, è stato accertato che le bucce di avocado contengono efficaci proprietà antibiotiche, antimicrobiche e antinfiammatorie (Morais et al., 2015), rendendole impiegabili nell'industria farmaceutica (Dabas et al., 2013; Kamaraj et al., 2020).

Ramos-Aguilar et al. (2021) hanno segnalato la possibilità che le bucce di avocado Hass possano essere convertite in farina di buccia in sostituzione della farina di cereali nei prodotti trasformati e per fortificare gli alimenti e promuovere una buona salute **(**Dziki et al., 2014). Inoltre le bucce di avocado sono state utilizzate per fortificare le bevande rendendole funzionali, con proprietà benefiche per la salute. Rotta et al. (2016) hanno preparato un tè di bucce di avocado essiccate e hanno notato un contenuto significativo di fenoli, che ha mostrato una migliore attività antiossidante nel tè ed è stato accettato dal pannel sensoriale. Inoltre, è stato dimostrato che l'estratto di buccia previene l'ossidazione delle proteine quando il 5% dell'estratto è aggiunto alla carne macinata (Calderón-Oliver & López-Hernández, 2022).

Tabella 1 Composti e potenziali applicazioni della buccia di avocado riportati in letteratura

Materia Prima	Composti / Proprietà	Applicazione	Riferimento
Bucce di avocado Hass e varietà autoctona	Perseitol, β-sitosterolo, α-tocoferolo, epicatechina, carotenoidi, cianidrina-3-glucoside	Valorizzazione nutraceutica e funzionale	Ramos-Aguilar et al. (2021
Bucce di avocado	Proprietà antibiotiche, antimicrobiche e antinfiammatorie	Applicazioni farmaceutiche	Morais et al., 2015
Buccia avocado	Attività antimicrobica verso Gram+ e Gram -	Conservante alimentare	Figueroa et al., 2021
Bucce avocado	Attività antiossidante	Conservanti prodotti alimentari	Tremocoldi et al., 2018
Bucce di avocado	Attività biologiche con potenziale terapeutico	Industria farmaceutica	Dabas et al., 2013; Kamaraj et al., 2020
Bucce di avocado Hass trasformate in farina	Ricchezza in composti bioattivi	Sostituzione parziale della farina di cereali; fortificazione alimentare	Ramos-Aguilar et al., 2021
Farina da sottoprodotti vegetali	Miglioramento del profilo nutrizionale dei prodotti a base di farina	Promozione della salute tramite alimenti fortificati	Dziki et al., 2014
Tè da bucce essiccate	Elevato contenuto fenolico; elevata attività antiossidante; buona accettabilità sensoriale	Bevande funzionali	Rotta et al., 2016
Estratto di buccia (5%) in carne macinata	Prevenzione dell'ossidazione proteica	Conservazione naturale degli alimenti	Calderón-Oliver & López-Hernández, 2022

CAPITOLO 2.

Estrazione di composti bioattivi da scarti di avocado

2.1 Composti Fenolici

I composti fenolici costituiscono una importante classe eterogenea di metaboliti secondari vegetali, ampiamente distribuiti nel regno vegetale e caratterizzati da un'ampia diversità strutturale. Questi composti si presentano come agliconi o glicosidi, come monomeri o come strutture altamente polimerizzate, oppure come composti liberi o legati alla matrice. Inoltre, non sono distribuiti uniformemente nella pianta e la loro stabilità varia significativamente (Santos-Buelga et al., 2012).

Questi composti fitochimici hanno un effetto benefico per la salute umana e l'estrazione è il primo passo nell'utilizzo dei fenoli da fonti naturali nella preparazione di integratori alimentari o nutraceutici, ingredienti alimentari, prodotti farmaceutici e cosmetici (Bucić-Kojić et al., 2013).

L'estrazione è una fase molto importante nell'isolamento, nell'identificazione e nell'utilizzo dei composti fenolici e non esiste un metodo di estrazione unico e standardizzato (Bucić-Kojić et al., 2007).

Ciò complica notevolmente i processi di estrazione e isolamento, il che significa che non è possibile raccomandare un'unica procedura standardizzata per tutti i composti fenolici e/o materiali vegetali; le procedure devono essere ottimizzate in base alla natura del campione e degli analiti target (Santos-Buelga et al., 2012).

Tra le tecnologie usate per l'estrazione dei composti polifenolici dagli alimenti troviamo tecniche convenzionali che includono la percolazione, la decozione, l'estrazione a riflusso termico, l'estrazione Soxhlet e la macerazione, mentre le tecniche avanzate includono l'estrazione assistita da ultrasuoni, l'estrazione assistita da microonde, l'estrazione con fluido supercritico, la scarica elettrica ad alta tensione, l'estrazione con campo elettrico pulsato e l'estrazione assistita da enzimi. Le tecniche avanzate sono più efficienti del 32-36%, con un consumo energetico circa 15 volte inferiore e producono estratti di qualità superiore. La separazione a membrana e l'incapsulamento sembrano promettenti per migliorare la sostenibilità della separazione dei composti polifenolici (Sridhar et al., 2011).

Durante l'estrazione dei polifenoli ci sono diversi fattori legati alla matrice vegetale che influenzano l'esito del trattamento, ad esempio la materia prima di partenza e la parte botanica utilizzata essendo che i polifenoli non sono distribuiti in maniera uniforme nei tessuti vegetali. Anche le dimensioni delle particelle solide del materiale e la sua porosità influenzano la penetrazione del solvente nelle

particelle solide e la diffusione dei soluti. Infine la compartimentalizzazione dei polifenoli all'interno della cellula e le loro eventuali interazioni con macromolecole come le proteine possono influenzare l'esito dell'estrazione (Azmir et al., 2013).

Per concludere è importante sottolineare che se le tecniche di estrazione richiedono molto tempo, energia e solventi che hanno un impatto ambientale anche per la salute umana sulla gestione dei solventi, le tecnologie emergenti di estrazione permettono una migliore resa dei composti target dalle materie prime, riducendo i tempi di lavoro e i costi e sostituendo i solventi tossici con altri ecocompatibili riducendo il loro impatto ambientale (Garcia Vaquero et al., 2020) (Prado et al., 2021).

2.2 Estrazione Solido-Liquido

L'estrazione solido-liquido, o lisciviazione, è un processo di separazione utilizzato per estrarre un costituente da un solido mediante un solvente che prevede il trasferimento di soluti da una matrice solida a un solvente. È un'operazione unitaria ampiamente utilizzata per recuperare molti importanti componenti alimentari: saccarosio da canna da zucchero o barbabietola, lipidi da semi oleosi, proteine da farine di semi oleosi, sostanze fitochimiche da piante e idrocolloidi funzionali da alghe (Prado et al., 2021).

L'estrazione solido/liquido si articola in tre fasi principali (Naviglio et al., 2008). In primo luogo, avviene la dissoluzione del soluto nel solvente alla superficie della matrice solida. Successivamente, il soluto diffonde dall'interno dei pori o della struttura del materiale verso la superficie della particella. Infine, il soluto attraversa il film liquido che circonda la particella e si trasferisce nella massa principale del solvente, completando il processo di trasferimento di massa.

La dimensione delle particelle, il solvente, il rapporto solvente/alimentazione (S/F), la temperatura e l'agitazione sono fattori importanti in questo processo.

Lo spostamento di massa per diffusione è il trasporto o spostamento naturale di una sostanza sotto l'influenza di un gradiente di concentrazione, dove le sostanze (molecole di soluto) si spostano da zone a concentrazione maggiore verso zone a concentrazione minore fino al raggiungimento dell'equilibrio (Naviglio et al., 2008).

La velocità di diffusione è regolata dalla legge di Fick (Eq. 1):

$$v = \frac{D\ A\ \Delta c}{l} \qquad \text{Eq. (1)}$$

dove:

v = velocità di diffusione delle molecole di soluto fra due punti della soluzione;

A = area della superficie attraverso la quale avviene la diffusione;

Δc = differenza di concentrazione fra i due punti;

l = distanza fra i due punti.

È noto che l'estrazione solido-liquido è un'operazione eterogenea e multicomponente che comporta un trasferimento di massa non stazionario dal solido al liquido, in cui i soluti possono essere estratti a velocità diverse a seconda della loro posizione (superficie esterna, pori, vacuoli, ecc.) e della loro solubilità (Bucić-Kojić et al., 2013).

L'estrazione solido-liquido di composti fenolici avviene tramite l'utilizzo di molte tecniche ma quelle più comunemente usate per il loro isolamento e quantificazione sono l'estrazione con diversi solventi e in alcuni casi l'estrazione con fluido supercritico (Bucić-Kojić et al., 2007).

Il tipo di solvente gioca un ruolo importante nell'estrazione quantitativa e l'etanolo al 60-80% in acqua sembra il solvente più promettente per la maggior parte dei gruppi fenolici.

Recentemente, sono state suggerite anche soluzioni leggermente alcaline per idrolizzare e recuperare i composti fenolici legati (Oreopoulou et al., 2019).

2.3 Tecnologia di estrazione assistita

Negli anni nell'ambito delle estrazioni solido/liquido si è passati dalle tecniche di estrazioni tradizionali dove si utilizzavano anche solventi derivati dal petrolio, vedi l'esano, a delle nuove tecniche innovative che utilizzano solventi green e altri metodi, con lo scopo di ridurre il tempo di estrazione, di aumentarne la resa di estrazione del estratto o estratti selezionati, senza peraltro lasciare residui del solvente nell'alimento, con riduzione dell' impatto ambientale e miglioramento della salute dell'uomo (Aguilera et al., 2003).

L'estrazione assistita da energia è l'evoluzione moderna delle tecniche classiche di estrazione. Essa si basa sull'applicazione di diverse forme di energia fisica per accelerare il trasferimento di massa tra una matrice solida e un solvente liquido. L'estrazione assistita si affida alla diffusione passiva o al calore convettivo che utilizzano stimoli fisici per rompere le pareti cellulari e favorire la penetrazione del solvente (Chemat et al., 2015).

Le più comuni tecniche di estrazione assistita nell'ambito alimentare e di estrazione di componenti bioattivi sono microonde (MW), ultrasuoni (US) ed alte pressioni idrostatiche (HPE) (Maric et al., 2018).

Le MW appartengono alle radiazioni non ionizzanti con frequenze da 300 MHz a 300 GHz.

Le microonde generano calore quando interagiscono con le molecole polari presenti nelle cellule. Questo avviene attraverso due meccanismi principali: la conduzione ionica e la rotazione dei dipoli, che portano a un rapido riscaldamento interno del materiale. Il riscaldamento provoca la rottura delle pareti cellulari e favorisce la diffusione dei composti target nel solvente.

Durante l'estrazione assistita da microonde, l'energia assorbita dipende dalla costante dielettrica del sistema: valori più elevati determinano un maggiore riscaldamento. Rispetto alle tecniche convenzionali, la MAE richiede meno tempo e solvente, aumenta la resa e riduce il consumo energetico, risultando quindi una tecnologia più sostenibile (Maric et al., 2018).

L'estrazione ad alta pressione idrostatica (HPE) prevede l'applicazione di pressioni comprese tra 100 e 1000 MPa alla miscela di materia prima e solvente, generalmente a temperatura ambiente. L'aumento rapido della pressione genera un'elevata differenza pressoria tra interno ed esterno delle cellule vegetali, causando deformazioni e possibili danni a pareti e membrane. Questo fenomeno favorisce la permeazione del solvente nella matrice e accelera il trasferimento di massa e la dissoluzione dei composti solubili (Huang et al., 2013).

A seconda dell'intensità della pressione, le cellule possono subire una semplice permeabilizzazione, con rapido riempimento di solvente e dissoluzione dei componenti attivi, oppure una vera e propria rottura strutturale, con formazione di microfratture che riducono la resistenza alla diffusione. Durante la decompressione, la brusca caduta di pressione amplifica questi effetti, aumentando la permeabilità cellulare e facilitando l'uscita dei composti nel solvente (Huang et al., 2013).

L'HPE consente quindi di migliorare l'efficienza estrattiva senza ricorrere a temperature elevate, preservando i composti termolabili, riducendo i tempi di processo e il consumo energetico. Per queste ragioni è considerata una tecnologia sostenibile e a basso impatto ambientale (Huang et al., 2013).

2.4 Estrazione assistita da ultrasuoni

Gli ultrasuoni sono onde sonore, caratterizzate da frequenze superiori a quelle percepite dall'orecchio umano. Nel caso delle onde ultrasonore, la frequenza di oscillazione è superiore a 20 kHz, limite convenzionale del regime sonico, e si estende fino ai 10 MHz, dopodiché si entra nel regime ipersonico (Picò., 2013).

Gli ultrasuoni in base alla loro frequenza possono essere divisi in tre categorie (Picò., 2013):

- frequenze comprese tra i 20 kHz e i 100 kHz si trovano gli US ad alta intensità, che talvolta vengono utilizzati nel settore delle tecnologie alimentari
- le frequenze tra 100 kHz e 1 MHz vengono classificate come frequenze intermedie.
- frequenze più elevate (5 MHz – 10 MHz) caratterizzano gli US a bassa intensità, utilizzati per effettuare determinazioni analitiche.

Gli ultrasuoni, si propagano in un mezzo sotto forma di onde, alternando fasi di compressione e rarefazione, che comportano variazioni locali nella pressione delle molecole. Il fenomeno più importante che questo comporta è la cavitazione, ovvero la formazione di micro-bolle gassose all'interno di un mezzo liquido, che crescono fino al loro collasso. Infatti, se nella fase di rarefazione dell'onda, la pressione scende al di sotto della tensione di vapore del liquido, possono venire meno le forze di attrazione tra le molecole, con la creazione di piccole cavità gassose che aumenteranno di dimensione per fenomeni di coalescenza o per diffusione rettificata. Quest'ultimo è dovuto al fatto che, durante la fase di compressione dell'onda, non tutte le molecole di gas che sono entrate nella bolla vengono espulse e di conseguenza il suo diametro aumenta progressivamente. Esistono due tipi di cavitazione (Tiwari et al., 2015):

- la cavitazione non inerziale (stabile), è un fenomeno di durata maggiore, in cui la bolla oscilla attorno alla sua posizione di equilibrio per molti cicli di compressione e rarefazione dell'onda ultrasonora. Nella fase di compressione la superficie esterna della bolla è minore e non tutto il gas assorbito durante la rarefazione riesce ad uscire, quindi il diametro aumenta lentamente

- La cavitazione inerziale (transiente o instabile) invece, è un fenomeno rapido per cui, nella fase di rarefazione, la bolla si ingrandisce molto rispetto al suo volume di equilibrio, per poi collassare violentemente durante la compressione. L'implosione avviene dopo il raggiungimento di una "dimensione critica" per cui la bolla non è più in grado di sostenersi. Al momento dell'implosione, si vengono a creare delle condizioni di temperatura e pressione estreme: fino a 5.000 K e più di 1000 atm. Nonostante le temperature raggiunte siano così elevate, anche il processo di raffreddamento risulta essere estremamente rapido, dell'ordine dei 109 K/s.

Un sistema in grado di generare ultrasuoni è composto da tre elementi: una fonte di energia, un trasduttore e un sistema di trasporto e di applicazione delle onde ultrasoniche. Per applicazioni di tipo industriale l'energia elettrica è la fonte energetica più utilizzata. Il trasduttore serve per convertire l'energia fornita al sistema in energia ultrasonica. Se la fonte energetica è di tipo elettrico vengono impiegati due tipi di trasduttori: magnetostrittivo e piezoelettrico. Il trasduttore magnetostrittivo utilizza il principio della magnetostrizione per il quale alcune leghe metalliche si espandono e contraggono in seguito all'applicazione di un campo magnetico alternato. Il trasduttore piezoelettrico si basa sull'effetto piezoelettrico di alcuni materiali ceramici che, sottoposti a variazioni di tensione elettriche, sono in grado di generare una carica uniforme sulle due facce del materiale, da un lato positiva dall'altro negativa. Questo effetto è noto come effetto diretto. Esiste anche un effetto indiretto che genera onde acustiche quando viene applicato un campo elettrico sulle superfici del materiale piezoelettrico il quale si espande o si contrae, a seconda della polarità, modificando la forma del materiale, generando così un'onda meccanica. Nel caso in cui sul materiale piezoelettrico venga applicata una corrente alternata con frequenza superiore a 20 kHz, la polarità delle superfici cambia numerose volte causando onde ultrasoniche. Una delle disposizioni più comune per questo tipo di trasduttori piezoelettrici è chiamata di tipo "sandwich". La disposizione a sandwich prevede due o più pezzi di ceramica connessi in direzioni di polarità opposta tra due cilindri metallici. La vibrazione generata dal trasduttore viene trasmessa al mezzo grazie al sistema applicativo o radiatore. Il radiatore è un elemento vibrante in grado di trasmettere e distribuire al mezzo di propagazione la vibrazione generata dal trasduttore. I materiali maggiormente impiegati per questo tipo di sistema sono alluminio o titanio (Amato et al., 2017).

La tecnica degli ultrasuoni (UAE) è una tecnica di estrazione semplice da usare non termica e non invasiva e distruttiva che trova molte applicazioni nel settore alimentare inoltre permette di ridurre l'uso di solventi e quindi di ridurre l'impatto ambientale e costi e consumi energetici.

La tecnologia UAE può potenzialmente migliorare l'estrazione di componenti come polifenoli, antociani, composti aromatici, polisaccaridi, oli e composti funzionali, quando utilizzata come fase

di pretrattamento in un processo unitario. La maggiore resa ottenuta in questi processi UAE è di grande interesse dal punto di vista industriale, poiché la tecnologia è applicabile con solventi generalmente riconosciuti come sicuri (GRAS), è una fase aggiuntiva al processo esistente con alterazioni minime, comporta riduzione dell'uso di solventi e riduzione dei tempi di estrazione (Tiwari et al., 2015).

Gli ultrasuoni possono essere applicati in chimica analitica in due modi: direttamente sul campione, o indirettamente attraverso le pareti del contenitore del campione utilizzando un bagno d'acqua, che rappresenta la fonte di irradiazione ultrasonica più disponibile ed economica. Tuttavia, esistono altri dispositivi più efficienti [ad esempio, corni (indiretti o diretti) o sonde ultrasoniche (direttamente sul campione)] in grado di sviluppare una potenza ultrasonica maggiore (Picò., 2013).

I parametri del processo UAE, tra cui la selezione del reattore (bagno ultrasonico o tipo sonda/corno), la frequenza operativa, la potenza o l'intensità ultrasonica applicata, il tempo di estrazione e la temperatura di estrazione, nonché il tipo, il rapporto e le proprietà del solvente sono importanti.

La potenza o l'intensità ultrasonica è proporzionale all'ampiezza ultrasonica. Un'ampiezza maggiore non migliora necessariamente l'efficienza del processo e la cavitazione.

Uno degli aspetti più importanti dell'utilizzo degli ultrasuoni per l'estrazione è la necessità di individuare la quantità appropriata di energia acustica da applicare al sistema. Quasi tutte le apparecchiature a ultrasuoni sono in grado di variare la potenza generata (ovvero l'ampiezza di vibrazione del trasduttore, che è una misura dell'energia necessaria per azionare il trasduttore). Tuttavia, è importante conoscere la potenza assoluta in ingresso nel sistema (Esclapez et al., 2011).

Ai fini dell'estrazione, il collasso delle bolle di cavitazione vicino alle pareti cellulari indotto dagli ultrasuoni, produce la rottura della cellula, causando così un ingresso più forte e potenziato del solvente nelle cellule e un'intensificazione del trasferimento di massa (Maric et al., 2018).

La rottura della parete cellulare dovuta agli effetti meccanici della cavitazione ultrasonica, causano la formazione di microfessure, la rottura cellulare e la creazione di pori sulle superfici, migliorando così la permeabilità della matrice. Questa tecnica di estazione mostra una maggiore accessibilità del solvente nella struttura interna della matrice sottoposta all'estrazione, facilitando il rilascio del composto target attraverso le microfessure e microcanali che migliorano la permeazione del solvente nella matrice. La modifica della superficie della matrice aumenta l'accessibilità del solvente alla struttura interna e consente al composto target di dissolversi nel solvente (Tiwari et al., 2015).

Pertanto, gli effetti meccanici e cavitazionali sono responsabili dell'estrazione dei composti target, con conseguente fenomeno a due stadi (Tiwari et al., 2015):

- ingresso del solvente nella matrice come risultato della rottura della matrice cellulare, riduzione delle dimensioni delle particelle ed effetti meccanici, consentendo una maggiore

penetrazione del solvente

- lavaggio degli estratti dalla matrice dovuto all'aumento della superficie di contatto tra le fasi solida e liquida.

Di conseguenza, il soluto si diffonde rapidamente dalla matrice al solvente con un migliore trasferimento di massa attraverso le membrane. Questo processo di ingresso e lavaggio continua fino al raggiungimento dell'equilibrio (Tiwari et al., 2015).

Laddove sia necessaria la pre-idratazione per ottenere l'estrazione, gli ultrasuoni accelerano efficacemente il processo di idratazione. Le bolle di cavitazione indotte dagli ultrasuoni presentano superfici idrofobiche all'interno del liquido di estrazione, aumentando così il carattere idrofobico netto del mezzo di estrazione. Pertanto è possibile estrarre componenti polari in mezzi di estrazione acquosi altrimenti idrofili, riducendo la necessità di mezzi di estrazione idrofobici o fortemente polari generalmente indesiderati (Pingret et al., 2013).

Gli ultrasuoni sono suoni vengono usate nel settore alimentare negli ultimi anni per (Maric et al., 2018):

- Estrazione di composti bioattivi
- Essiccazione
- Emulsione e omogeneizzazione
- L'inattivazione di microrganismi e enzimi

L'estrazione assistita da ultrasuoni (USAE) è un processo interessante per ottenere composti di alto valore e potrebbe contribuire ad aumentare il valore di alcuni sottoprodotti alimentari se utilizzati come fonti di composti naturali. I principali vantaggi sono un'estrazione più efficace, con conseguente risparmio energetico, e anche l'utilizzo di temperature moderate, vantaggioso per i composti termosensibili. Per un'applicazione efficace dell'USAE, è però necessario considerare l'influenza di diverse variabili di processo, le principali delle quali sono la potenza ultrasonica applicata, la frequenza, la temperatura di estrazione, le caratteristiche del reattore e l'interazione solvente-campione (Esclapez et al., 2011).

È opportuno però segnalare che la tecnologia USAE ha anche alcuni svantaggi e nello specifico che la tecnologia deve essere ottimizzata di volta in volta, il rumore generato dalla strumentazione, cambiamenti non voluti delle molecole e il costo (Tiwari et al., 2015).

2.5 Solventi verdi e chimica sostenibile

Il concetto di chimica analitica verde promuove lo sviluppo di metodologie rispettose dell’ambiente, privilegiando analisi dirette e in situ per ridurre consumo di energia, reagenti e produzione di rifiuti (Hàckl et al., 2018). Nato a metà degli anni Novanta, questo approccio si ispira ai principi della

chimica verde definiti da Anastas e successivamente adattati alla chimica analitica, con particolare attenzione a miniaturizzazione, automazione, riduzione del trattamento del campione e sicurezza dell'operatore (Hàckl et al., 2018).

Sono stati proposti diversi strumenti per valutare la sostenibilità dei metodi analitici, tra cui il NEMI, l'Analytical Eco-Scale e il GAPI, che considerano pericolosità dei reagenti, consumo energetico e produzione di rifiuti (Hàckl et al., 2018). Non esiste un unico criterio condiviso, ma vi è consenso sull'esigenza di rendere le procedure più sostenibili.

Un aspetto centrale riguarda la sostituzione dei solventi convenzionali con alternative più ecocompatibili, valutate attraverso l'analisi del ciclo di vita (LCA). Un solvente può essere definito verde solo in relazione a una specifica applicazione e rispetto alle alternative disponibili (Hàckl et al., 2018).

Parlando di solventi ecologici classici, ci riferiamo a solventi già esistenti, registrati secondo il Regolamento REACH (Registrazione, Valutazione, Autorizzazione e Restrizione delle Sostanze Chimiche) e che potrebbero già trovare applicazione nell'industria chimica e nella formulazione.

Esistono alcuni solventi noti da tempo che potrebbero avere un futuro promettente nel contesto dei solventi ecologici. Ad esempio, il γ-valerolattone presente nella frutta, ha un basso punto di fusione e un alto punto di ebollizione e di infiammabilità ma ha una bassa tossicità e miscibile in acqua, ha un gradevole odore erbaceo e come tale viene utilizzato nell'industria degli aromi e dei profumi e persino come additivo alimentare. Però esso richiede molta energia per la sua distillazione (Hàckl et al., 2018).

Altri promettenti candidati di solventi verdi non sono solo i derivati del glicerolo, come il carbonato di glicerolo, il solchetale o la triacetina, ma anche l'acido lattico e i suoi derivati (ad esempi, il lattato di etile). La dimetilammide dell'acido lattico è venduta da BASF come alternativa verde e sicura all'N– metilpirrolidone (Hàckl et al., 2018).

Tra i solventi verdi sono compresi anche i liquidi ionici e anidride carbonica supercritica, ma anche solventi eutettici profondi, termomorfi e fluorurati (Hessel et al., 2022).

Infine, i NADES sono solventi green riportati in molti lavori sull'estrazione combinata con tecniche di estrazione innovative su diverse matrici alimentari**.**

2.6 Natural Deep Eutectic Solvents (NaDES)

NaDES è l'acronimo di "solventi eutettici profondi naturali". Sono una classe di solventi green e innovativi composti da metaboliti naturali come acidi organici, zuccheri, urea e cloruro di colina che sono presenti in tutte le cellule e organismi (Morgan et al., 2022).

Essi sono un derivato nuovo dei solventi eutettici profondi (DES). I DES sono una miscela eutettica di due o tre componenti che generalmente interagiscono con legami ad idrogeno e hanno un punto di fusione inferiore a quello di ciascun componente, quando combinati al corretto rapporto molare. I NaDES si distinguono dai DES in quanto provengono da fonti naturali edibili e non dannose per l'uomo (Hikmawanti et al., 2021). Per formare i NaDES è necessario avere due elementi fondamentali, un accettore di legami a idrogeno (HBA) e un donatore di legami a idrogeno (HBD). Il cloruro di colina è l'HBA più ampiamente utilizzato nella preparazione del DES, anche se viene spesso impiegata la betaina, che è un analogo del cloruro di colina, ma quest'ultima ha una preparazione meno complicata della prima.

Queste miscele eutettiche offrono diversi vantaggi (Morgan et al., 2022), tra cui la biodegradabilità, la sostenibilità, il costo basso, la non tossicità, la maggior facilità nello smaltimento rispetto ai solventi tradizionali, le proprietà modulabili e la capacità di stabilizzare i bio-composti, l'elevata disponibilità in natura, l'origine rinnovabile e la non infiammabilità.

I NaDES possono essere raggruppati in, NaDES liquidi ionici (fatti da un acido e una base), NaDES neutri (fatti solo da zuccheri o zuccheri e polialcol), NaDES neutri con acidi (fatti da zucchero/polialcol e acidi organici), NaDES neutri con basi (fatti da zucchero/polialcol e basi organiche), NaDES a base di amminoacidi (fatti da amminoacidi e acidi organici/zuccheri) (Mehariya et al., 2021).

La principale debolezza dei NaDES è la viscosità e le variazioni nei tipi di componenti costitutivi utilizzati per sintetizzare le loro miscele.

La viscosità dei NaDES rappresenta un limite importante considerando le future applicazioni industriali. Questo problema può essere risolto in due modi, ovvero agendo sulla temperatura o modificando il contenuto d'acqua. Un aumento della temperatura porta a una diminuzione della viscosità. Tuttavia, nel caso del NaDES, è necessario effettuare valutazione, trattandosi di composti naturali, riguardo al trattamento: un aumento della temperatura potrebbe portare alla degradazione dei composti (Mehariya et al., 2021). Nel NaDES, l'aumento del contenuto di acqua diminuisce drasticamente la viscosità e la viscosità di un solvente dipende strettamente dalla forza dei legami H_2. I legami H_2 più forti rendono il solvente più viscoso, con una minore solubilità dei soluti. L'aggiunta di acqua è necessaria per ridurre il numero di legami H_2 che consentono la solubilizzazione del soluto. Tuttavia, se l'acqua supera il 50% in volume, si verifica una totale scomparsa dei legami H_2 e i

costituenti di partenza del solvente tendono a essere essi stessi solubilizzati dall'acqua, andando così a degradare il NaDES (Mehariya et al., 2021).

Attualmente, una delle principali applicazioni di NaDES è l'estrazione di composti bioattivi, sia idrofili che idrofobi, da diverse materie prime, in particolare dai residui dell'industria agroalimentare (Martin et al., 2023).

I NaDES possono agire attraverso due principali meccanismi. Da un lato esercitano un'azione diretta, interagendo con i composti bersaglio, generalmente mediante la formazione di legami a idrogeno che ne favoriscono la solubilizzazione. Dall'altro lato svolgono un'azione indiretta, contribuendo al danneggiamento della parete cellulare e facilitando il rilascio del composto target dalla matrice vegetale.

Nell 'articolo Martin M.S et al., (2023), sono stati estratti i composti fenologici dalle foglie del mirtillo tramite la tecnica degli ultrasuoni utilizzando diversi tipi di nades, dove per ognuno di loro si è valutato il contenuto dei polifenoli tramite l'utilizzo del Folin-Ciocalteu e la rispettiva attività antiossidante. Dopo lo screening di più NaDES, le migliori efficienze di estrazione in termini di contenuto totale di fenoli e attività antiossidante sono state fornite da NaDES composti da lattato, acetato di sodio e acqua (3:1:2) e da cloruro di colina e acido ossalico (1:1). Le condizioni di estrazione ottimali sono state raggiunte mediante ultrasuoni per 45 minuti a 65 °C e utilizzando rapporti solvente basati rispettivamente su acido lattico e colina. Rispetto ai solventi organici convenzionali, l'uso di questi NaDES composti da acido lattico e colina ha fornito prestazioni superiori per il recupero di composti fenolici (rispettivamente 1,6 e 2,2 volte più efficaci) e composti antiossidanti (rispettivamente 1,6 e 2,8 volte più efficaci).

Nel lavoro di Morgana N.**M.,** (2022), si sono utilizzati i NaDES per estrazione di fenolici, principalmente luteolina e idrossitirosolo, da sansa di oliva, sottoprodotto dell'industria olearia. In essa si trovano composti ad alto valore aggiunto, che lo trasformano in un'eccellente fonte di antiossidanti e composti fenolici, come idrossitirosolo, tirosolo, acidi fenolici, secoiridoidi e flavonoidi. I NaDES valutati sono i LGH (acido lattico: glucosio: acqua; rapporto molare 5:1:9,3), i ChCH (cloruro di colina: acido citrico: acqua; rapporto molare 1:1:2,7) e i ChLe (cloruro di colina e acido levulinico, rapporto molare 1:2). La (LGH) è stata selezionata per le sue migliori prestazioni nell'estrazione fenolica.

Nell'articolo Gharat, N. N., (2023), si è studiata l'estrazione assistita da ultrasuoni e i NaDES di acido ferulico (FA) da crusca di riso sgrassata a 25 kHz. Sono stati impiegati l'accettore di legame idrogeno cloruro di colina e il donatore di legame idrogeno D-glucosio in rapporto 1:1 (p/v).

Nell' articolo Popovic B.M., (2022), sono stati utilizzati tre diversi tipi di NaDES basati su cloruro di colina (ChCl) come accettore di legami idrogeno (HBA) e acido malico, urea e fruttosio (MalA, Ur e Fru) come donatori di legami idrogeno (HBD) con diverse tecniche di estrazione, tra cui gli ultrasuoni per estrarre polifenoli (acidi fenolici, antocianine e flavonoidi) dalla sansa delle amarene.

Tabella 2 Applicazioni dei NaDES per l'estrazione di composti fenolici da matrici vegetali

Prodotto	NaDES	Tecnica di estrazione	Principali risultati	Riferimento
Foglie di mirtillo	Lattato: acetato di sodio : acqua (3:1:2); Cloruro di colina : acido ossalico (1:1)	Ultrasuoni (45 min, 65 °C ,20 kHz9	Maggiore contenuto fenolico totale e attività antiossidante rispetto ai solventi organici convenzionali (fino a 2,2 maggiore per fenoli e 2,8 maggiore per attività antiossidante)	Martin et al., 2023
Sansa di oliva	LGH (acido lattico: glucosio: acqua, 5:1:9,3); ChCH (cloruro di colina : acido citrico : acqua, 1:1:2,7); ChLe (cloruro di	Ultrasuoni (45 min, 60 °C ,20 kHz9	LGH (acido lattico: glucosio: acqua; rapporto molare 5:1:9,3) selezionato per le migliori prestazioni nell'estrazione di	Morgan et al., 2022

	colina : acido levulinico, 1:2)		composti fenolici (luteolina, idrossitirosolo)	
Crusca di riso sgrassata	Cloruro di colina : D-glucosio (1:1, p/v)	Ultrasuoni (26 min, 50°C,25 kHz)	Estrazione assistita da ultrasuoni di acido ferulico	Gharat et al., 2023
Sansa di amarena	Cloruro di colina con acido malico, urea o fruttosio (diversi rapporti molari)	Ultrasuoni (30 min, 50°C, 35 kHz)	Acido malico:Cloruro di Colina permettono una maggiore estrazione di polifenoli (acidi fenolici, antocianine, flavonoidi)	Popovic B.M., 2022

2.7 Stabilità dei composti fenolici in sistemi Nades

I NaDES sono usati per le estrazioni dei composti polifenolici dove questa classe di solventi green permette di avere estratti più stabili e di mitigare la loro instabilità chimica intrinseca verso la luce, calore e ossigeno (Martins et al., 2025).

La stabilità degli estratti ottenuti mediante estrazione con NaDES dei polifenoli da matrici alimentari è garantita dalla formazione di forti legami a idrogeno tra i componenti dei Nades ad esempio cloruro di colina e acido citrico con i gruppi ossidrilici dei polifenoli i quali sono meno reattivi verso la degradazione termica e luminosa grazie all'abbassamento dell'energia libera a causa di questa interazione molecolare (Martins et al., 2025).

L'elevata viscosità è tra i principali limiti operativi dei NaDES. Essa varia ampiamente a seconda della struttura molecolare e della densità della rete di legami idrogeno dei componenti. In genere, l'aumento della proporzione di donatori di legami idrogeno di tipo poliolo, come glicerolo o sorbitolo, porta a associazioni intermolecolari più forti e, di conseguenza, a una maggiore viscosità. Al contrario, un maggiore contenuto d'acqua o l'uso di acidi organici più piccoli riduce la viscosità a causa della rottura del reticolo dei legami idrogeno (Martins et al., 2025).

La polarità è un parametro che influenzano sia la solubilità che la selettività di estrazione nei NaDES. I sistemi idrofili, come colina: glicerolo, colina: acido lattico e betaina: acido citrico, presentano costanti dielettriche elevate ($\varepsilon \approx 55$-65), indicando prestazioni superiori per antiossidanti altamente polari, inclusi acidi fenolici e antociani. Al contrario, i NaDES idrofobici, come mentolo: acido caprilico: acido laurico, presentano costanti dielettriche inferiori a 15 sono più efficienti per carotenoidi, clorofille e tocoferoli lipofili (Martins et al., 2025).

A differenza dei sistemi binari convenzionali, come etanolo-acqua, il cui intervallo di polarità è ristretto, la polarità dei NaDES può essere regolata attraverso il tipo e il rapporto dei componenti. Ad esempio l'aumento del contenuto di acido nei sistemi colina: acido lattico migliora la polarità e la capacità di donazione di protoni, migliorando l'estrazione di quercetina e rutina (Martins et al., 2025).

Mentre la sostituzione del glicerolo con zuccheri come il fruttosio aumenta il numero di siti di legame idrogeno ma diminuisce la rigidità dielettrica, favorendo molecole moderatamente polari come i flavan-3-oli (Martins et al., 2025).

Inoltre l’elevata viscosità intrinseca dei Nades agisce come barriera fisica ad esempio la velocita di diffusione dell’ossigeno è molto inferiore a quella presente nei solventi come acqua ed etanolo cosi abbiamo una diminuzione delle reazioni radicaliche che portano ad una minore degradazione delle procianidine e degli acidi fenolici. Inoltre i NaDES creano una struttura che circonda le molecole fenoliche cosi in questo modo ho un minor contatto tra radicali liberi e ossigeno atmosferico (Gómez-Urios et al., 2022).

L'acqua agisce come un modulatore fisico-chimico critico nei NaDES, alterandone la polarità e la conduttività e la viscosità dove per quest’ultima viene abbassata cosi con minori livelli di viscosità ho una maggiore effetto estrattivo. Mentre piccole quantità d'acqua (10-30%) migliorano il trasferimento di massa e la diffusione, una diluizione eccessiva (>50%) può interrompere la rete eutettica, trasformando la miscela in una soluzione acquosa convenzionale e ho un effetto diluente e si rompono la rete di legami ad idrogeno portando ad una instabilità dell'estratto. Pertanto, l'aggiunta controllata di acqua è essenziale per mantenere le interazioni cooperative dei legami idrogeno che sono responsabili della stabilità e delle proprietà solventi dei NaDES (Martins et al., 2025).

Dal punto di vista dell'estrazione, l'acqua non solo riduce la viscosità, ma influenza anche la solvatazione dei composti fenolici alterando le interazioni dipolo-dipolo e la capacità di donazione di protoni. L'equilibrio ottimale si colloca tipicamente tra il 20% e il 40% di acqua, preservando la struttura e migliorando la cinetica (Martins et al., 2025).

Per l'estazione dei polifenoli si usano NaDES che contengono acidi organici che portano a pH bassi cosi da inibire gli enzimi PPO che sono responsabili alla degradazione dei polifenoli (Martins et al., 2025).

Diversi valori di pH dei NaDES possono influenzare le interazioni dei legami a idrogeno tra soluto e NaDES. I solventi formati da componenti acidi (gruppo carbossilico) hanno valori di pH inferiori rispetto a quelli formati da zucchero (gruppi carbonilici), che hanno i valori di pH più elevati (Gómez-Urios et al., 2022).

Nell'articolo di Gómez-Urios et al (2022) sono riportati i risultati per TPC durante la conservazione per 30 giorni in diverse condizioni: a 25 °C e 4 °C. I risultati hanno mostrato valori ridotti di TPC in tutti gli estratti NaDES a temperatura ambiente, dove TPC era più stabile negli estratti acido malico-cloruro di colina con il 70% di degradazione. Quindi, a basse temperature, TPC in acido malico - glucosio ha mostrato una degradazione del 15% a 4 °C e LP:MA del 35% dopo 30 giorni. In tutte le condizioni di conservazione gli estratti NaDES hanno mostrato una migliore stabilità dei polifenoli rispetto all'estratto etanolico. Altri studi hanno riportato che DES contribuisce alla stabilizzazione dei composti fenolici ad esempio si è riportato che gli estratti con cloruro di colina: acido citrico migliorano la stabilità del 70% degli antociani a 4 °C. Inoltre, Si è osservato che i sistemi LA: Glu forniscono una migliore stabilità della cianidina rispetto alle estrazioni con etanolo. (Gómez-Urios et al., 2022).

NaDES hanno dimostrato di migliorare la stabilità dei polifenoli durante 30 giorni di conservazione. I NaDES possono essere considerati una buona alternativa per sostituire altri solventi organici per l'estrazione di composti bioattivi. Inoltre, gli estratti proposti potrebbero essere potenzialmente inclusi in prodotti alimentari industrializzati grazie ai loro componenti naturali e al loro consumo sicuro (Gómez-Urios et al., 2022).

CAPITOLO 3.

Scopo della tesi

L'avocado è un frutto tropicale che ha conquistato un'importante fetta di mercato a livello mondiale, con possibilità di ulteriore accrescimento del suo consumo e utilizzo in futuro, successo questo dovuto alle sue caratteristiche nutrizionali che rispondono ai requisiti salutari in un alimento per il consumatore moderno.

L'avocado viene consumato sia fresco che in forma lavorata, ma l'imbrunimento enzimatico di cui è facilmente soggetto comporta un problema di decadimento qualitativo del prodotto con conseguente ritiro dal mercato. Questa alterazione è legata alla composizione chimica del frutto e ai processi a cui è sottoposto per essere destinato alla categoria di IV gamma.

L'obiettivo di questa sperimentazione è stato quello duplice: in primo luogo l'ottimizzazione dell'estrazione di polifenoli dalle bucce di avocado tramite l'utilizzo di solventi green e l'applicazione di ultrasuoni, e in secondo luogo l'utilizzo di tale estratto per il dipping di fette di avocado come strategia per ridurre l'imbrunimento durante lo stoccaggio.

CAPITOLO 4.

Materiali e Metodi

4.1 Materie prime

4.1.1 Farina di bucce di avocado

La farina di bucce di avocado è stata fornita da un partner colombiano che l'ha ottenuta tramite essicamento delle bucce fino al raggiungimento di un livello di umidità inferiore al 7%. La riduzione dimensionale è stata effettuata in un mulino domestico (Hamilton Beach, USA), fino al raggiungimento di una granulometria compresa tra 0,6 e 0,2 mm; ciascuna frazione è stata conservata in sacchetti con chiusura lampo, in un luogo privo di luce a 28 °C e trasportata presso lo Campus di Scienze degli Alimenti.

4.1.2 Avocado

16 frutti d'avocado della varietà Hass sono stati acquistati presso il supermercato Eurospin con sede a Pesaro cercando di scegliere frutti similari nella maturazione.

4.2 Preparazione dell'estratto fenolico

4.2.1 Solventi utilizzati

Per l'estrazione sono stati utilizzato 3 tipologie di NaDES e 2 di solventi normalmente utilizzati nelle estrazioni.

- NaDES citrico (NC): cloruro di colina (26%), acido citrico (50%) e acqua distillata (23%)
- NaDES glicerolo (NG): cloruro di colina (26%), glicerolo (34%) e acqua distillata (60%)
- NaDES lattico (NL): cloruro di colina (26%), acido lattico (33%) e acqua distillata (41 %)
- 80% etanolo/0,5% acido acetico (EtOH)
- 0,5% acido acetico (A)

Tutti i solventi sono stati caratterizzati per il valore di pH.

Commentato [ST1]: Bisognerebbe dargli i nomi che poi hanno nei risultati

Commentato [GG2R1]: Matteo correggi i nomi inserendo tra parentesi le sigle che usi dopo

Commentato [u3R1]:

Commentato [u4R1]:

Commentato [u5R1]:

4.2.2 Estrazione assistita da ultrasuoni

Per l'estrazione, esattamente circa1 grammo di polvere di buccia di avocado è stato miscelato con 25 mL di ogni solvente all'interno di Falcon. Per ogni solvente sono state preparati 3 repliche indipendenti.

Ad ognuno sono stati applicati gli ultrasuoni tramite un sonotrodo UP400S Hielscher ultrasonic device (ν = 24 kHz) (Hielscher Ultrasound Technology, Teltow, Germany) con una sonda di titanio da 7 mm con 80% di a ampiezza e potenza di 400 W, come mostrato in Figura 19.

Il trattamento è stato eseguito a 40°C per 10 min con ampiezza al 40 % e frequenza 45 kHz.

Figura 19 Sistema di estrazione ultrasuono termostatato

Dopodiché, i campioni sono stati sottoposti a centrifuga a 4000 rpm per 30 minuti, al fine di separare la frazione solida in sospensione dal surnatante. Il surnatante di ciascun campione è stato recuperato e trasferito in nuove provette Falcon, quindi filtrato mediante carta da filtro con diametro di 110 mm per rimuovere eventuali particelle residue. Ottenuto l'estratto le Falcon sono state coperte da un foglio d' alluminio per proteggerlo dalla foto ossidazione.

I campioni sono stati quindi conservati a temperatura ambiente in due condizioni: 4 settimane in al buio e successive 4 settimane al buio. Per ogni settimana, sempre nel medesimo giorno, si è misurato il contenuto dei polifenoli totali per valutarne la stabilità.

4.3 Applicazioni estratto su avocado di IV gamma

4.3.1 Preparazione dei campioni

I frutti di avocado sono stati denocciolati e sbucciati. Dopodiché, ogni frutto è stato tagliato in 4 quarti (fette), i quali sono stati utilizzati per applicare i trattamenti. Ogni fetta ha subito un trattamento diverso, sottoponendo ciascun frutto di avocado a tutti e 4 i trattamenti per avere un raffronto diretto sul loro effetto. Dunque, le fette ottenute sono state immerse per 5 minuti da un lato e per 5 minuti dall'altro lato nelle soluzioni selezionate come di seguito:

- NaDES Lattico (NL)
- Acido acetico (0.5%) (A)
- Estratto con NaDES Lattico (NLE)
- Estratto acido acetico (0.5%) (AE)

Questa procedura è stata applicata per tutti i 16 avocado così da avere un numero complessivo di fette (repliche) di 64 fette di avocado.

I campioni così ottenuti sono stati disposti in vaschette di alluminio che sono state conservate in ella frigorifera a 4°C per 7 giorni.

Durante lo stoccaggio, dopo 0, 1, 4 e 7 giorni, i campioni sono stati analizzati per colore tramite analisi d'immagine e contenuto totale in polifenoli.

4.4 Determinazioni analitiche

4.4.1 Colore

Per l'analisi del colore della farina e delle fette di avocado, è stato utilizzato colorimetro Hunter Lab ColorFlex 45/0, precedentemente tarato con una mattonella nera e una bianca. Tramite l'utilizzo di un illuminante (D65) e la scala di colore CIE-Lab, sono stati valutati i parametri L*, a* e b*.

4.4.2 Attività dell'acqua

L'attività dell'acqua della farina di buccia di avocado è stata misurata utilizzando un'ACQUA LAB *Water Activity Meter.* Q. Questo strumento sfrutta la tecnologia del punto di rugiada, utilizzando un sensore a specchio raffreddato, il quale rileva la temperatura alla quale il vapore acqueo condensa sulla superficie, correlandola all'umidità relativa in equilibrio con il campione.

4.4.3 pH

Il pH della farina è stato misurato diluendo 1 grammo di farina in 100 ml di acqua distillata e tramite un pHmetro (Easyfive Plus, Mettler Toledo, Columbus, USA).

4.4.4 Analisi dimensione delle particelle

La distribuzione granulometrica della farina è stata misurata con un analizzatore di dimensione delle particelle basato sulla diffusione della luce (Malvern 3000 Mastersizer, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, U.K.) equipaggiato con una cella di introduzione del campione (Hydro 3000 SV), dotata di agitatore per garantire la circolazione uniforme dei campioni attraverso l'analizzatore.

Una porzione rappresentativa del campione (5 g) è stata iniettata con aria come gas di trasporto. La granulometria è stata valutata mediante il parametro D90 (μm), che rappresenta il diametro delle

particelle corrispondente al 90% della distribuzione cumulativa e anche il D50 (μm) e D10 (μm) che rappresentano il diametro delle particelle corrispondente al 50% e 10% della distribuzione cumulativa.

4.4.5 Analisi di immagine

Le immagini sono state acquisite con una fotocamera D7000 (Nikon, Japan) equipaggiata con obiettivo da 105 mm (AF-S Micro Nikkor, Nikon, Japan) posizionata all'interno di una camera nera su sfondo nero, in condizioni di illuminazione controllata costituita da quattro lampade fluorescenti a luce diurna (TL-D Deluxe, Natural Daylight, 18 W/965, Philips, USA) con temperatura di colore pari a 6500 K (standard D65). I tubi fluorescenti, lunghi 60 cm, sono stati posizionati a 35 cm di distanza dal campione e inclinati con un angolo di 45°.

Per le foto di sono scelti i seguenti parametri:

- F/18
- Tempo di esposizione 1 secondo

Le immagini ottenute sono state successivamente elaborate mediante il software ImageJ (National Institutes of Health, USA).

4.4.6 Contenuto di fenoli totali (TPC)

Il contenuto fenolico totale è stato determinato mediante il metodo colorimetrico di Folin-Ciocalteu. Per l'analisi, 0,1 mL di campione (estratto) è stato trasferito in una provetta. Quindi aggiunti 0,1 mL di reattivo di Folin-Ciocalteu (2 N) e 2,8 mL di soluzione di carbonato di sodio (8%). Il volume è stato portato a 10 mL con acqua distillata e la soluzione è stata incubata al buio per 30 minuti a temperatura ambiente. I campioni sono stati quindi centrifugati a 6000 rpm per 2. L'assorbanza è stata misurata a 765 nm mediante spettrofotometro UV (modello 1601, Shimadzu). Il contenuto fenolico totale è stato espresso come mg di equivalenti di acido gallico (GAE) per grammo di campione, utilizzando una curva di calibrazione costruita con soluzioni standard di acido gallico a concentrazioni comprese tra 0 e 20 ppm (0, 2, 5, 7,5, 10, 15 e 20 ppm). Il bianco è stato preparato nel medesimo modo ma senza estratto (Figura 22).

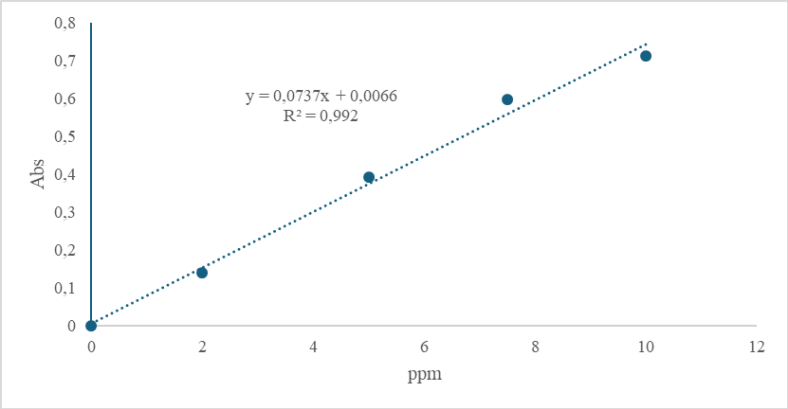


Figura 20 Retta di calibrazione per TPC a diverse concentrazioni (ppm9 di acido gallico.

I valori di assorbanza ottenuti sono stati trasformati in ppm di acido gallico equivalente tramite la seguente formula:

$$ppm = \frac{(abs - q)}{m}$$

Dove m e q sono valori ricavati dalla retta di calibrazione ottenuta con soluzione di acido gallico.

Gli equivalenti di acido gallico (mg GAE / g secco) sono stati ottenuti secondo la seguente formula:

$$mg\ GAE/_{g\ secco} = ppm\ EF\ DF\ CF$$

Dove EF è il coefficiente di estrazione (volume estrazione/massa campione), DF è il fattore di diluizione (volume estratto/volume finale reazione) e CF è il fattore di conversione da (mg/Kg a mg/g).

CAPITOLO 5

Risultati e Discussione

5.1 Stabilità dell'Estratto

I valori di pH prima e dopo l'estrazione sono riportati in tabella 3. Eccetto il NaDES formulato con il glicerolo tutti i solventi hanno riportato un pH fortemente acido, in particolar modo il NaDES a base di citrico e lattico. In seguito ad estrazione, il pH degli estratti ha visto un leggero incremento dovuto probabilmente alla natura leggermente acida dei fenoli estratti. Infatti, proprio per questo il NaDES a base glicerolo con pH leggermente alcalino (8.10) ha visto un netto abbassamento intorno a pH 5.12, ad evidenziare il comportamento debolmente acido dell'estratto.

Tabella 3 Valori di pH con media e deviazione standard dei NaDES e solventi pre e post estrazione

Solvente	Pre-Estrazione (media + SD)	Post-Estrazione (media + SD)
Nades citrico	0,35 ± 0,012	0,45 ± 0,061
Nades lattico	1,02 ± 0,015	1,13 ± 0,031
Nades Glicerolo	8,10 ± 0,129	5,12 ± 0,110
H2O con 0,5% Acido Acetico	2,95 ± 0,021	3,93 ± 0,055
Etanolo con 0,5% Acido Acetico	4,11 ± 0,031	5,20 ± 0,060

Il grafico 21 mostra l'andamento del contenuto fenolico totale (TPC) degli estratti durante 4 settimane di conservazione in assenza di luce. In generale, i valori di TPC rimangono relativamente stabili nel tempo, indicando una buona stabilità dei composti fenolici nelle condizioni di stoccaggio adottate.
Tra i diversi trattamenti, NLE presenta costantemente i valori più elevati di TPC durante tutto il periodo di conservazione, seguito da NGE. Gli estratti NCE, A ed EtOH mostrano invece valori progressivamente più bassi. In particolare, EtOH risulta il solvente meno efficace, con il contenuto fenolico più ridotto in tutte le settimane considerate.
Nel corso dello stoccaggio si osservano lievi fluttuazioni nei valori di TPC, ma senza variazioni drastiche, suggerendo che l'assenza di luce contribuisce a preservare i composti fenolici. Complessivamente, i risultati indicano che i solventi NaDES (NLE e NGE) consentono una maggiore estrazione e stabilità dei composti fenolici rispetto ai solventi convenzionali (Grisales Mejia et al., 2024; Del Castillo Llamosas et al., 2023).

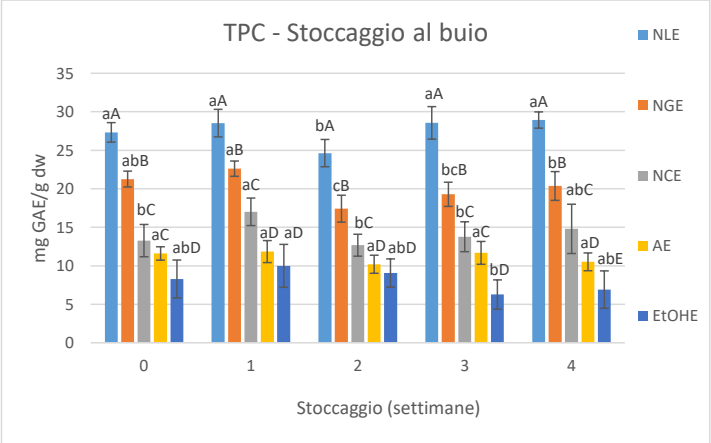


Figura 21 Valori del contenuto fenolico totale (mg GAE/g di peso secco) dei vori NaDES e solventi con estratti durante il periodo di 4 settimane di stoccaggio a temperatura ambiente e al buio

Durante le successive quattro settimane di conservazione in presenza di luce, si osserva una maggiore variabilità nei valori di TPC rispetto alla fase precedente. In generale, tutti i trattamenti mostrano lievi fluttuazioni nel contenuto fenolico, suggerendo che l'esposizione alla luce possa influenzare la stabilità dei composti fenolici.

Anche in queste condizioni, NLE mantiene i valori di TPC più elevati per tutto il periodo di conservazione, seguito da NGE, confermando la maggiore efficienza dei solventi NaDES nell'estrazione e nella conservazione dei composti fenolici. Gli estratti NCE mostrano valori intermedi, mentre EtOH e H_2O presentano i livelli più bassi.

Nel corso dello stoccaggio non si osserva una diminuzione progressiva e costante del TPC, ma piuttosto oscillazioni tra le settimane, probabilmente dovute sia alla variabilità analitica sia a possibili fenomeni di degradazione e trasformazione dei composti fenolici indotti dalla luce (Karimah et al., 2026). Nel complesso, i risultati suggeriscono che l'esposizione alla luce può ridurre parzialmente la stabilità dei fenoli, pur mantenendo una chiara differenza tra le prestazioni dei diversi solventi (Karimah et al., 2026).

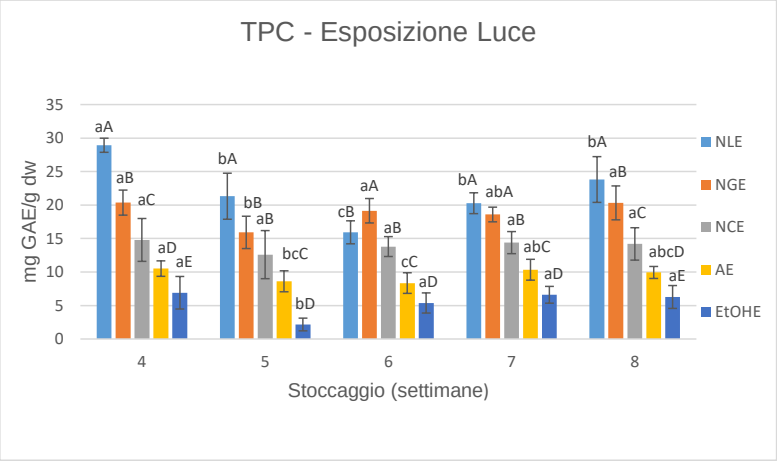


Figura 22 Valori relativi al contenuto fenolico totale (mg GAE/g di peso secco) dei vari NaDES e solventi con estratti durante un periodo di stoccaggio di 4 settimane a temperatura ambiente e a contatto con la luce

In tabella 4 è riportato il profilo dei principali composti fenolici determinati mediante HPLC nel campione controllo (AE) e nel miglior estratto ottenuto con NLE, analizzati all'inizio dello stoccaggio (t0) e al termine del periodo di conservazione (tf).

In generale, i risultati mostrano che l'estratto NLE presenta concentrazioni nettamente più elevate di tutti i composti fenolici rispetto al controllo acquoso, confermando la maggiore efficacia del solvente NaDES nell'estrazione dei polifenoli dalla matrice. Tra i composti identificati, epicatechina risulta il composto più abbondante, con valori pari a 1652 µg/kg a t0 che diminuiscono moderatamente fino a 1548 µg/kg a tf. Anche catechina, acido caffeico, luteolina e quercetina mostrano concentrazioni elevate nell'estratto NLE rispetto al controllo con calori in linea con la lettura (Rodríguez-Martínez et al 2022).

Durante lo stoccaggio si osserva in generale una lieve diminuzione della concentrazione dei composti fenolici in entrambi i campioni. Tuttavia, la riduzione appare più contenuta nell'estratto NLE rispetto al controllo in acqua, suggerendo una maggiore stabilità dei composti fenolici nel sistema NaDES. Questo comportamento potrebbe essere attribuito alla capacità dei NaDES di stabilizzare le molecole fenoliche attraverso interazioni intermolecolari, riducendo fenomeni di degradazione ossidativa durante la conservazione (Gómez-Urios et al., 2022).

Complessivamente, l'analisi HPLC conferma quanto osservato nei risultati del TPC, evidenziando che l'estratto NLE non solo consente una maggiore estrazione dei composti fenolici, ma contribuisce anche a preservarne la stabilità durante lo stoccaggio.

Tabella 4 Quantificazione e identificazione dei composti fenolici mediante HPLC/DAD (ug/Kg di estratto) presenti negli estratti ottenuti con NaDES acido lattico e con acqua con lo 0,5% di acido acetico

	AE (t0)	AE (tf)	NLE (t0)	NLE (tf)
Catechina	56±0,23	45±0,16	280±2,01	265±3,21
Epicatechina	450±0,15	356±1,5	1652±1,56	1548±1,89
Acido Caffeico	156±0,65	112±0,65	410±5,21	375±4,32
Acido Vanillico	0,15±0,02	0,05±0,15	20±1,26	19,5±1,89
Luteolina	58±0,82	46±0,15	380±3,26	286±1,78
Acido p-idrossibenzoico	123±1,03	105±1,23	326±5,24	318±1,78
Quercetina	256±1,25	226±1,15	652±2,59	589±1,58
Naringenina	23±0,25	18±1,32	215±2,18	198±4,23
Rutina	26±0,15	15±1,15	165±1,56	135±2,56

* AE acqua con 0,5% di acido acetico; NLE NaDES con acido lattico + estratto della farina buccia avocado; t0 tempo zero acqua con 0,5% con estratto; tf tempo finale; TF tempo finale NaDES lattico; T0 tempo zero NaDES lattico

5.2 Applicazione su avocado di IV gamma

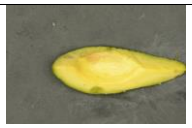
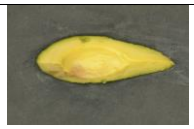
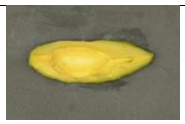
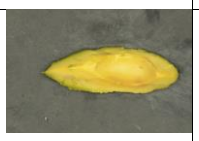
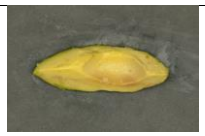
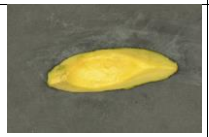
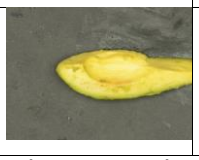
Nelle tabelle 5 sono riportati i valori medi di L*, a* e b*.

Tabella 5 Valori medi con deviazione standard di L, a* e b* delle fette di avocado trattate misurati tramite colorimetro nei 4 giorni stabiliti nel piano sperimentale*

Trattamenti	t0			t1		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
NL	51.6	-6.5±0.8	44.1±8.7	52.3	-5.7±0.6	40.3±3.1
A	53.1	-7.9±0.8	43.2±1.4	55.8	-6.7±2.4	42.2±0.8
AE	58.2	-8.0±0.3	39.6±3.5	54	-6.3±1.7	37.1±5.4
NLE	56.6	-7.4±0.7	40.9±5.1	58.3	-4.7±2.2	44.2±1.3

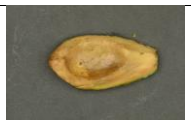
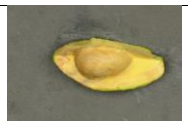
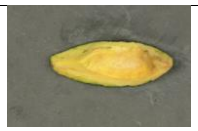
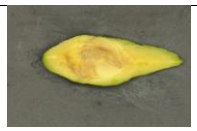
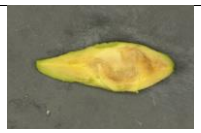
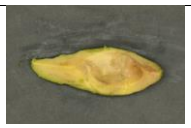
	t4			t7		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*
NL	47.9	-5.5±0.2	41.0±1.4	45.1	-3.2±0.1	35.5±3.7
A	44.4	-4.2±3.9	32.6±1.1	47.5	-2.5±2.7	36.8±2.4
AE	46.1	-2.3±3.7	34.9±2.5	46.8	-0.9±3.0	34.6±5.2
NLE	52.5	-2.2±2.8	37.5±2.6	51.5	-0.3±2.4	35.1±1.9

Tabella 6 Immagini CVS delle fette d'avocado trattate con NaDES acido lattico nei 4 giorni di stoccaggio

	0 giorno	1 giorno	4 giorno	7 giorno
1				
2				
3				
4				

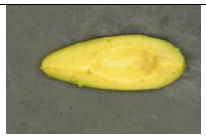
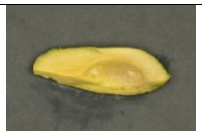
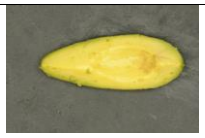
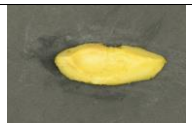
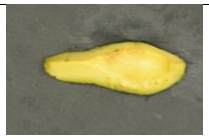
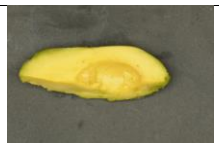
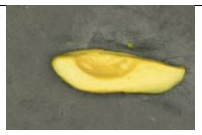
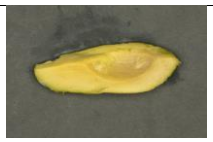
*1 fetta numero uno; 2 fetta numero due; 3 fetta numero tre; 4 fetta numero quattro

Tabella 7 Immagini tramite CVS delle fette d'avocado trattate con acqua al 0,5% di acido acetico nei 4 di stoccaggio

	0 giorno	1 giorno	4 giorno	7 giorno
1				
2				
3				
4				

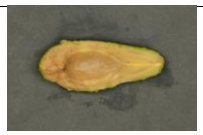
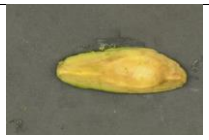
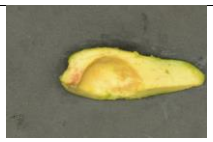
*1 fetta numero uno; 2 fetta numero due; 3 fetta numero tre; 4 fetta numero quattro

Tabella 8 Immagini tramite CVS delle fette d'avocado con NaDES lattico + estratto nei 4 giorni di stoccaggio

	0 giorno	1 giorno	4 giorno	7 giorno
1				
2				
3				
4				

*1 fetta numero uno; 2 fetta numero due; 3 fetta numero tre; 4 fetta numero quattro

Tabella 9 immagini tramite CVS delle fette d'avocado con acqua con acido acetico 0,5% + estratto nei 4 giorni di stoccaggio

	0 giorno	1 giorno	4 giorno	7 giorno
1				
2				
3				
4				

1 fetta numero uno; 2 fetta numero due; 3 fetta numero tre; 4 fetta numero quattro

L'efficacia dell'estratto come agente anti-imbrunimento è stata valutata monitorando l'evoluzione dei parametri di colore durante la conservazione, in particolare a* (figura 23), ΔE (figura 24) e browning area (BA) (figura 25).

Per quanto riguarda l'indice a*, che descrive la componente rosso–verde del colore, tutti i campioni presentano valori iniziali negativi, coerenti con la tonalità verde tipica dell'avocado fresco. Durante lo stoccaggio, i campioni (A) e (AE) mostrano un progressivo aumento di questo parametro, che diventa positivo già a partire dal giorno 4 e aumenta ulteriormente al giorno 7. Questo andamento indica una perdita delle tonalità verdi e la comparsa di sfumature rosso-brune associate all'imbrunimento. Al contrario, i trattamenti (NL) e (NLE) mantengono valori di a* sempre negativi durante tutto il periodo di conservazione, evidenziando una maggiore stabilità del colore e una minore evoluzione verso tonalità brune.

Un comportamento analogo emerge analizzando la variazione totale di colore (ΔE). Nei campioni (A) e (AE) si osserva un aumento marcato di ΔE già dal primo giorno di conservazione, con valori che diventano particolarmente elevati ai giorni 4 e 7, indicando un evidente cambiamento cromatico rispetto alla condizione iniziale. Al contrario, i trattamenti (NL) e (NLE) mostrano valori di ΔE significativamente più contenuti durante tutto lo stoccaggio, suggerendo una maggiore capacità di preservare l'aspetto visivo del prodotto.

Questi risultati sono confermati anche dall'analisi della browning area (BA), che rappresenta una misura diretta della superficie interessata dall'imbrunimento. Nei campioni (A) e (AE) l'area imbrunita aumenta progressivamente nel tempo, raggiungendo valori elevati ai giorni 4 e 7. Al contrario, nei campioni (NL) e (NLE) la percentuale di superficie imbrunita rimane prossima allo zero per tutto il periodo di conservazione, indicando un controllo molto efficace del fenomeno di browning.

È interessante osservare che l'aggiunta dell'estratto fenolico non determina un peggioramento dell'imbrunimento nei campioni (NLE). In teoria, infatti, l'introduzione di composti fenolici potrebbe favorire le reazioni di imbrunimento enzimatico, poiché tali molecole rappresentano i substrati dell'enzima polifenolossidasi (PPO), responsabile della formazione dei pigmenti bruni. Tuttavia, nei sistemi (NL) E (NLE) questo effetto non è osservato, suggerendo che il mezzo NaDES a base di acido lattico sia in grado di limitare o bloccare la reazione di ossidazione fenolica. Questo comportamento potrebbe essere attribuito alla forte acidità del sistema e alle specifiche interazioni intermolecolari

tipiche dei NaDES, che possono ridurre l'attività enzimatica o la disponibilità dei substrati per la reazione ossidativa (Dai et al., 2013).

Nel complesso, i risultati evidenziano come i trattamenti basati sul sistema NaDES a base di acido lattico, (NL) e (NLE), siano molto più efficaci nel limitare l'imbrunimento dell'avocado fresco tagliato rispetto ai trattamenti (A) e (AE). Inoltre, all'interno di ciascun sistema solvente, l'aggiunta dell'estratto non sembra determinare differenze sostanziali nel comportamento cromatico dei campioni, poiché (A) e (AE) mostrano andamenti simili tra loro, così come (NL) (NLE). Questi risultati suggeriscono che l'effetto anti-imbrunimento osservato sia principalmente attribuibile alle proprietà del mezzo NaDES, che sembra essere in grado di inibire efficacemente i meccanismi responsabili dell'imbrunimento enzimatico (Dai et al., 2013).

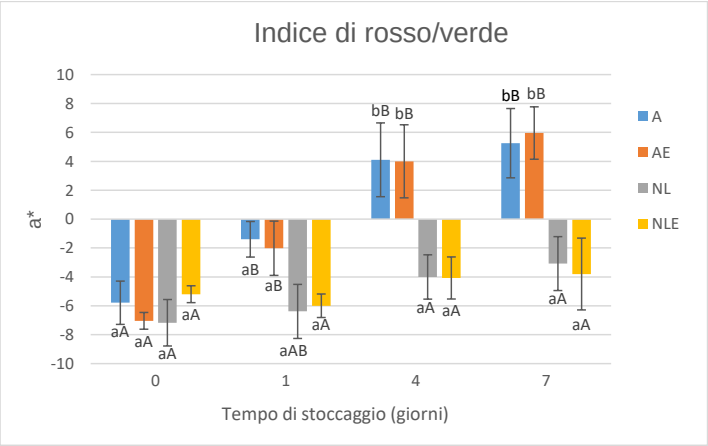


Figura 23 Valori indice di rosso/verde delle fette di avocado durante lo stoccaggio

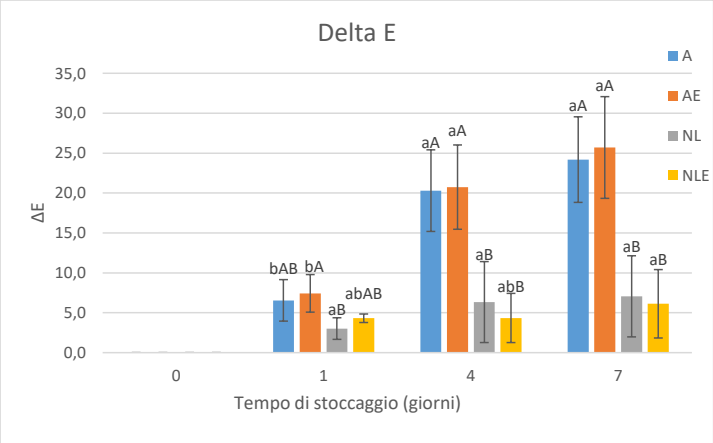


Figura 24 Differenza di colore (ΔE) dei campioni trattati con acqua (A), estratto acquoso (AE), NaDES a base di acido lattico (NL) ed estratto in NaDES a base di acido lattico (NLE) durante lo stoccaggio

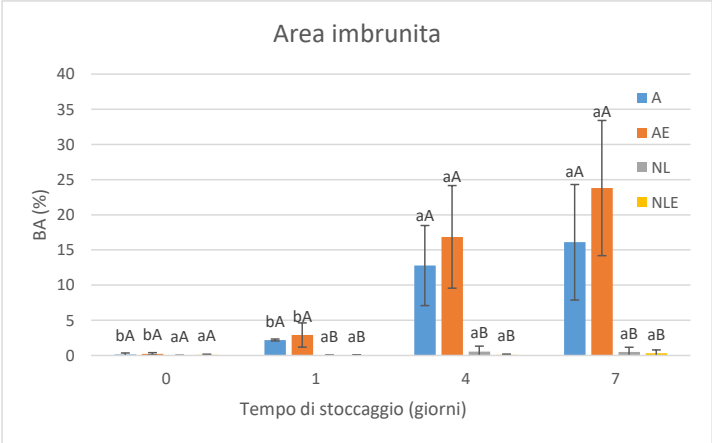


Figura 25 Incidenza delle aree imbrunite (%) nelle fette di avocado trattate durante lo stoccaggio

Per completare la valutazione dell'efficacia dei trattamenti, è stato inoltre determinato il contenuto fenolico totale recuperato dalle fette di avocado durante lo stoccaggio. I risultati mostrano differenze evidenti tra i diversi sistemi di trattamento.

In generale, i campioni trattati con il sistema NaDES a base di acido lattico (NL) e soprattutto (NLE), mostrano valori di fenoli recuperati più elevati rispetto ai trattamenti (A) e (AE) durante tutto il periodo di conservazione. In particolare, NLE presenta i valori più alti già dal giorno 1 e mostra un

ulteriore aumento fino al giorno 7, indicando una maggiore presenza o disponibilità di composti fenolici nella matrice.

Questo comportamento può essere spiegato considerando che il sistema NaDES è in grado di veicolare e mantenere più efficacemente i composti fenolici sulla superficie del tessuto vegetale, favorendone la stabilità e la permanenza durante lo stoccaggio (Vieira et al., 2022). Al contrario, nei campioni (A) e (AE) il contenuto fenolico rimane più basso e mostra variazioni più limitate nel tempo. È interessante notare che l'aumento dei fenoli nei campioni (NL) e (NLE) non è accompagnato da un incremento dell'imbrunimento, come evidenziato dai risultati relativi a a*, ΔE e browning area. In condizioni normali, infatti, una maggiore disponibilità di composti fenolici potrebbe favorire le reazioni di imbrunimento enzimatico, poiché tali molecole rappresentano i substrati dell'enzima polifenolossidasi. Tuttavia, nei campioni trattati con NaDES, l'imbrunimento rimane molto limitato, suggerendo che il sistema solvente sia in grado di inibire o rallentare la reazione ossidativa, pur in presenza di concentrazioni più elevate di substrati fenolici.

Nel complesso, questi risultati indicano che il sistema (NLE) non solo contribuisce a limitare efficacemente l'imbrunimento dell'avocado fresco tagliato, ma permette anche di mantenere o addirittura aumentare il contenuto di composti fenolici nel prodotto durante la conservazione. Questo aspetto è particolarmente interessante dal punto di vista nutrizionale e funzionale, poiché i composti fenolici sono associati a proprietà antiossidanti e potenziali benefici per la salute.

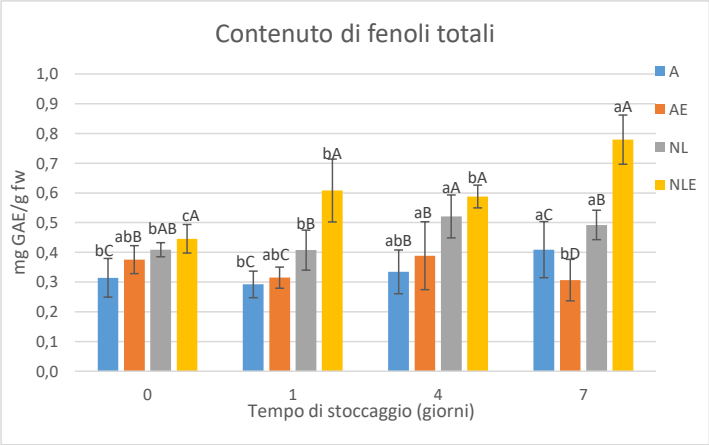


Figura 26 Valori contenuto fenolico totale nelle fette di avocado trattate durante lo stoccaggio

6. **Conclusioni**

Nella presente sperimentazione, diversi solventi sono stati comparati per l'estrazione di polifenoli dalla farina di avocado. Dai risultati ottenuti, è emerso che l'utilizzo del NaDES composto da acido lattico e cloruro di colina, combinato all'utilizzo degli ultrasuoni, ha permesso di massimizzare tale estrazione rispetto ad altri NaDES e altri solventi tradizionalmente utilizzati.

Inoltre, l'estratto ottenuto, utilizzato come dipping per le fette di avocado ha mostrato di apportare significativi miglioramenti della qualità del prodotto durante lo stoccaggio refrigerato. In particolare, l'applicazione dell'estratto ha permesso di ridurre l'imbrunimento enzimatico, misurato tramite analisi d'immagine, permettendo di prolungare la shelf life ed aumentare il contenuto di polifenoli totali del prodotto.

Sviluppi futuri potrebbero riguardare in confronto con altre soluzioni anti-imbrunimento e la valutazione di un possibile effetto antimicrobico dell'estratto stesso.

Bibliografia

- Aguilera, J. M. (2003). Solid-liquid extraction. In *Extraction optimization in food engineering* (pp. 51-70). CRC Press.
- Amato Martina. Studio sperimentale della liofilizzazione atmosferica di prodotti alimentari con ultrasuoni, Tesi di Laurea Magistrale, Politecnico di Torino, 2017, 9-11.
- Ayala Silva, T., & Ledesma, N. (2014). Avocado history, biodiversity and production. In Sustainable horticultural systems: Issues, technology and innovation (pp. 157-205). Cham: Springer International Publishing.
- Araújo, RG, Rodriguez-Jasso, RM, Ruiz, HA, Pintado, MME e Aguilar, CN (2018). Sottoprodotti dell'avocado: proprietà nutrizionali e funzionali. Tendenze nelle scienze e tecnologie alimentari, 80, 51-60.
- Azmir, J., Zaidul, ISM, Rahman, MM, Sharif, KM, Mohamed, A., Sahena, F., ... e Omar, AK (2013). Tecniche per l'estrazione di composti bioattivi da materiali vegetali: una revisione. Journal of food engineering, 117 (4), 426-436.
- Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M., & Velić, D. (2007). Studio della cinetica di estrazione solido-liquido dei polifenoli totali dai semi d'uva. Journal of food engineering, 81 (1), 236-242.
- Bucić-Kojić, A., Sovová, H., Planinić, M., & Tomas, S. (2013). Temperature-dependent kinetics of grape seed phenolic compounds extraction: Experiment and model. Food chemistry, 136(3-4), 1136-1140.
- Colelli G., Inglese P., Gestione della qualità e conservazione dei prodotti ortofrutticoli. Bologna. Edagricole (2020).
- 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.
- Del-Castillo-Llamosas, A., Rodríguez-Rebelo, F., Rodríguez-Martínez, B., Mallo-Fraga, A., Del-Río, PG, & Gullón, B. (2023). Valorizzazione degli scarti dei semi di avocado per il recupero dei composti fenolici antiossidanti e dei carboidrati utilizzando solventi eutettici profondi (DES). Antiossidanti, 12 (6), 1156.
- Dreher, M. L., & Davenport, A. J. (2013). Hass avocado composition and potential health effects. Critical reviews in food science and nutrition, 53(7), 738-750.
- Esclapez, MD, García-Pérez, JV, Mulet, A., & Cárcel, JA (2011). Estrazione assistita da ultrasuoni di prodotti naturali. Food Engineering Reviews, 3 (2), 108-120.

- Fan, S., Qi, Y., Shi, L., Giovani, M., Zaki, NAA, Guo, S., & Suleria, HAR (2022). Screening dei composti fenolici nell'avocado rifiutato è determinazione del loro potenziale antiossidante. Processi, 10 (9), 1747.
- Flores, M., Saravia, C., Vergara, C. E., Avila, F., Valdés, H., & Ortiz-Viedma, J. (2019). Avocado oil: Characteristics, properties, and applications. Molecules, 24(11), 2172.
- Ford, NA, Spagnuolo, P., Kraft, J., & Bauer, E. (2023). Composizione nutrizionale della polpa di avocado Hass. Foods, 12 (13), 2516.
- Garcia-Vaquero, M., Rajauria, G. e Tiwari, B. (2020). Tecniche di estrazione convenzionali: estrazione con solvente. In Sustainable seaweed technologies (pp. 171-189). Elsevier.
- García-Vargas, M. C., Contreras, M. D. M., & Castro, E. (2020). Avocado-derived biomass as a source of bioenergy and bioproducts. Applied Sciences, 10(22), 8195.
- García-Vargas, M. C., Contreras, M. D. M., Gómez-Cruz, I., Romero-García, J. M., & Castro, E. (2020, November). Avocado-derived biomass: Chemical composition and antioxidant potential. In Proceedings (Vol. 70, No. 1, p. 100). MDPI
- Gharat, N. N., & Rathod, V. K. (2023). Extraction of ferulic acid from rice bran using NADES-ultrasound-assisted extraction: Kinetics and optimization. Journal of Food Process Engineering, 46(6), e14158.
- Grisales-Mejia, JF, Cedeno-Fierro, V., Ortega, JP, Torres-Castaneda, HG, Andrade-Mahecha, MM, Martínez-Correa, HA, ... e Ibanez, E. (2024). Processi di estrazione avanzati basati su NADES per il recupero di composti fenolici dai residui di avocado Hass: una strategia di valorizzazione sostenibile. Separation and Purification Technology, 351, 128104.
- Gómez-Urios, C., Viñas-Ospino, A., Puchades-Colera, P., López-Malo, D., Frígola, A., Esteve, M. J., & Blesa, J. (2022). Sustainable development and storage stability of orange by-products extract using natural deep eutectic solvents. Foods, 11(16), 2457.
- Häckl, K., & Kunz, W. (2018). Some aspects of green solvents. Comptes Rendus Chimie, 21(6), 572-580.
- Hessel, V., Tran, NN, Asrami, MR, Tran, QD, Long, NVD, Escribà-Gelonch, M., & Sundmacher, K. (2022). Sostenibilità dei solventi verdi: revisione e prospettiva. Chimica verde, 24 (2), 410-437.
- Huang, KM, Guan, Z., Blare, T. e Hammami, AM (2023). Boom globale dell'avocado. Choices, 38 (4), 1-9.
- Huang, HW, Hsu, CP, Yang, BB e Wang, CY (2013). Progressi nell'estrazione di ingredienti naturali mediante tecnologia di estrazione ad alta pressione. Trends in Food Science & Technology, 33 (1), 54-62.

- Jiménez-Trigo, V., Fernández-Ochoa, Á., de la Luz Cádiz-Gurrea, M., Leyva-Jiménez, FJ, Segura-Carretero, A., & Arráez-Román, D. (2025). Tendenze attuali nella riduzione del deterioramento della frutta dovuto all'imbrunimento enzimatico mediante tecniche fisiche: polpa di avocado come caso di studio. Recensioni alimentari internazionali, 41 (9), 3142-3164.
- Karimah, AU, Sayuti, K., Novelina, N. e Syukri, D. (2026). Valutazione integrata di NADES per l'estrazione verde di composti bioattivi dalle fragole: uno studio su antocianine, attività antiossidante, profilazione chemiometrica FTIR. Trends in Sciences, 23 (2), 11388-11388.
- Lyu, X., Agar, OT, Barrow, CJ, Dunshea, FR e Suleria, HA (2023). Profilo dei composti fenolici e loro capacità antiossidante nella buccia, nella polpa e nel seme di avocado coltivato in Australia. Antiossidanti, 12 (1), 185.
- Marić, M., Grassino, A. N., Zhu, Z., Barba, F. J., Brnčić, M., & Brnčić, S. R. (2018). An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from plant food wastes and by-products: Ultrasound-, microwaves-, and enzyme-assisted extraction. Trends in food science & technology, 76, 28-37.
- Martins, K. P., Hernandez Brito, N. L., Costa, G. B., Silva Ramos, J., Silvestre Barbosa Alessi, A. C., Santos, T. A., ... & Reitz Cardoso, F. A. (2025). Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) in Food Systems: Emerging Applications, Extraction Efficiency, Safety Concerns, and Regulatory Challenges. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 73(52), 32982-32994.
- Mehariya, S., Fratini, F., Lavecchia, R., & Zuorro, A. (2021). Green extraction of value-added compounds form microalgae: A short review on natural deep eutectic solvents (NaDES) and related pre-treatments. Journal of Environmental Chemical Engineering, 9(5), 105989.
- Moon, KM, Kwon, EB, Lee, B. e Kim, CY (2020). Tendenze recenti nel controllo dell'imbrunimento enzimatico di prodotti ortofrutticoli. Molecules, 25 (12), 2754.
- Morgana, N. M., Magdalena, E., de los Angeles Fernandez, M., & Fernanda, S. M. (2022). NADES for food industry innovation: Novel bioadditives based on olive oil byproducts. Food and Bioproducts Processing, 134, 193-201
- Naviglio, D., & Ferrara, L. (2008). Tecniche estrattive solido-liquido. Teoria e pratica. Aracne editrice, Roma, Italy.
- Nyakang'i, CO, Ebere, R., Marete, E., & Arimi, JM (2023). Produzione di avocado in Kenya in relazione al mondo, funzionalità e utilizzo dei sottoprodotti dell'avocado (semi e bucce) nei prodotti alimentari. Applied Food Research, 3 (1), 100275.

- Oreopoulou, A., Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2019). Extraction of polyphenols from aromatic and medicinal plants: an overview of the methods and the effect of extraction parameters. Polyphenols in plants, 243-259.
- Pico, Y. (2013). Estrazione assistita da ultrasuoni per campioni alimentari e ambientali. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 43, 84-99.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A. S., & Chemat, F. (2013). Ultrasound-assisted extraction.
- Pedreschi, R., Uarrota, V., Fuentealba, C., Alvaro, J. E., Olmedo, P., Defilippi, B. G., ... & Campos-Vargas, R. (2019). Primary metabolism in avocado fruit. Frontiers in plant science, 10, 795.
- Popovic, B. M., Micic, N., Potkonjak, A., Blagojevic, B., Pavlovic, K., Milanov, D., & Juric, T. (2022). Novel extraction of polyphenols from sour cherry pomace using natural deep eutectic solvents–Ultrafast microwave-assisted NaDES preparation and extraction. Food Chemistry, 366, 130562.
- Prado, J. M., Vardanega, R., Debien, I. C., Meireles, M. A. A., Gerschenson, L. N., Sowbhagya, H. B., & Chemat, S. (2021). Conventional extraction. In Food waste recovery (pp. 109-127). Academic Press.
- Rao, R. V., Pawar, P. J., & Davim, J. P. (2010). Parameter optimization of ultrasonic machining process using nontraditional optimization algorithms. Materials and Manufacturing Processes, 25(10), 1120-1130.
- Rodríguez-Martínez, B., Ferreira-Santos, P., Alfonso, IM, Martínez, S., Genisheva, Z. e Gullón, B. (2022). Solventi eutettici profondi come strumento ecologico per l'estrazione di composti fenolici bioattivi dalle bucce di avocado. Molecules, 27 (19), 6646.
- Rosero, J. C., Cruz, S., Osorio, C., & Hurtado, N. (2019). Analysis of phenolic composition of byproducts (seeds and peels) of avocado (Persea Americana Mill.) cultivated in Colombia. Molecules, 24(17), 3209.
- Santos-Buelga, C., Gonzalez-Manzano, S., Dueñas, M., & Gonzalez-Paramas, A. M. (2012). Extraction and isolation of phenolic compounds. Natural products isolation, 427-464.
- Seymour, GB, e Tucker, GA (1993). Avocado. In Biochimica della maturazione dei frutti (pp. 53-81). Dordrecht: Springer Paesi Bassi.
- Singh, B., Suri, K., Shevkani, K., Kaur, A., Kaur, A., & Singh, N. (2018). Imbrunimento enzimatico di frutta e verdura: una revisione. Enzimi nella tecnologia alimentare: miglioramenti e innovazioni, 63-78.

- Soliva, RC, Elez, P., Sebastián, M., & Martín, O. (2000). Valutazione dell'effetto di imbrunimento sulla purea di avocado conservata con metodi combinati. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 1 (4), 261-268.
- Sridhar, A., Ponnuchamy, M., Kumar, P. S., Kapoor, A., VO, D. V. N., & Prabhakar, S. (2021). Techniques and modeling of polyphenol extraction from food: A review. Environmental Chemistry Letters, 19(4), 3409-3443.
- Takenaga, F., Matsuyama, K., Abe, S., Torii, Y., & Itoh, S. (2008). Composizione di lipidi e acidi grassi del mesocarpo e dei semi di frutti di avocado raccolti nell'area settentrionale del Giappone. Journal of Oleo Science, 57 (11), 591-597
- Tiwari, BK (2015). Ultrasuoni: una tecnologia di estrazione pulita ed ecologica. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 71, 100-109.
- Vieira, C., Rebocho, S., Craveiro, R., Paiva, A. e Duarte, ARC (2022). Estrazione selettiva e stabilizzazione di composti bioattivi dalle foglie di rosmarino utilizzando un NADES bifasico. Frontiers in Chemistry, 10, 954835.