



UNIONE EUROPEA
Fondo Europeo Agricolo
per lo Sviluppo Rurale



Regione Emilia-Romagna

L'Europa investe nelle zone rurali

AVVISI PUBBLICI REGIONALI DI ATTUAZIONE PER L'ANNO 2016 DEL TIPO DI OPERAZIONE 16.1.01 "GRUPPI OPERATIVI DEL PEI PER LA PRODUTTIVITÀ E LA SOSTENIBILITÀ DELL'AGRICOLTURA"

Focus area 4A, 5C, 5D e 5E DGR N. 2376 DEL 21 DICEMBRE 2016

RELAZIONE TECNICA FINALE

DOMANDA DI SOSTEGNO 5015191

DOMANDA DI PAGAMENTO 5209200

FOCUS AREA: 5C

Titolo Piano	Biomolecole dalla valorizzazione integrata di sottoprodotti agroalimentari per applicazioni sostenibili con finalità fitosanitarie, alimentari ed energetiche.
Ragione sociale del proponente (soggetto mandatario)	ASTRA INNOVAZIONE E SVILUPPO SRL. Sede: via Tebano, 45 - 48018 - Faenza (RA). P.IVA e C.F. e N. iscrizione anagrafe 01079650394
Elenco partner del gruppo operativo	CRPV ASTRA UNIFE CAVIRO CAB Brisighellese CONSERVE ITALIA Az. Agr. Bartolozzi Loris Az. Agr. Mengozzi Lucio Az. Agr. Spada Franco

Durata originariamente prevista del progetto (in mesi)	36
Data inizio attività	10 aprile 2017
Data termine attività (incluse eventuali proroghe già concesse)	31 dicembre 2020

Relazione relativa al periodo di attività dal	10 aprile 2017	31 dicembre 2020
Data rilascio relazione		

Autore della relazione	Maria Grazia Tommasini		
Telefono		email	mgtommasini@crpv.it

1 Descrizione dello stato di avanzamento del Piano

Il Gruppo Operativo ha dato avvio alle attività complessivamente previste nel piano a partire dal 10 aprile 2017 al fine di poter raccogliere le matrici organiche delle industrie agroalimentari coinvolte nel Gruppo operativo durante la campagna agraria 2017. In generale tutte le attività sono state svolte seguendo i protocolli presentati nel piano. Lo slittamento nell'attivazione di alcune attività è stato in generale recuperato nel corso dei primi 5 mesi del 2018. Grazie alla proroga di 130 giorni richiesta con PEC in data 18.05.2020, che ha permesso posticipare la chiusura del progetto al 31 dicembre 2020, tutte le attività sono state regolarmente completate.

In sintesi:

- L'azione 1 è stata realizzata come previsto seguendo i percorsi e utilizzando i diversi strumenti indicati nel piano.
- Non era prevista, e non è stata svolta alcuna attività nell'Azione2.
- L'azione 3 è stata realizzata e completata senza sostanziali scostamenti rispetto a quanto previsto nel Piano. In generale tutte le prove dell'azione 3 nelle sottoazioni 1, 2 e 3 sono state infatti sviluppate conformemente a quanto previsto nel piano. I risultati sono significativi e permettono di fornire importanti indicazioni circa lo sfruttamento di scarti dell'industria agroalimentare per l'impiego in comparti diversi che vanno dall'uso per ambiti fitoiatrici (ad esempio per azione di contenimento di *Drosophila suzukii* in ambiente controllato che dovrà essere ulteriormente validato in campo), al settore alimentare, fino a impieghi energetici. Questo a partire dalla messa a punto di un protocollo operativo di estrazione da adottare a livello aziendale per ogni sottoprodotto risultato utile all'ottenimento di estratti/biomolecole efficaci esportabile anche in altri contesti come quello fitosanitario e alimentare.
- L'azione 4 sulla divulgazione è stata attivata sin dalle prime fasi progetto sebbene gran parte delle iniziative si era ritenuto opportuno svolgerle nel corso del secondo anno al fine di avere disponibili maggiori risultati. A seguito della pandemia causata dal COVID-19 e delle restrizioni vigenti, si è provveduto a svolgere tutte le iniziative di divulgazione rimanenti ma è stato necessario adeguare le modalità operative nel modo ritenuto via via più efficace in particolare per alcune attività come visite e incontri tecnici, rispetto a come previsto originariamente nel piano. In particolare si è data preferenza a modalità online attraverso webinar e predisposizione di video-tutorial divulgativi, oltre ad un maggior numero di pubblicazioni. Si è inoltre colta ogni occasione utile per presentare il progetto, gli obiettivi ed i risultati emersi.
- L'azione 5 sulla formazione è stata completata nel corso dell'ultimo periodo del progetto, ritenendo opportuno svilupparla alla luce della necessaria elaborazione dei risultati raccolti.

1.1 Stato di avanzamento delle azioni previste nel Piano

2

Azione	Unità aziendale responsabile	Tipologia attività	Mese inizio attività previsto	Mese inizio attività reale	Mese termine attività previsto	Mese termine attività reale
--------	------------------------------	--------------------	-------------------------------	----------------------------	--------------------------------	-----------------------------

1 - Cooperazione		Esercizio della Cooperazione	1	1	36	49
3 - Realizzazione del piano.		Azioni dirette alla realizzazione del piano	1	1	36	46
4 - Divulgazione		Divulgazione	1	2	36	49
5 - Formazione		Seminari Coaching	11	46	36	49

2 Descrizione per singola azione

AZIONE 1 – ESERCIZIO DELLA COOPERAZIONE

Unità aziendale responsabile (Uar)

CRPV, ASTRA, UNIFE

Descrizione attività

ASTRA Innovazione Sviluppo, nel suo ruolo di capomandatario ha demandato al CRPV il ruolo di coordinatore dell'attività di funzionamento e gestione del Gruppo Operativo (GO), in accordo con gli altri Partner del Gruppo Operativo (GO).

Il CRPV, tramite proprio personale come Responsabile Organizzativo del Piano), ha seguito regolarmente e gestito con le necessarie ed opportune documentazioni, tutte le fasi di sviluppo, dall'attivazione anche formale, alla rendicontazione intermedia e quindi quella finale, del GO e del relativo Piano per assicurarne il corretto funzionamento e svolgimento.

In particolare sono di seguito descritte in sintesi le diverse attività svolte dal CRPV.

A seguito dell'approvazione del Piano (Delibera Reg. Emilia Romagna n° 13491 del 24/08/2017) è stata gestita la fase di costituzione dell'ATS con tutti i partner del Gruppo Operativo (GO) fino alla sua completa formalizzazione avvenuta il 9 ottobre 2017 come da comunicazione inoltrata all'Ente regionale di competenza. Nell'ATS sono anche descritti i ruoli di ciascun partner nell'ambito del GO.

Per la Gestione del GO, sin dal 10 aprile 2017 sono partite le attività previste nel piano ed in particolare le diverse prove e attività dell'azione 3 come concordato dal GO.

Dopo un primo incontro di attivazione fra i partner effettivi del GO (**28 aprile 2017**) in cui sono stati rivisti i contenuti e gli obiettivi del Piano, al fine di avere la più ampia condivisione possibile delle informazioni, affinare le modalità di realizzazione delle azioni d'innovazione e per rendere operativi rapidi feedback, ne sono seguiti altri di seguito indicati.

L'incontro del 28 aprile 2017 ha rappresentato anche il momento di costituzione del Comitato di Piano (CP) per la gestione e il funzionamento del GO. Il CP è quindi composto:

1

oltre che dai rappresentanti delle Aziende agricole Bartolozzi Loris, Mengozzi Lucio e Franco Spada.

Il **RP** si è quindi occupato di coordinare nel complesso tutte le attività, animando il GO, seguendone il percorso e verificandone la coerenza e buon sviluppo (attraverso innumerevoli contatti telefonici, via whatsapp, mail e mailing list, documentabili dagli strumenti CRPV e incontri specifici in presenza e a seguito della pandemia Covid-19 anche online). Il RP ha inoltre favorito lo scambio di informazioni e ogni volta

3

utile, il necessario supporto sia informativo che logistico per il buon sviluppo delle sinergie e attività previste dal piano.

Ha inoltre stimolato e collaborato per la realizzazione di azioni di divulgazione, come descritte di seguito nell'azione 4.

L'attività di coordinamento e animazione ha visto il RP organizzare e partecipare un **totale di 6 incontri** del GO nel periodo 10 aprile 2017 – 31 dicembre 2020, ed in particolare nelle seguenti date:

- **28 aprile 2017** (a Ferrara, FE),
- **03 ottobre 2017** (a Ferrara, FE),
- **07 maggio 2018** (Ferrara, FE),
- **18 ottobre 2018** (a Ferrara, FE),
- **21 febbraio 2019** (a Tebano, RA),
- **28 gennaio 2020** (a Bologna, BO).

I fogli firma di tutti gli incontri del GO sopra citati e svolti in presenza, sono disponibili c/o il CRPV.

Oltre ai suddetti incontri il RP ha tenuto diversi e costanti momenti consultativi e di verifica specifici per la fase di monitoraggio sullo stato di avanzamento delle diverse attività incluse nel Piano o per affrontare eventuali specifiche criticità fra cui quelle causate dalla pandemia Covid-19.

Per la fase organizzativa e logistica di incontri e delle altre iniziative descritte di seguito, il CRPV si è avvalso della segreteria tecnica di CRPV.

Durante il costante monitoraggio dei lavori ed i risultati via via raggiunti sono state valutate ed adottate le necessarie azioni correttive. Questo è stato gestito anche in relazione ai momenti cruciali nello sviluppo delle diverse prove del Piano ("milestone"). In particolare nel primo periodo maggio-ottobre (per la raccolta in particolare delle matrici di scarto provenienti dalle strutture partner del GOI da impiegare nelle attività di laboratorio e poi nuovamente nel successivo periodo invernale di gennaio-marzo per la seconda fase di raccolta matrici sempre dai partner del GOI. Sono inoltre state svolte verifiche su tutte le prove finalizzate al controllo del corretto stato di avanzamento lavori. Anche gli incontri sopra citati sono stati utili a questo scopo, oltre ai contatti diretti avuti con i responsabili delle prove, e soprattutto laddove l'interazione delle attività ha determinato un indispensabile organizzazione anche logistica per la propedeuticità di alcuni risultati su altre attività (come ad esempio nel caso delle prove di efficacia e repellenza in laboratorio da riflettere poi nelle valutazioni di campo ed entrambe subordinate alla disponibilità degli estratti da valutare derivanti dalla fornitura dei materiali di scarto) oltre che per definire l'opportuno aggiustamento del protocollo da seguire e le eventuali azioni correttive fra cui, di rilievo l'organizzazione dell'azione 4 durante il 2020 nel corso della pandemia causata dal Covid-19.

Nella primavera 2018 e nell'autunno 2020 sono state svolte inoltre le fasi di analisi e rendicontazione tecnica intermedia e finale, ed il RP ha fornito tutti gli strumenti, informazioni e suggerimenti utili ai partner effettivi per il corretto sviluppo di queste fasi dell'attività. In particolare il RP e i RSs, insieme a tutti i partner coinvolti, hanno completato l'analisi dei risultati (intermedi nella fase di reportistica intermedia del progetto e finale per questa ultima fase) ottenuti e predisposto la relazione tecnica oltre alle altre documentazioni necessarie per la rendicontazione amministrativo-economica. Il CRPV si è occupato della gestione e predisposizione della documentazione e format e ha opportunamente informato e supportato i partner nella fase di rendicontazione tecnica ed economica.

Il CRPV ha svolto anche una ampia azione di raccordo e di organizzazione nel corso della pandemia per fare fronte alle criticità incontrate che includevano le difficoltà di accesso alle strutture operative come nel caso dell'Univ. di Ferrara e allo sviluppo di alcune azioni previste come le visite in campo e alcuni incontri tecnici dell'azione 4 di divulgazione, adoperandosi per organizzare assieme agli altri partner di progetto azioni ugualmente incisive e soddisfacenti pur in ottemperanza alle restrizioni determinate dalle normative vigenti nel corso di tutto il 2020.

Oltre alle attività descritte in precedenza, il CRPV ha svolto altre funzioni legate al proprio ruolo di coordinatore, come le attività di interrelazione con la Regione Emilia-Romagna, l'assistenza tecnico-amministrativa agli altri partner, le richieste di chiarimento e la redazione di eventuali richieste di aggiustamento o comunicazioni di altra natura trasmesse all'ente preposto, fra cui anche la richiesta di proroga inviata via PEC dal capofila del GOI il 18 maggio 2020.

Il CRPV si è inoltre occupato dell'aggiornamento della Rete PEI-AGRI in riferimento al Piano, come richiesto dalla regione, al fine di stimolare l'innovazione, tramite l'apposita modulistica presente sul sito.

Autocontrollo e Qualità

Attraverso le Procedure e le Istruzioni operative approntate nell'ambito del proprio Sistema Gestione Qualità, il CRPV ha lavorato al fine di garantire efficienza ed efficacia al progetto, come segue:

- Requisiti, specificati nei protocolli tecnici, rispettati nei tempi e nelle modalità definite;
- Rispettati gli standard di riferimento individuati per il progetto;
- Garantita la soddisfazione del cliente tramite confronti diretti e comunicazioni scritte;
- Rispettate modalità e tempi di verifica in corso d'opera definiti per il progetto;
- Individuati i fornitori ritenuti più consoni per il perseguimento degli obiettivi.

La definizione delle procedure, attraverso le quali il Responsabile di Progetto ha effettuato il coordinamento e applicato le politiche di controllo di qualità, sono la logica conseguenza della struttura organizzativa del CRPV.

In particolare sono state espletate le attività di seguito riassunte.

Attività di coordinamento

Le procedure attraverso le quali si è concretizzato il coordinamento dell'intero progetto si sono sviluppate attraverso riunioni e colloqui periodici con il Responsabile Scientifico e con quelli delle Unità Operative coinvolte.

Attività di controllo

La verifica periodica dell'attuazione progettuale si è realizzata secondo cadenze temporali come erano state individuate nella scheda progetto. Più in particolare è stata esercitata sia sul funzionamento operativo che sulla qualità dei risultati raggiunti; in particolare è stata condotta nell'ambito dei momenti sotto descritti.

- Verifiche dell'applicazione dei protocolli operativi in relazione a quanto riportato nella scheda progetto;
- Visite ai campi sperimentali e ai laboratori coinvolti nella conduzione delle specifiche attività.

Riscontro di non conformità e/o gestione di modifiche e varianti

Non si sono verificate situazioni difformi a quanto previsto dalla scheda progetto.

Tutte le attività svolte come previsto nella procedura specifica di processo sono registrate e archiviate nel fascicolo di progetto e certificate attraverso visite ispettive svolte dal Responsabile Gestione Qualità del CRPV.

Il Sistema Qualità CRPV, ovvero l'insieme di procedure, di misurazione e registrazione, di analisi e miglioramento e di gestione delle risorse, è monitorato mediante visite ispettive interne e verificato ogni 12 mesi da Ente Certificatore accreditato (DNV-GL).

Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate.

Gli obiettivi del piano sono stati complessivamente raggiunti e non sono state rilevate criticità nella fase di cooperazione del GO.

Attività ancora da realizzare:

Nessuna.

2.2 Personale

Partner	Azione	Attività	Persona	Mansione/Qualifica	Attività svolta nell'azione	ore	costo orario	Costo Totale
UNIFE	1	Funzionamento del GO		Professore ordinario	Responsabile scientifico del progetto	5	176,45	291,80
CRPV	1	Funzionamento del GO		Impiegato tecnico di concetto	Amministrazione			1062,22
CRPV	1	Funzionamento del GO		Impiegato tecnico di concetto	Amministrazione			722,20
CRPV	1	Funzionamento del GO		Impiegato tecnico di concetto	Responsabile progetto			1135,95
CRPV	1	Funzionamento del GO		Impiegato tecnico di concetto	Amministrazione			525,56
CRPV	1	Animazione del GO		Impiegato tecnico di concetto	Responsabile progetto			4165,95
							Totale	7903,68

2.3 Trasferte

Cognome Nome	Descrizione costo	Costo
	18/10/2018 - incontro	153,4
	21/02/2019 - coordinamento	95,4
	02/04/2019- coordinamento	94,69
	25/05/2019- coordinamento	72,6
	TOTALE	416,09

AZIONE 3 - SPECIFICHE AZIONI LEGATE ALLA REALIZZAZIONE DEL PIANO

2.1 Attività e risultati

Azione

AZIONE 3 - SPECIFICHE AZIONI LEGATE ALLA REALIZZAZIONE DEL PIANO

Unità aziendale responsabile (Uar)

UNIFE, CRPV, ASTRA.

Le unità verranno esplicitate per ogni singola attività.

Descrizione attività

SOTTO-AZIONE 3.1 - ESTRAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DEI SOTTOPRODOTTI AGRO-ALIMENTARI

Questa sotto-azione si è caratterizzata dallo studio estrattivo di matrici provenienti dalle imprese agricole coinvolte nel progetto e trasportate dalle loro sedi verso i laboratori dell'Università di Ferrara dagli operatori di Astra con la collaborazione organizzativa del CRPV. In particolare Caviro Distillerie (graspi e vinaccioli da uve bianche e rosse), Conserve Italia (polpe esauste di pere e mele, leguminose, pomodori), Oleificio Brisighellese (sanse) e aziende associate. Le matrici sono state sottoposte a differenti protocolli di pretrattamento ed estrattivi che prevedevano l'utilizzo di strategie a basso impatto ambientale (ridotto consumo di solventi organici) per ottenere rese significative di biomolecole di interesse (polifenoli, terpeni).

Gli obiettivi complessivi della sotto-azione consistono nella individuazione per ogni singola differente matrice vegetale (graspi e vinaccioli da uve bianche e rosse, polpe esauste di pere e mele, sanse) della strategia più adatta ad ottenere estratti con alta resa e a significativo contenuto di biomolecole di interesse.

Questa sotto-azione è articolata in 3 attività e relative prove di cui viene riportata di seguito una rendicontazione tecnica.

Scopo complessivo della sottoazione è quello di concorrere all'identificazione di un processo estrattivo con resa complessiva di estratto grezzo non inferiore al 10% per l'estrazione con fluidi supercritici e non inferiore al 15% per l'estrazione con ultrasuoni e microonde; per l'idrodistillazione non inferiore a 10 ml/kg

(1%) di materiale di partenza; gli estratti dovranno contenere non meno del 1% in biomolecole attive come determinato da strategie analitiche (indicatore di risultato per l'attività estrattiva).

Sottoazione	
3.1 - Estrazione e caratterizzazione dei sottoprodotti agro-alimentari	
Attività	Prova
3.1.1. Pretrattamento enzimatico delle matrici di scarto	3.1.1.1. Prove di pretrattamento enzimatico 3.1.1.2. Valutazione componente fenolica e terpenica
3.1.2. Estrazione delle biomasse pretrattate	3.1.2.1. Prove estrattive sulle matrici pretrattate 3.1.2.2. Prove di valutazione della componente fenolica e terpenica
3.1.3. Caratterizzazione chimica degli estratti per l'individuazione e quantificazione delle principali categorie chimiche attive	3.1.3.1. Analisi chimiche sugli estratti per diversificare la fonte delle categorie molecolari.

Il pretrattamento enzimatico delle matrici è stato approntato per verificare se questa potesse essere una strategia adeguata ad ottenere estratti con alta resa e a significativo contenuto di biomolecole di interesse, ovvero a rendere più efficienti i passaggi estrattivi successivi al trattamento in termini di resa complessiva e di contenuto in biomolecole attive. Per poter confermare questo tipo di approccio per la sua efficacia per ogni specifica tipologia di matrice, oltre a pretrattamento enzimatico (attività 3.1.1), le stesse matrici sono state sottoposte a processi estrattivi senza il pretrattamento (attività 3.1.2) per poter poi valutare quali-quantitativamente la qualità chimica degli estratti rispetto alle biomolecole di interesse (polifenoli, terpeni) (attività 3.1.3).

▪ **ATTIVITÀ 3.1.1. PRETRATTAMENTO ENZIMATICO DELLE MATRICI DI SCARTO.**

Questa attività comprende prove con differenti categorie di enzimi (3.1.1.1.) e la successiva valutazione quali-quantitativa delle biomolecole attive ottenibili in relazione alla differente tipologia di pretrattamento enzimatico adottato (3.1.1.2.). L'obiettivo principale della prova è quello di verificare l'ottimizzazione e l'efficacia del pretrattamento enzimatico rispetto al contenuto di composti fenolici nelle matrici vegetali di scarto.

Prova 3.1.1.1. Prove di pretrattamento enzimatico

Questa prova è finalizzata al pretrattamento enzimatico sulle diverse matrici utilizzando preparati enzimatici cellulolitici e pectinolitici ad attività β -D-glucopiranosidica, α -L-arabinofuranosidica, α -L-ramnopiranosidica e β -D-apiofuranosidica. Questa prova prevede per ogni matrice di sottoprodotto un pretrattamento enzimatico con tre classi di enzimi tra quelle individuate. Le biomolecole di interesse sono infatti strutturalmente integrate con le pectine e la cellulosa delle pareti ed è possibile ottenere importanti incrementi nelle rese dei processi successivi di estrazione di questi composti grazie alla degradazione enzimatica della componente polisaccaridica delle pareti cellulari delle matrici vegetali di scarto. Analogamente, composti terpenici sono accumulati all'interno dei tessuti vegetali prevalentemente sotto forma glicosilata, quindi idrosolubile ma non volatile. Il trattamento con enzimi glicolitici, è utilizzato come tecnica biocompatibile per incrementare la concentrazione in componenti aromatiche di vari estratti. Glicosidasi in grado di catalizzare la liberazione dei monoterpenoli sono infatti prodotte da svariati microorganismi e sono presenti anche in formulazioni commerciali.

MATERIALI E METODI

Le matrici di scarto, vinacce bianche dealcolate delle campagne 2016 e 2017 fornite dall'azienda Caviro (partner), sono state conservate a -20 °C prima di essere processate (disidratazione e trattamento enzimatico). Per l'essiccazione è stata utilizzata una stufa ventilata PD System type M80-VF e per la macinazione un mulino Pulverisette 14 (Fritsch, Idar-Oberstain, Germany) con setacci da 0.5 mm. Per l'incubazione dei campioni è stato utilizzato un agitatore termostato CT 711. Gli enzimi utilizzati appartengono in generale alle classi delle cellulasi 13P (Biocatalyst) e delle pectinasi da *Aspergillus niger* (Fluka). Per le analisi HPTLC sono stati utilizzati strati sottili in gel di silice 60 F₂₅₄ su supporto di vetro. Per la sonicazione è stato utilizzato un bagno ad ultrasuoni AU-65 Argolab.

RISULTATI

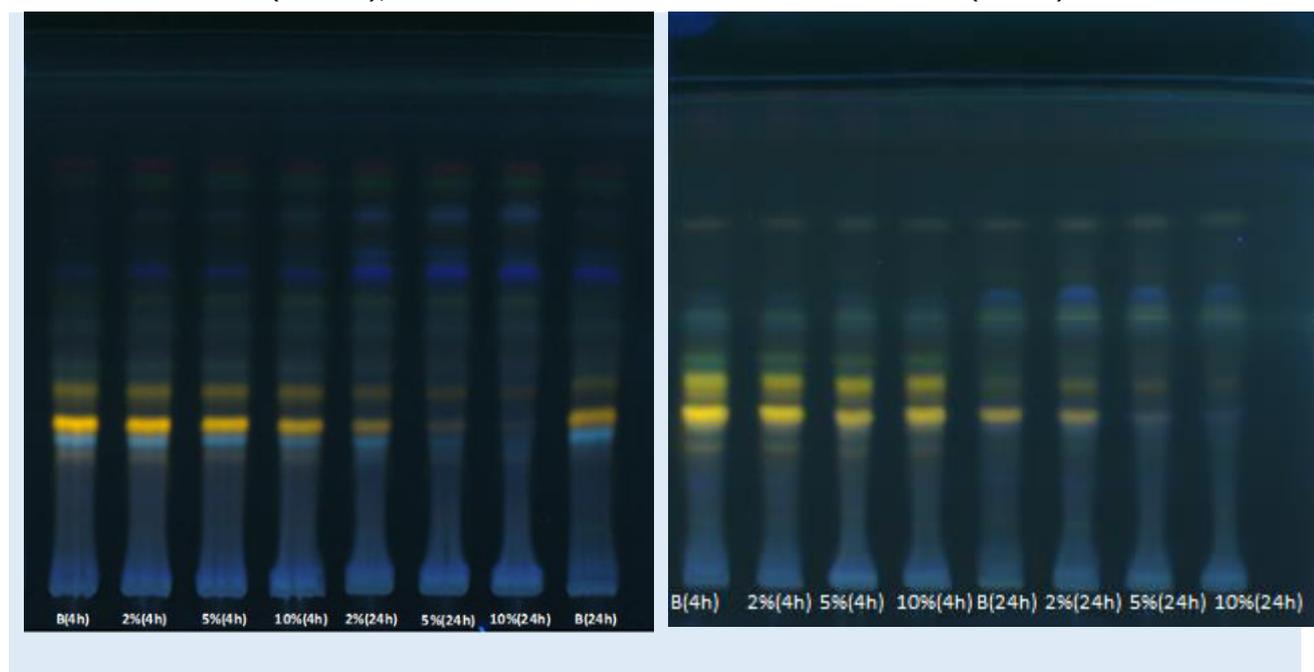
Le vinacce bianche dealcolate sono state essiccate a 70 °C per 24 ore, quindi macinate con granulometria pari a 0.5 mm mentre le vinacce bianche dealcolate della campagna 2017 sono state liofilizzate senza essere macinate.

Per entrambe le matrici il trattamento enzimatico è stato organizzato preparando quattro sospensioni contenenti ognuna 5 g di vinacce in 32.5 mL di tampone acetato 100 mM a pH 4.5. A ognuna delle quattro sospensioni sono stati aggiunti i quantitativi di miscela enzimatica composta da cellulasi e pectinasi in rapporto 1/1 (p/p) di seguito riportati:

- sospensione B: senza aggiunta di enzimi (prova in bianco);
- sospensione 2%: percentuale di miscela enzimatica contenuta rispetto alla matrice;
- sospensione 5%: percentuale di miscela enzimatica contenuta rispetto alla matrice;
- sospensione 10%: percentuale di miscela enzimatica contenuta rispetto alla matrice;
- Le sospensioni sono state mantenute in agitazione a 40 °C per 24 ore prelevando campioni da 1 mL per le analisi cromatografiche dopo 4 e 24 ore. Al termine delle 24 ore, ogni sospensione è stata diluita con 30.5 mL di etanolo e sonicata per 80 minuti (a 40 KHz). Dopo rimozione del solido per filtrazione su carta, il filtrato è stato concentrato a circa ½ del volume originario per evaporazione a pressione ridotta (15 mm Hg, 50 °C) e quindi liofilizzato. I residui secchi sono stati pesati.

Per le analisi HPTLC è stata utilizzata la metodica della doppia separazione dei flavonoidi (H. Wagner, S. Plant, "Plant drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas" Second Edition, Springer Editor, 196-212,1996) che prevede una eluizione a 40 mm dal punto di deposizione eseguita con una miscela di etile acetato/acido formico/acido acetico/acqua in rapporto volumetrico 100:11:11:20 dopo saturazione della camera cromatografica (20 minuti). Dopo asciugamento della piastra (10 minuti a 30 °C in stufa ventilata) si è eseguita una seconda eluizione a 80 mm con una miscela di etile acetato/acido acetico/toluene 90:10:100 al termine della quale la piastra è stata asciugata e derivatizzata secondo la metodica nota come NP/PEG (Natural Products Polyethylene Glycol) che prevede un primo trattamento con una soluzione all'1% (p/v) di 2-aminoetil difenilborato in metanolo (Natural Product Reagent A) seguito da un secondo trattamento con una soluzione al 5% di polietilenglicole-4000 (PEG-4000) in etanolo per evidenziare maggiormente le bande separate di biomolecole con criterio semi-quantitativo. Le macchie (bande) delle classi di biomolecole separate e derivatizzate sono state osservate con luce UV a 366 nm dal momento che la derivatizzazione favorisce l'evidenza delle biomolecole a quella specifica lunghezza d'onda. Questa metodica consente una buona separazione e rivelazione delle biomolecole appartenenti alle classi chimiche dei flavonoidi (bande di colore giallo), degli acidi idrossibenzoici (bande di colore blu) e delle cumarine (bande di colore blu-violetto) (Figura 1).

Figura 1. HPTLC dei campioni ottenuti dal trattamento enzimatico delle vinacce bianche dealcolate, essiccate e macinate (sinistra), e delle vinacce bianche dealcolate e liofilizzate (destra).



Quello che emerge dall'analisi dei campioni ottenuti da entrambe le matrici è che l'intensità delle bande fluorescenti gialle (flavonoidi) e blu (acidi idrossibenzoici) diminuisce all'aumentare della concentrazione di enzima utilizzato e della durata del trattamento enzimatico. Per contro, si osserva un'intensificazione delle macchie blu-viola (cumarine) direttamente proporzionale alla concentrazione di enzima e al tempo di trattamento (Figura 1: a destra campioni da vinacce bianche essiccate 2016; a sinistra campioni da vinacce bianche liofilizzate 2017). Per quanto riguarda la resa percentuale di estrazione - espressa come massa di estratto liofilizzato ottenuta rispetto alla massa della matrice di partenza (vinacce di scarto) - non risulta essere in relazione né al contenuto di enzima impiegato e né ai tempi di trattamento (Tabella 1).

Tabella 1. Resa percentuale delle estrazioni enzimatiche condotte sulle vinacce bianche dealcolate, essiccate e macinate.

Campione	% liofilizzato rispetto alla matrice di partenza
Bianco 4h VB	31,00
Enzima 2% 4h VB	30,3
Enzima 5% 4h VB	34,0
Enzima 10% 4h VB	34,7
Bianco 24h VB	31,4
Enzima 2% 24h VB	32,0
Enzima 5% 24h VB	37,7
Enzima 10% 24h VB	28,9

CONCLUSIONI

Queste prime prove, di carattere qualitativo hanno dimostrato che l'impiego degli enzimi delle classi della cellulasi e pectinasi determinano variazioni nella composizione degli estratti ottenuti per macerazione in ambiente acquoso tamponato (pH 4.5) e che queste variazioni interessano in maniera significativa composti appartenenti alle classi dei flavonoidi, degli acidi idrossibenzoici e delle cumarine. Il fatto che le rese di estrazione in termini di massa non varino significativamente potrebbe essere imputabile ad una idrolisi parziale dei polisaccaridi strutturali che non ne determina un'elevata solubilizzazione (formazione di monomeri e oligomeri solubili in basse concentrazioni). Ulteriori repliche di valutazione hanno permesso di confermare la validità di queste ipotesi, sebbene ed ovviamente con dati semi-quantitativi diversificati rispetto alle diverse matrici di scarto.

Con particolare riferimento alle prove preliminari semiquantitative (HP-TLC) sugli scarti da leguminose sono emersi dati parzialmente in linea con quanto presente in letteratura (Nino-Medina et al. Waste Biomass Valor (2017) 8:1199–1203). I risultati di questa prova contribuiranno a far emergere nell'attività 3.1.2 (Estrazione delle biomasse pretrattate) l'eventuale efficacia del pretrattamento nel raggiungimento dell'indicatore di risultato

Prova 3.1.1.2 valutazione componente fenolica e terpenica.

Con specifico riferimento ai risultati ottenuti nella precedente prova 3.1.1.1, sono state approntate valutazioni chimiche di carattere qualitativo e quantitativo aventi come finalità la caratterizzazione delle biomolecole di interesse nelle matrici pretrattate. Questa prova, assieme a quanto ottenuto e riportato nell'azione 3.1.2. e relative prove (3.1.2.1: prove estrattive sulle matrici pretrattate; 3.1.2.2: prove di valutazione della componente fenolica e terpenica), ha come obiettivo specifico quello di mettere in evidenza l'effettiva efficacia del trattamento enzimatico rispetto alla resa in biomolecole di interesse e la possibilità di raggiungere quindi l'indicatore di risultato previsto.

MATERIALI E METODI

Le biomasse di scarto fornite dall'azienda Caviro Srl e ConserveItalia sono state conservate 20 °C prima del pretrattamento e successivamente processate a partire dalla loro omogeneizzazione. Per l'omogeneizzazione delle sospensioni è stato utilizzato un omogeneizzatore Ultra turrax. Subito dopo

l'omogeneizzazione le matrici sono state incubate con le miscele enzimatiche per il pretrattamento vero e proprio. Per l'incubazione dei campioni è stato utilizzato un agitatore termostato CT 711. Gli enzimi utilizzati sono la cellulasi 13P (Biocatalyst) e la pectinasi da *Aspergillus niger* (Fluka). Le analisi HPLC-MS sono state eseguite con un micro HPLC Thermo accoppiato ad uno spettrometro di massa LTQ XL con analizzatore a trappola ionica lineare.

Sono state approntate cinque prove: in ciascuna, 8.33 g di biomassa di scarto sono state sospese in 54 mL di tampone acetato 100 mM a pH 4.5. Le sospensioni sono state omogeneizzate con Ultra turrax per 5 min a 20000 rpm e a ciascuna è stata aggiunta una quantità variabile di miscela enzimatica costituita da Cellulasi 13P e Pectinasi da *Aspergillus niger* in rapporto 1:1 (p/p) secondo lo schema seguente:

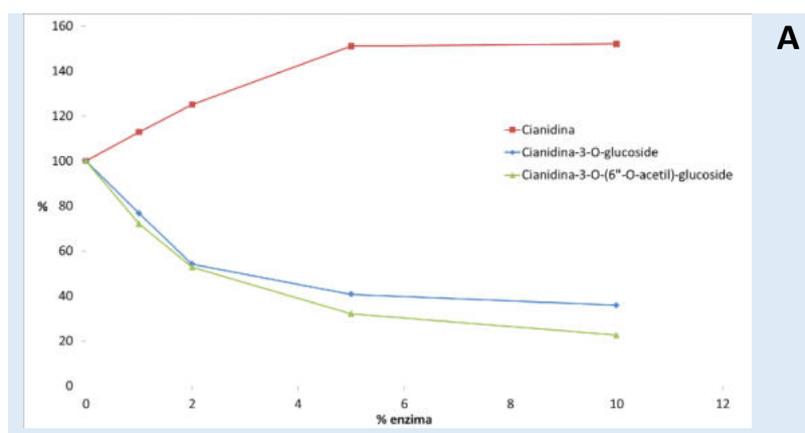
- sospensione 0 = senza miscela enzimatica
- sospensione 1 = (1% in peso rispetto alla matrice)
- sospensione 2 = (2% in peso rispetto alla matrice)
- sospensione 5 = (5% in peso rispetto alla matrice)
- sospensione 10 = (10% in peso rispetto alla matrice)

Le cinque sospensioni sono state mantenute in agitazione a 40 °C prelevando campioni da 1 mL per l'analisi HPLC-MS dopo 6 e 24 ore. Prima dell'analisi i campioni sono stati centrifugati (10.000 rpm, 10 min).

Analisi HPLC-MS. L'analisi HPLC-MS/MS è stata svolta utilizzando una colonna Symmetry C18 (Waters) 2.1 x 150 mm come mezzo separativo e una miscela di fasi mobili costituite da (i) acqua + acido formico 0.1% v/v (channel A) e (ii) acetonitrile + acido formico 0.1% v/v (channel B). Si è eseguita una eluzione in gradiente dal 5% al 30% del canale B in 25 min. Si è utilizzata una sorgente ESI per la ionizzazione e un analizzatore di massa a trappola ionica lineare.

RISULTATI

La tecnica analitica utilizzata consente sia l'identificazione che la variazione in termini di concentrazione delle molecole contenute negli estratti. Le analisi HPLC-MS evidenziano un significativo aumento della concentrazione di alcuni flavonoidi, principalmente quercetina e cianidina, nei campioni trattati enzimaticamente. È interessante osservare che l'aumento è proporzionale alla quantità di enzima utilizzata nei campioni tra 0 e 5% mentre non si riscontrano differenze degne di nota tra i campioni ottenuti con 5 e 10% di miscela enzimatica. Inoltre, l'aumento delle concentrazioni di quercetina e cianidina ha un andamento inversamente proporzionale a quello delle concentrazioni dei corrispondenti derivati glicosilati (Figura 2, 3), indice che il trattamento enzimatico agisce a livello di questi ultimi. Un altro aspetto interessante che emerge dall'osservazione dei cromatogrammi è il notevole aumento della concentrazione di acido caffeico che si riscontra nei campioni trattati enzimaticamente, aumento che risulta direttamente proporzionale alla concentrazione di enzima utilizzata in tutta la gamma delle prove, da 0 a 10% (Figura 2, C). Infine si può affermare che non si osservano differenze significative nelle concentrazioni dei composti sopra menzionati tra i campioni prelevati dopo 6 e 24 ore.



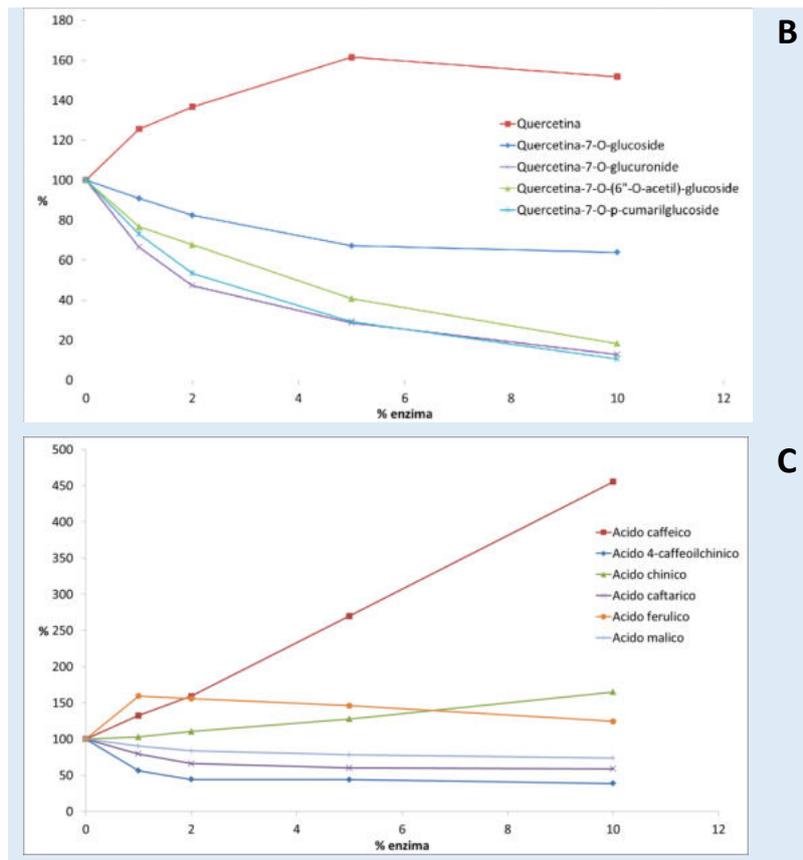
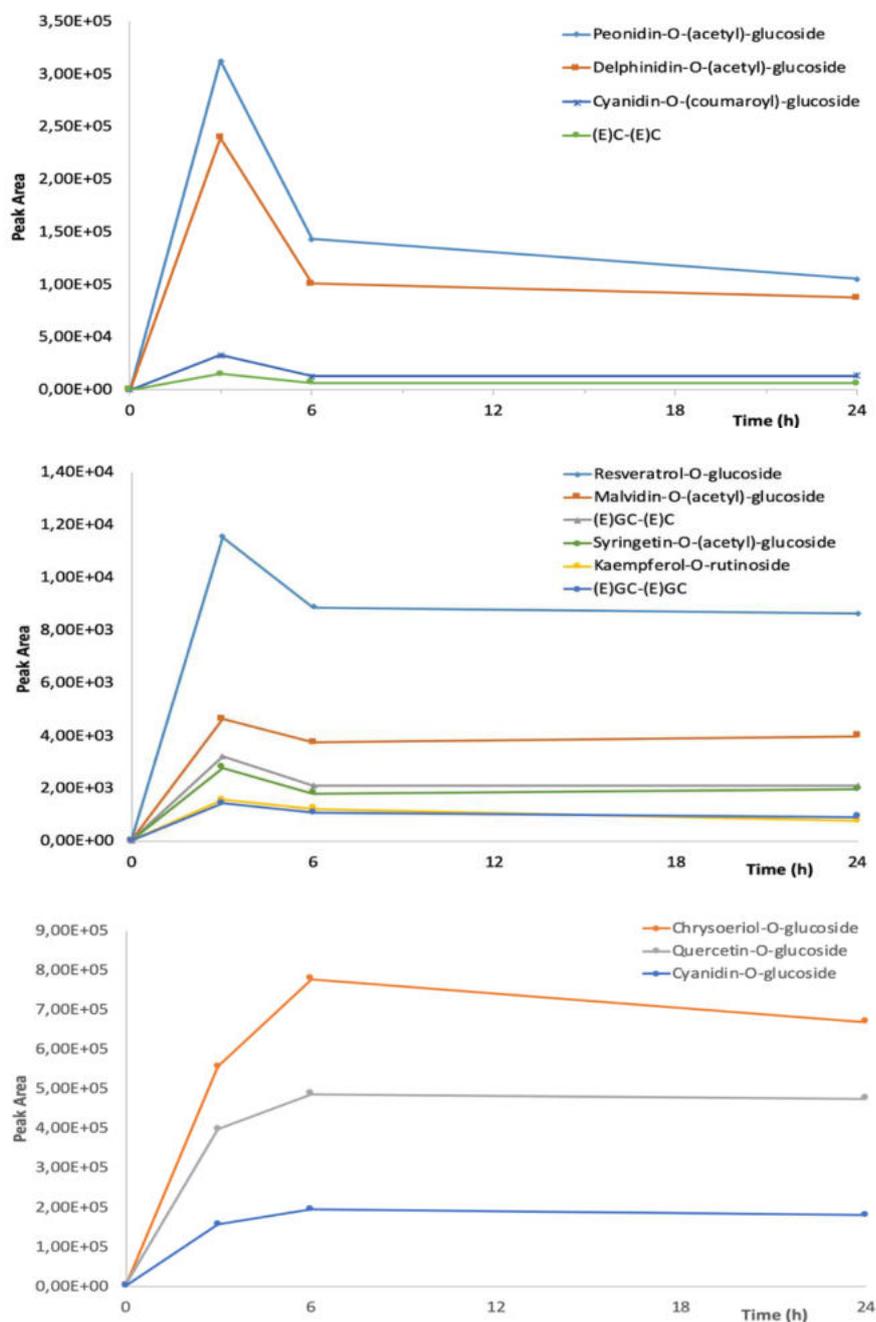
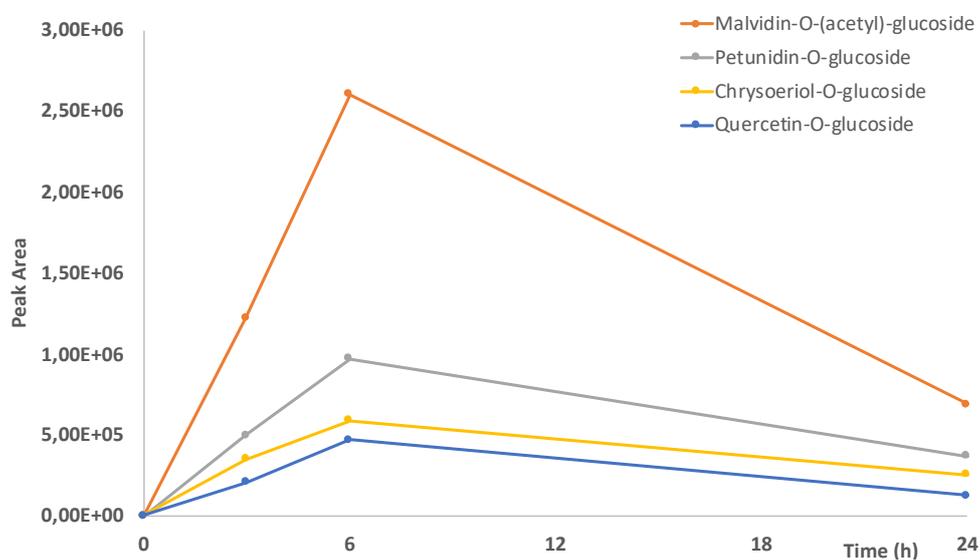
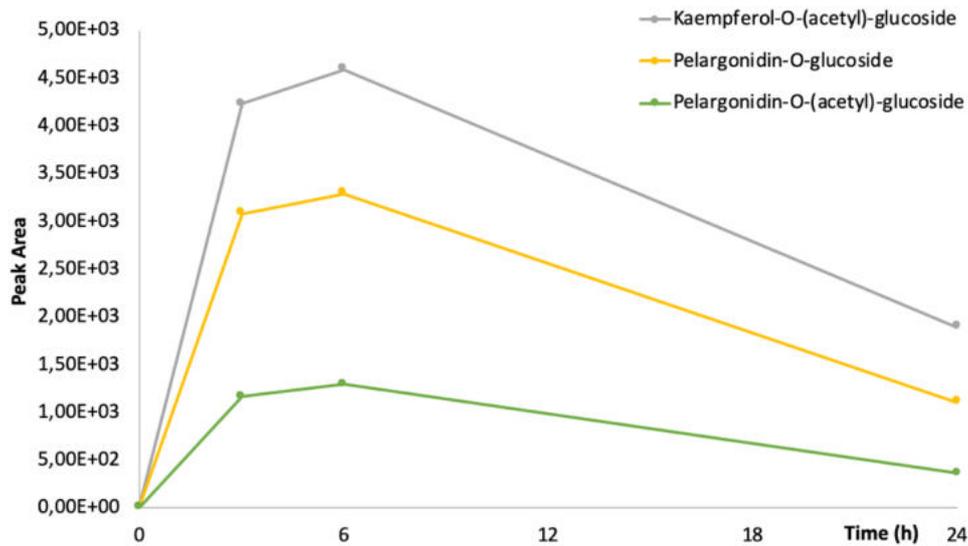
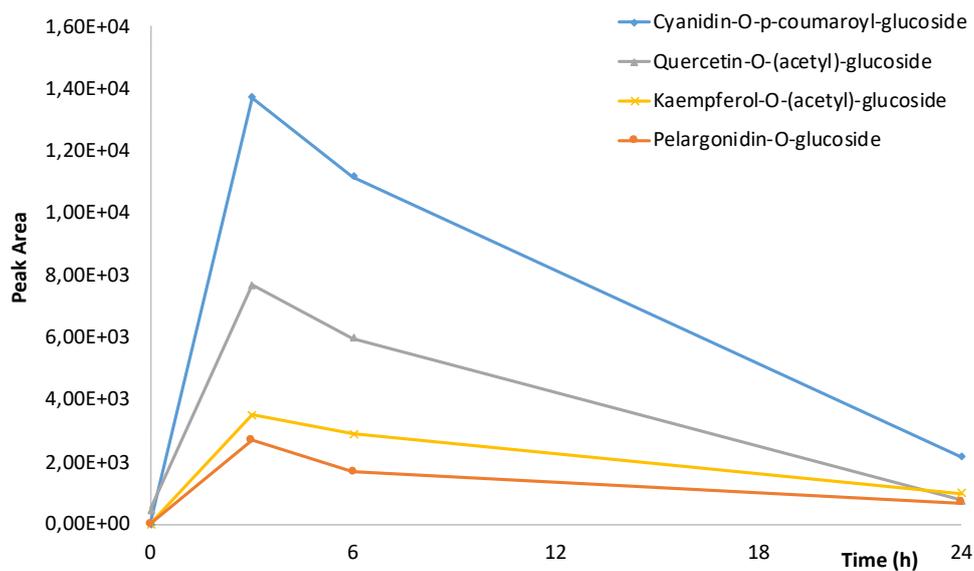


Figura 2. Andamento della concentrazione di cianidina e rispettivi derivati glicosilati (grafico A), della quercetina e rispettivi derivati glicosilati (grafico B) e dell'acido caffeico (grafico C) nei campioni ottenuti dopo 6 ore dal trattamento enzimatico delle vinacce rosse.

Figura 3. Serie di grafici che illustrano in generale come il trattamento enzimatico protratto oltre le 6 ore non risulta efficace ai fini dell'efficacia del processo. I grafici vanno letti osservando il tempo di trattamento (asse x) rispetto alla concentrazione rilevata durante la cinetica di trattamento (asse y). Per i diversi composti fenolici rilevati per ciascun grafico è evidente che il picco di efficienza del trattamento enzimatico è per alcuni composti alle 3 ore, per altri alle 6 ore e non oltre.





CONCLUSIONI

Questo studio fornisce una prima indicazione sulla quantità di enzima necessaria per il trattamento, dimostrando che, nelle condizioni di trattamento adottate, il surplus di enzima tra 5 e 10% non produce sostanziali miglioramenti nel rilascio complessivo dei composti in analisi e pertanto suggerisce di utilizzare quantità di enzima inferiore al 5% per l'ottimizzazione del processo. Le analisi HPLC-MS evidenziano comunque, e nello specifico di particolari categorie polifenoliche, un significativo aumento della concentrazione di alcuni flavonoidi, principalmente quercetina e cianidina, nei campioni trattati enzimaticamente. È interessante osservare che l'aumento è proporzionale alla quantità di enzima utilizzata nei campioni tra 0 e 5% mentre non si riscontrano differenze degne di nota tra i campioni ottenuti con 5 e 10% di miscela enzimatica. L'attività glicolitica nei confronti dei derivati glicosilati di quercetina e catechina potrebbe infine risultare anomala se non si considera che i preparati enzimatici commerciali utilizzati per queste prove non sono costituiti da cellulasi e pectinasi pure ma da miscele di enzimi ottenuti da fermentazioni solo parzialmente purificate e che quindi possono contenere quantità significative di altri enzimi glicolitici. Infine, non si osservano differenze significative nelle concentrazioni dei composti polifenolici tra i campioni prelevati dopo 6 e 24 ore, quindi un aspetto conclusivo importante per l'ottimizzazione e sostenibilità del processo è l'inutilità di tempi di trattamento superiori alle sei/dieci ore.

▪ **ATTIVITÀ 3.1.2. ESTRAZIONE DELLE BIOMASSE PRETRATTATE.**

L'obiettivo complessivo dell'attività è quello di concorrere all'identificazione di un processo estrattivo con resa complessiva di estratto grezzo non inferiore al 10% per l'estrazione con fluidi supercritici e non inferiore al 15% per l'estrazione con ultrasuoni e microonde; per l'idrodistillazione non inferiore a 10 ml/kg (1%) di materiale di partenza; gli estratti dovranno contenere non meno del 1% in biomolecole attive come determinato da strategie analitiche. Ulteriore conseguente ricaduta è l'individuazione delle matrici più promettenti dal punto di vista delle categorie chimiche di interesse e di conseguenza più performanti dal punto di vista delle proprietà utili al comparto fitosanitario, alimentare ed energetico. In relazione a questo, gli obiettivi specifici delle prove hanno riguardato:

- l'individuazione dei processi estrattivi più adeguati tra quelli previsti per l'ottenimento di biomolecole (polifenoli, terpeni) dalle matrici di scarto. Ci si è focalizzati in particolare sull'estrazione con ultrasuoni e sulla idrodistillazione, rispettivamente note per essere particolarmente performanti per l'estrazione dei polifenoli e dei terpeni. Le matrici considerate erano scarti della filiera vitivinicola fornite da Caviro distillerie (vinacce bianche, rosse, raspi, vinaccioli), scarti della lavorazione di mele e pere forniti dal ConserveItalia, sanse dalla lavorazione delle olive forniti da Oleificio Brisighellese;
- la verifica delle attività di pretrattamento enzimatico (Attività 3.1.1 e relative prove) in relazione alla loro efficacia nella valorizzazione degli scarti rispetto alla resa complessiva di estratto totale e all'ottenimento di biomolecole di interesse.

Prova 3.1.2.1. Prove estrattive sulle matrici pretrattate.

Per ottimizzare i risultati di questa prova che prevede la valutazione dell'efficacia estrattiva su matrici pretrattate, si è ritenuto opportuno fare una valutazione comparativa con le stesse modalità estrattive previste dal progetto anche su matrici non pretrattate, così da quantificare con più evidenza l'eventuale supposta efficacia del pretrattamento enzimatico per ottenere rese massimizzate così come una più abbondante quantità di biomolecole, polifenoli e composti terpenici in particolare.

Nel primo anno di attività sono state effettuate estrazioni con ultrasuoni (UAE) ed idrodistillazioni su matrici di scarto della filiera vitivinicola (vinacce bianche, rosse, raspi, vinaccioli), della filiera di lavorazione di pere e mele, e olive (sanse).

Nell'ultimo anno e mezzo di ricerca è stato caratterizzato dallo studio di nuove matrici (ceci, mix fagioli, fagioli cannellini e fagiolini), dall'estrazione con fluidi supercritici e dall'estrazione assistita da microonde delle matrici nuove e di quelle già in nostro possesso, puntando a soddisfare gli indicatori che il progetto prefissava per quanto riguarda le rese estrattive individuando al contempo quindi le matrici più promettenti dal punto di vista delle categorie chimiche di interesse e di conseguenza più performanti dal punto di vista delle proprietà utili al comparto fitosanitario, alimentare ed energetico.

MATERIALI E METODI

I reagenti chimici impiegati: tutti i solventi e i reagenti impiegati per le analisi chimiche erano di qualità cromatografica, mentre tutti i reagenti impiegati per le valutazioni biologiche erano coerenti per qualità e purezza con quanto riportato in letteratura. Lo standard malvidina-3-O-glucoside è stato acquistato da Extrasynthese (Genay, Francia). Trolox, DPPH (1,1-difenil-2-picrylhydrazil), metanolo, etilacetato, etanolo, acido formico, acido acetico, NP / PEG e acido gallico sono stati acquistati da Sigma-Aldrich Italia (Milano, Italia). Toluene è stato acquistato da Carlo Erba Reagents (Milano, Italia).

La macinazione: gli scarti di filiera sono stati macinati (filtro 0.5mm) in un mulino a rotore a velocità variabile Pulverisette 14 (Fritsch, Germania) poco prima dell'estrazione per evitare la degradazione o l'ossidazione dei principali composti.

Le estrazioni: sono state effettuate estrazioni su campioni essiccati e polverizzati di scarti utilizzando estrazione assistita da ultrasuoni (UAE). Campioni non essiccati di tutte le matrici sono stati sottoposti a distillazione in corrente di vapore d'acqua (DIS). Ogni estrazione è stata effettuata in triplicato. Gli estratti ottenuti con UAE sono stati liofilizzati e conservati a -20 ° C fino al momento delle analisi. Gli estratti ottenuti per distillazione in corrente di vapore d'acqua sono stati immediatamente analizzati per gas cromatografia. Per tutte le matrici, sono state effettuate prove su differenti miscele di solventi coerenti con l'estrazione delle biomolecole di interesse e si è deciso di operare con i seguenti solventi di estrazione: etanolo (EtOH) 100%; Acqua 100%; miscela EtOH:Acqua 50:50. Per tutte le matrici, il rapporto quantitativo ottimale matrice:solvente era di 1:13 (1g/13ml).

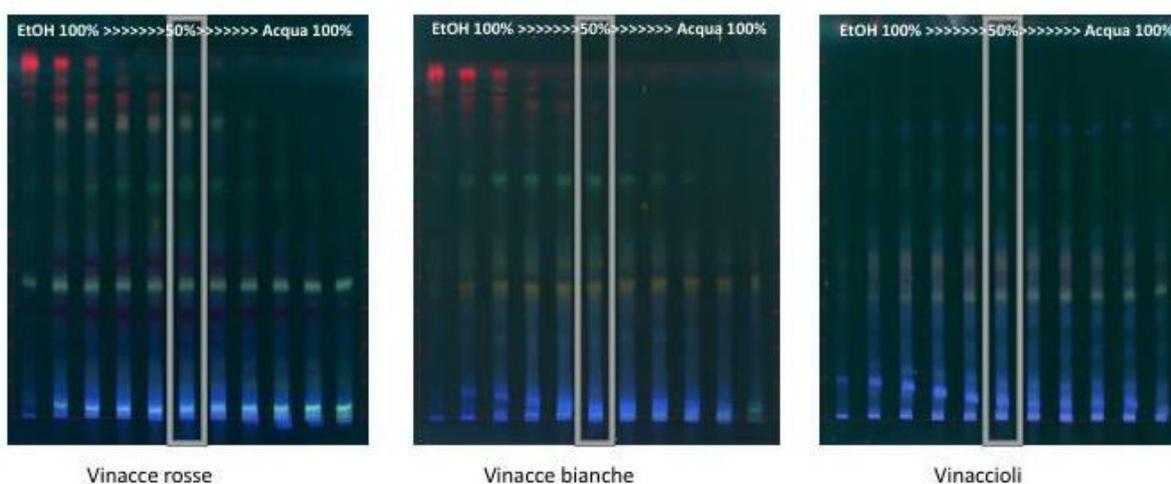
- Estrazione assistita da ultrasuoni (UAE). L'estrazione assistita da ultrasuoni è stata eseguita utilizzando un bagno ad ultrasuoni (Ultrasonik 104X, Ney Dental International, MEDWOW, Cipro) impostato ad una frequenza operativa di 48 kHz, per 80min, a temperatura ambiente. Le estrazioni sono state effettuate utilizzando 50g di matrice vegetale essiccata e polverata di ciascun sottoprodotto. Sono stati utilizzati 650ml dei seguenti solventi di estrazione: etanolo (EtOH) 100%; Acqua 100%; miscela EtOH:Acqua 50:50 per un rapporto ottimale matrice:solvente di 1:13 (1g/13ml). Gli estratti ottenuti sono stati filtrati, liofilizzati e conservati a -18 ± 0.5 °C al buio fino al momento dell'analisi.
- Estrazione assistita da microonde (MAE). Per il MAE è stato utilizzato un normale forno a microonde domestico con potenza regolabile (da 160 a 800 W) (Whirlpool Micro 410). Gli scarti di filiera macinati (10 g) sono stati estratti con 130 ml di etanolo al 50% in un becher aperto in Pyrex. Il becher è stato posto al centro del forno sopra un piatto rotante ed è stato esposto a radiazioni di microonde a valori di potenza selezionati. Il punto finale di estrazione è stato stabilito dall'ebollizione (osservazione di bolle omogenee su tutta la superficie del liquido). L'irraggiamento è stato poi fermato e il becher è stato lasciato nel forno per 25 secondi per la stabilizzazione della temperatura. Una volta fuori dal forno, la distribuzione della temperatura all'interno del campione è stata valutata misurando la temperatura in tre diverse posizioni. L'estratto è stato filtrato attraverso un filtro buchner e carta da filtro, liofilizzato e pesato per la valutazione della resa estrattiva. L'estratto secco così ottenuto è stato conservato in freezer a -20°C fino momento dell'analisi.
- Estrazione con anidride carbonica allo stato supercritico (SFE). Le estrazioni di fluidi supercritici sono state effettuate utilizzando un estrattore Applied Separations (Allentown, PA, USA) modello Spe-edTM SFE Prime. È stata utilizzata anidride carbonica di grado di purezza 4,5 (99,995 %) fornita da SOL S.p.a. Un vessel di estrazione da 50 ml è stato caricato con il campione macinato ed eventualmente con aggiunta Spe-edTM Matrix a seconda del contenuto di umidità della matrice da estrarre. La portata di CO₂ per l'estrazione è stata mantenuta ad un flusso medio di 2,5 L/min, e il processo è stato eseguito in condizioni di pressione, temperatura e fasi estrattive statiche e dinamiche dipendenti dalle matrici considerate. Ogni estratto, eseguito in triplice copia, è stato raccolto e conservato in freezer a -20°C fino momento dell'analisi tramite GC-MS.
- Estrazione per distillazione in corrente di vapore d'acqua (idrodistillazione). Campioni non essiccati di tutte le matrici sono stati sottoposti a distillazione in corrente di vapore. Le distillazioni sono state effettuate seguendo le metodiche riportate nella Farmacopea Europea (Edizione corrente). In particolare, 100g di ogni matrice sono stati distillati con un volume di acqua di 1,3 litri, per un tempo di 4 ore con strumentazione Clevenger. Gli estratti ottenuti (distillati) sono stati disidratati con sodio solfato anidro e conservati a -18 ± 0.5 °C al buio fino al momento dell'analisi.

RISULTATI

Le metodiche estrattive sono state applicate e confrontate innanzitutto rispetto alle rese ottenute per ciascuna matrice (sottoprodotto di scarto) ovvero matrici di scarto della filiera vitivinicola (vinacce bianche, rosse, raspi, vinaccioli), della filiera di lavorazione di pere e mele, olive (sanse), pomodori e legumi.

Per la scelta della migliore combinazione di solvente da utilizzare per estrarre biomolecole (polifenoli) dalle matrici di scarto, sono state fatte diverse prove ottenendo estratti poi valutati su lastra cromatografica HP-TLC per valutare il numero e la qualità delle bande ottenute. Il riscontro analitico ha così guidato il processo estrattivo individuando la miscela idroalcolica etanolo:acqua (EtOH:H₂O) 50:50 come la più efficace. La Figura 1 mostra, a titolo esemplificativo, le prove di estrazione UAE eseguite con le miscele di solventi considerati, ovvero dall'estratto con etanolo al 100% all'estratto con acqua al 100% passando per le differenti combinazioni intermedie. È stata messa in evidenza la combinazione EtOH:Acqua 50:50 ritenuta la più efficace in relazione alla più definita separazione delle classi di fenoli (bande di colore dall'azzurro al giallo-verde), alla loro numerosità, e all'assenza di altre categorie chimiche non di interesse (ad es. le clorofille evidenti con bande rosse) presenti invece negli estratti con etanolo, ed etanolo:acqua in rapporti differenti. La stessa tipologia di riscontro è stata ottenuta anche per le altre matrici di scarto, ovvero raspi, foglie da viti lambrusco, mele, pere, sanse, bucce di pomodori e legumi (dati non evidenziati). Queste evidenze hanno poi trovato conferma in particolare nelle analisi chimiche puntuali riportate per la *Prova 3.1.2.2. (Prove di valutazione della componente fenolica e terpenica)*, e per la valutazione dell'attività antiossidante per la *Prova 3.3.1.1. (Valutazioni semi-quantitative e bio-autografiche di attività antiossidante)*.

Figura 1A. A titolo d'esempio si riportano le prove cromatografiche su lastre HP-TLC effettuate con estratti di vinacce (rosse e bianche) e vinaccioli al fine di individuare la più efficace combinazione di solventi per ottenere la migliore resa in composti di interesse (polifenoli).



In tabella 1A sono riportati i risultati relativamente alle rese totali di estrazioni assistite da ultrasuoni (UAE) e con microonde (MAE), mentre in Tabella 1B sono riportate le rese di estrazione per idrodistillazione e dei relativi sottoprodotti del processo estrattivo (acque aromatiche ed estratto UAE della feccia post-idrodistillazione).

Tabella 1A. Sono riportate le rese di estrazione assistite da ultrasuoni (UAE) e da microonde (MAE) di tutte le matrici essiccate utilizzate. I valori sono espressi in percentuale peso/peso (g di estratto/100 grammi di matrice iniziale di sottoprodotto). Le matrici indicate con * sono quelle che hanno dato rese inferiori a quanto previsto da progetto (15%). I valori si riferiscono al dato medio di 3 differenti esperimenti (dev. st. <5%). In rosso i risultati che hanno soddisfatto l'indicatore di risultato rispetto al dato di resa.

Campioni	Resa% UAE	Resa% MAE
----------	--------------	--------------

VINACCE ROSSE EtOH 50%	25,13	24,53
VINACCE BIANCHE EtOH 50%	27,59	21,87
RASPI EtOH 50%	19,45	13,65*
VINACCIOLI EtOH 50%	9,74*	8,46*
FOGLIE di VITE var. Lambrusco H ₂ O 100%	18,62	17,95
FOGLIE di VITE var. Lambrusco EtOH 50%	15,70	15,31
FOGLIE di VITE var. Lambrusco EtOH 100%	5,73*	4,77*
MELE H ₂ O 100%	25,76	27,35
MELE EtOH 50%	31,44	29,58
MELE EtOH 100%	40,03	39,91
PERE H ₂ O 100%	20,18	18,11
PERE EtOH 50%	25,27	21,47
PERE EtOH 100%	16,62	13,56*
SANSE H ₂ O 100%	10,99*	8,51*
SANSE EtOH 50%	12,25*	9,94*
SANSE EtOH 100%	8,86*	6,25*
BUCCE DI POMODORO H ₂ O 100%	4,58*	3,39*
BUCCE DI POMODORO EtOH 50%	4,18*	3,18*
BUCCE DI POMODORO EtOH 100%	3,49*	3,10*
CECI H ₂ O 100%	3,79*	3,90*
CECI EtOH 50%	3,59*	3,30*
CECI EtOH 100%	3,29*	3,11*
MIX FAGIOLI H ₂ O 100%	19,44	20,87
MIX FAGIOLI EtOH 50%	12,46*	11,92*
MIX FAGIOLI EtOH 100%	2,99*	1,47*
CANNELLINI H ₂ O 100%	9,88*	8,53*
CANNELLINI EtOH 50%	7,35*	7,25*
CANNELLINI EtOH 100%	2,13*	1,89*
FAGIOLINI H ₂ O 100%	36,61	37,01
FAGIOLINI EtOH 50%	39,76	39,30
FAGIOLINI EtOH 100%	5,62*	5,15*

I risultati ottenuti con estrazione assistite da ultrasuoni (UAE) hanno mostrato che la resa migliore, espressa in termini percentuali (g di estratto totale rispetto a 100 g di matrice di partenza essiccata) era relativa al campione di scarti di lavorazione di mele processato con un solvente etanolico 100% (40,03%). Il tempo di estrazione è oltremodo contenuto dal momento che si realizza in 80 minuti di processo.

I dati di resa ottenuti dalle altre matrici si dividono abbastanza equamente tra quelle che hanno mostrato una resa alta nelle estrazioni con EtOH:H₂O in proporzione 50:50 (Vinacce rosse e bianche, raspi, vinaccioli, pere, sanse e fagiolini) e quelle che hanno ottenuto una resa alta nelle estrazioni fatte con 100% H₂O (foglie di vite, bucce di pomodoro, ceci, mix fagioli e fagioli cannellini).

Rispetto agli indicatori del progetto, non tutte le rese estrattive totali sono risultate essere al di sopra della soglia reputata coerente con un possibile *scale up* produttivo ed applicativo (15%). In particolare, le estrazioni che non hanno rispettato questo parametro sono: vinaccioli (50% EtOH), sanse (100% di H₂O, 50% EtOH e 100% EtOH), foglie di vite var. Lambrusco (EtOH 100%), bucce di pomodoro (100% di H₂O, 50% EtOH e 100% EtOH), ceci (100% di H₂O, 50% EtOH e 100% EtOH), mix di fagioli (50% EtOH e 100% EtOH), fagioli cannellini (100% di H₂O, 50% EtOH e 100% EtOH) e fagiolini (100% EtOH). Dopo queste osservazioni e considerando l'ingente mole degli scarti ottenuti dai vari partner del progetto, è stato deciso di porre maggiore attenzione soprattutto alle matrici che hanno dato risultati soddisfacenti in termini di resa estrattiva totale, con ogni tipologia di solvente utilizzato, accantonando almeno parzialmente per dare spazio a matrici che, secondo questo canone, risultavano più promettenti. In ogni caso, la valutazione delle bioattività su organismi fitopatogeni è avvenuta per tutte le matrici per non escludere a priori la possibilità di trovare nuove molecole o frazioni attive dal punto di vista fitoiatrico.

Parallelamente all'estrazione assistita da ultrasuoni (UAE) è stata scelta l'estrazione assistita da microonde (MAE) poiché utilizzando onde elettromagnetiche ad alta frequenza non ionizzanti avrebbe potuto facilitare l'estrazione portando ad una riduzione del tempo di estrazione e del consumo di solvente. Una limitazione di questa tecnica è la necessità dell'utilizzo di solventi dipoli permanenti, e la miscela EtOH:H₂O si adatta a questa condizione. Le rese percentuali delle estrazioni MAE riportate in Tabella 1A mettono in evidenza come queste siano, nella quasi totalità dei casi, inferiori rispetto a quelle UAE tranne per gli estratti di mele, ceci e mix di fagioli ottenuti con H₂O 100%. Questo dato potrebbe essere ricollegato alle caratteristiche proprie del solvente acqua che si adatta particolarmente a questa tecnica estrattiva. Inoltre, questo risultato trova conferme anche nella letteratura specifica: per esempio Xie et al. (Xie, P.; Huang, L.; Zhang, C.; Xiaoj, Y.D.; Cheng, W.J. Enhanced extraction of hydroxytyrosol, maslinic acid and oleanolic acid from olive pomace: Process parameters, kinetics and thermodynamics, and greenness assessment. Food Chem. 2019, 276, 662–674) hanno sottolineato la miglior performance della macerazione assistita da ultrasuoni (UAE) nell'estrazione di polifenoli nel processo di rivalutazione degli scarti della produzione oleifera.

Questi dati evidenziamo come, secondo la nostra esperienza, le estrazioni assistite da ultrasuoni (UAE) possano produrre fitocomplessi che più si avvicinano alle attese previste dal progetto relativamente alle rese estrattive minime del 15% e come questa tecnica sia maggiormente duttile per il trattamento di svariate matrici di scarto.

Un ulteriore punto di riflessione su cui soffermarsi è la variazione di resa di una medesima matrice rispetto alla raccolta di anni successivi. L'esempio più emblematico è quello dei raspi, che hanno mostrato una resa del 19,45 % nella raccolta del 2017 ed una resa ottenuta con le medesime condizioni estrattive del 2,23% nel 2018. La differenza qualitativa tra i due fitocomplessi era pressoché nulla, ma variava in modo evidente dal punto di vista quantitativo mostrando una quantità di fenoli totali diminuita di circa 10 volte. Per evitare questo effetto si dovrebbe capire l'importanza della necessità di un subitaneo trattamento delle matrici post-lavorazione; e parallelamente del valore di un sistema di stoccaggio efficace degli scarti prima della loro rivalutazione.

Tabella 1B. Sono riportate le rese di estrazione per idrodistillazione di tutte le matrici non essiccate utilizzate nonché delle acque di distillazione e delle fecce ottenute dopo estrazione con ultrasuoni (UAE). I valori sono espressi in percentuale peso/peso (g di estratto/100 grammi di matrice iniziale di sottoprodotto). I valori si riferiscono al dato medio di 3 differenti esperimenti (dev.st. <5%). In rosso i risultati che hanno soddisfatto l'indicatore di risultato rispetto al dato di resa.

Campioni	Resa%
VINACCE ROSSE DISTILLATO	0,05
VINACCE ROSSE ACQUA AROMATICA	12,90
VINACCE ROSSE FECCIA EtOH 50%	1,40
VINACCE BIANCHE DISTILLATO	0,05
VINACCE BIANCHE ACQUA AROMATICA	10,92
VINACCE BIANCHE FECCIA EtOH 50%	0,80
RASPI DISTILLATO	0,01
RASPI ACQUA AROMATICA	13,65
RASPI FECCIA EtOH 50%	1,49
VINACCIOLI DISTILLATO	0,01
VINACCIOLI ACQUA AROMATICA	9,99
VINACCIOLI FECCIA EtOH 50%	1,11
MELE DISTILLATO	0,05
MELE ACQUA AROMATICA	13,87
MELE FECCIA EtOH 50%	1,85
PERE DISTILLATO	0,04
PERE ACQUA AROMATICA	12,48
PERE FECCIA EtOH 50%	1,74
FOGLIE di VITE var. Lambrusco DISTILLATO	0,01
FOGLIE di VITE var. Lambrusco ACQUA AROMATICA	10,32
FOGLIE di VITE var. Lambrusco FECCIA EtOH 50%	1,07

Per l'idrodistillazione, invece, (tabella 1B) le rese estrattive sono tutte mediamente ridotte. Sebbene le quantità siano in linea per diverse matrici con l'indicatore di risultato, l'espressione composizionale in biomolecole attive è estremamente ridotta ed al di sotto del limite richiesto dall'indicatore in contrasto con le attese coerenti con uno scale up di produzione industriale (vedi prova 3.1.2.2).

Tabella 1C. Sono riportate le rese di estrazione con CO₂ in stato supercritico (SFE) di tutte le matrici essiccate. I valori sono espressi in percentuale peso/peso (g di estratto/100 grammi di matrice iniziale di sottoprodotto). I valori si riferiscono al dato medio di 3 differenti esperimenti (dev. st. <5%).

Campioni	Resa% SFE
VINACCE ROSSE	4,99*
VINACCE BIANCHE	1,67*
RASPI	4,75*
VINACCIOLI	7,46*
FOGLIE di VITE var. Lambrusco	5,61*
MELE	1,85*
PERE	1,93*
SANSE	6,77*
BUCCE DI POMODORO	8,79*
CECI	3,32*
MIX FAGIOLI	5,54*
CANNELLINI	2,20*
FAGIOLINI	4,91*

L'estrazione con fluidi supercritici (SFE) offre diversi vantaggi operativi rispetto ai metodi di estrazione convenzionale, poiché grazie alla bassa viscosità e alla relativamente alta diffusività della CO₂ ha capacità di trasporto superiori a quelle dei liquidi, può diffondersi facilmente attraverso i materiali solidi e può quindi fornire velocità di estrazione più rapide. Una delle caratteristiche principali di un fluido supercritico è la possibilità di modificare la densità del fluido modificandone la pressione e/o la temperatura. Per queste motivazioni e per suo il carattere *green*, questa metodica è stata presa in considerazione ponendo come parametro soglia per un suo uso coerente con un possibile *scale up* produttivo ed applicativo una resa estrattiva non inferiore al 10%: i risultati di questa serie di estrazioni hanno mostrato rese estrattive inferiori a tale parametro per tutte le matrici di scarto considerate.

CONCLUSIONI

Le migliori rese estrattive totali ottenute con macerazione assistita da ultrasuoni (UAE) sono state conseguite dai campioni di scarto della lavorazione delle mele con solo solvente alcolico (etanolo 100%). I dati di resa ottenuti dalle altre matrici, invece, si dividono abbastanza equamente tra quelle che hanno mostrato una resa alta nelle estrazioni con EtOH:H₂O in proporzione 50:50 (vinacce rosse e bianche, raspi, vinaccioli, pere, sanse e fagiolini) e quelle che hanno ottenuto una resa alta nelle estrazioni fatte con 100% H₂O (foglie di vite, bucce di pomodoro, ceci, mix fagioli e fagioli cannellini). Quello che caratterizza tutte le estrazioni è comunque il ridotto uso di solvente organico a beneficio delle finalità del progetto e della presente sottoazione rispetto all'utilizzo di metodiche a basso impatto ambientale. Infine, rispetto a quanto atteso dal progetto, tutte le rese totali erano al di sopra del 15% tranne quelle di sanse e vinaccioli.

I dati di resa totale ottenuti per le estrazioni UAE e MAE (Tabella 1A) evidenziamo come, secondo la nostra esperienza, le estrazioni assistite da ultrasuoni (UAE) possano produrre fitocomplessi che più si avvicinano

alle attese previste dal progetto relativamente alle rese estrattive minime del 15% e come questa tecnica sia maggiormente duttile per il trattamento di svariate matrici di scarto rispetto alla MAE.

Per l'idrodistillazione le rese di estrazione sono tutte mediamente ridotte. Sebbene le quantità siano in linea per diverse matrici con l'indicatore di risultato, l'espressione composizionale in biomolecole attive è estremamente ridotta ed al di sotto del limite richiesto dall'indicatore in contrasto con le attese coerenti con uno scale up di produzione industriale (vedi prova 3.1.2.2). L'estrazione con fluidi supercritici, invece, ha mostrato rese estrattive inferiori al parametro indicatore (10%) per tutte le matrici di scarto considerate.

Tra le matrici di particolare interesse erano presenti le bucce di pomodoro, ed anche se la resa estrattiva è rimasta al di sotto della soglia di interesse stabilita dagli indicatori del progetto, si è proceduto con una valutazione chimica preliminare a causa del loro possibile contenuto di *trans*-licopene. Le analisi HPLC degli estratti non hanno mostrato la presenza di tale molecola forse a causa della degradazione o dell'isomerizzazione della molecola nella matrice di scarto a causa di una prolungata esposizione a calore ed irraggiamento luminoso. Constatato questo, potremmo concludere che la scarsa resa dell'estrazione SFE ed il mancato contenuto di *trans*-licopene potrebbe essere dovuto al metodo di lavorazione della materia prima ed alla conservazione della matrice post-trattamento.

Tra le materie prime secondarie ottenute da Conservitalia riconducibili ai legumi (ceci, mix fagioli, fagioli cannellini e fagiolini), la matrice fagioli mix e fagiolini estratte tramite macerazione con solvente idroalcolico assistita da ultrasuoni (UAE) hanno mostrato rese in accordo con i valori indicati nel progetto (15%). In particolare, i fagiolini estratti con etanolo 50% hanno ottenuto una resa elevata che si avvicina a quello più elevato tra tutti i processi estrattivi effettuati (39,76% rispetto al 40,03% dell'estratto di Mele in EtOH 100%). Gli estratti ottenuti da queste matrici in solvente acquoso o idroalcolico sono caratterizzati da una notevole presenza zuccherina, evidenziato dallo spettro NMR protonico in Figura 1C, che, molto probabilmente, è la responsabile della alta resa totale del suddetto estratto.

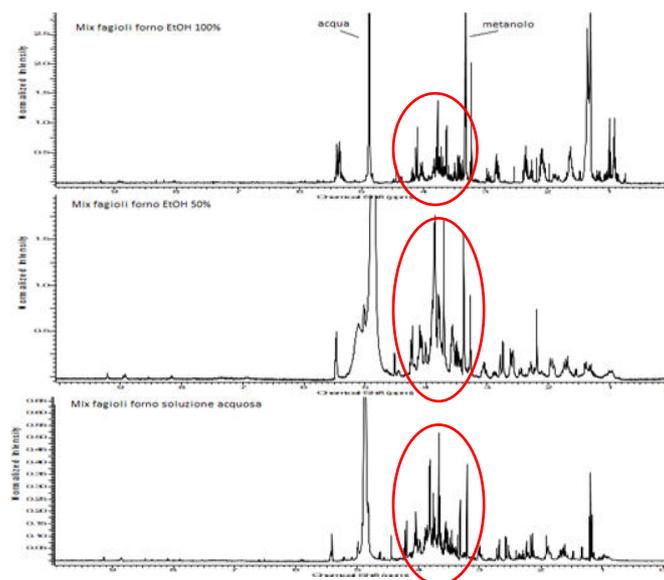


Figura 1C. confronto all'NMR H1 tra mix fagioli essiccati al forno in EtOH 100% (in alto), Mix fagioli in EtOH al 50% e mix di fagioli in soluzione acquosa (in basso).

L'importante differenza quantitativa di resa tra le matrici esaminate nelle diverse annate (quantità di fenoli totali diminuita di circa 10 volte), con particolare riferimento ai raspi, suggerisce la necessità di un subitaneo trattamento delle matrici post-lavorazione o sul valore di un sistema di stoccaggio efficace degli scarti prima della loro rivalutazione.

Prova 3.1.2.2. Prove di valutazione della componente fenolica e terpenica

È stata valutata la componente fenolica e terpenica negli estratti ottenuti nella prova 3.1.2.1. mediante screening semiquantitativo impiegando tecniche di cromatografia su strato sottile per guidare

l'ottimizzazione dei processi estrattivi e per la verifica del processo estrattivo più efficace nell'ottenimento di estratti arricchiti delle componenti molecolari di interesse. Queste prove sono finalizzate all'ottenimento di outputs utili alla ottimizzazione ulteriore di ogni processo estrattivo rispetto alla differente matrice di scarto pretrattata (sottoazione 3.1.1) e agli estratti arricchiti delle biomolecole di interesse da ottenere, anche rispetto alle matrici di scarto di nuova fornitura. Anche le fecce di estrazione (biomasse residue) sono state oggetto della presente prova. Per la valutazione semiquantitativa della componente fenolica e terpenica è stata effettuata per ogni matrice pretrattata una valutazione su lastra TLC.

MATERIALI E METODI

La caratterizzazione chimica degli estratti è stata focalizzata sulla rilevazione delle principali classi di composti generalmente noti per proprietà funzionalmente utili nei contesti di ricaduta della ricerca, in particolare: polifenoli, fenoli semplici, flavonoidi e derivati, acidi organici, eventualmente attesi con rilevante abbondanza negli estratti idroalcolici (UAE) delle matrici studiate; composti terpenici e derivati (mono-, sesqui-, di-terpeni) eventualmente attesi con rilevante abbondanza negli estratti ottenuti con la distillazione in corrente di vapore d'acqua (idrodistillazione).

Contenuto in polifenoli totali: analisi spettrofotometriche: La determinazione del contenuto polifenolico totale negli estratti è stata eseguita utilizzando uno spettrofotometro Helios-Gamma, ThermoSpectronic seguendo le metodiche precedentemente descritte in Tacchini et al. (2015; Natural Product Research, 29(22), 2071–2079). I risultati sono stati espressi come mg di acido gallico/g di estratto secco per la quantificazione dei polifenoli totali e mg di cianidin cloruro/g di estratto secco per la quantificazione delle proantocianidine totali.

Contenuto in polifenoli: Analisi cromatografica su strato sottile ad alta risoluzione (HP)TLC: Le analisi sono state eseguite su una lastra di gel di silice HPTLC 60F254 (10 cm 20 cm; Camag, Switzerland). 8 µl di una soluzione etanolica al 50% degli estratti (20 mg/ml) sono stati depositati sulla lastra in bande di 6 mm di ampiezza utilizzando un microdepositore Linomat V (Camag, Switzerland) in flusso di azoto. Le bande depositate sono state eluite con un sistema eluente composto di due step successivi ed una derivatizzazione con soluzione NP-PEG (Wagner e Bladt, 2009; Plant drug analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas, second Edition, Springer Verlag, Berlin) per la valutazione di flavonoidi; ed un sistema eluente successivamente derivatizzato con una soluzione di acido solforico e vanillina per la detezione di proantocianidine (Wagner e Bladt, 2009; Plant drug analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas, second Edition, Springer Verlag, Berlin).

Contenuto in polifenoli: Analisi cromatografica liquida ad alta risoluzione in fase inversa RP-HPLC-DAD: La caratterizzazione dei campioni finalizzata alla rilevazione dei principali flavonoidi è stata eseguita sui campioni di estrazione idroalcolica utilizzando un sistema HPLC modulare JASCO (Tokyo, Giappone, modello PU 2089) accoppiato ad un detector a fotodiodi (MD 2010 Plus). Per l'analisi si è fatto riferimento a quanto riportato in Tacchini et al. (2015; Natural Product Research, 29(22), 2071–2079).

Contenuto in polifenoli (Analisi con spettrometro di massa): La caratterizzazione dei campioni finalizzata alla rilevazione dei principali flavonoidi è stata eseguita sui campioni di estrazione idroalcolica utilizzando uno spettrometro di massa FinniganMAT LCQ (ThermoQuest Corp./FinniganMAT; San Jose, CA), dotato di un analizzatore di massa a trappola ionica e di una sorgente ionica ESI elettrospray, in modalità ionica negativa. Per l'analisi si è fatto riferimento a quanto riportato in Tacchini et al. (2021; Molecules, 26,84).

Contenuto in terpeni: Analisi gas cromatografica accoppiata a spettrometria di massa: Le analisi gas cromatografiche sono state sviluppate sui campioni ottenuti dalla distillazione di matrici fresche e non essiccate. Le analisi sono state sviluppate seguendo le indicazioni riportate in Tardugno et al. (2018; Plant Biosystems, 152(1, 2), 120-129). L'analisi gas cromatografica risulta elettiva per la valutazione di composti terpenici.

RISULTATI

Contenuto in polifenoli totali: analisi spettrofotometriche

I risultati ottenuti relativamente al contenuto di composti fenolici totali (TPC) sono riportati in tabella 1A per quanto riguarda gli estratti delle macerazioni assistite da ultrasuoni (UAE) ed in 1B per quanto attiene ai prodotti della idrodistillazione e in entrambi i casi i dati sono espressi come grammi di acido gallico (AG) per 100 grammi di matrice (scarto) di partenza. L'analisi è stata effettuata per via spettrofotometrica (Tacchini et al. (2015; Natural Product Research, 29(22), 2071–2079).

Tabella 1A. Contenuto in polifenoli totali (TPC) espressi in grammi di acido gallico (AG) per 100 grammi di matrice iniziale (sottoprodotto). I valori si riferiscono al dato medio di 3 differenti esperimenti (\pm deviazione standard). In rosso i campioni che hanno soddisfatto l'indice di risultato del contenuto minimo di biomolecole attive (non meno dell'1%).

Campioni	TPC (g AG/100g)	
VINACCE ROSSE	2,638	\pm 0,009
VINACCE BIANCHE	1,574	\pm 0,007
RASPI	2,036	\pm 0,011
VINACCIOLI	5,189	\pm 0,005
FOGLIE var. Lambrusco	0,993	\pm 0,005
MELE	0,980	\pm 0,001
PERE	2,521	\pm 0,008
SANSE	1,466	\pm 0,008
BUCCE DI POMODORO	0,043	\pm 0,001
CECI	0,003	\pm 0,001
MIX FAGIOLI	0,529	\pm 0,012
CANNELLINI	0,267	\pm 0,004
FAGIOLINI	1,059	\pm 0,036

L'estrazione in etanolo: acqua 50% è stata quella che poi ha determinato nell'analisi spettrofotometrica il maggior contenuto in polifenoli per tutte le matrici considerate. Ne consegue che in relazione ai risultati ottenuti nella *Prova 3.1.2.1. (Prove estrattive sulle matrici pretrattate)* la miscela di estrazione etanolo (EtOH:acqua) 50:50 risulta la più efficace ai fini della resa in polifenoli totali.

In particolare, i migliori risultati in termini di contenuto di fenoli totali (TPC) sono stati ottenuti dagli estratti di vinaccioli (5,189 \pm 0,005 grammi di acido gallico per 100 grammi di sottoprodotto secco), seguiti da quelli di vinacce rosse (2,638 \pm 0,009 g AG/100g di sottoprodotto secco), pere (2,521 \pm 0,008 g AG/100g di sottoprodotto secco) e raspi (2,036 \pm 0,011 g AG/100g di sottoprodotto secco). Va sottolineato il fatto che pur essendo i vinaccioli la matrice che ha evidenziato una resa estrattiva tra le più basse tra le matrici che hanno mostrato affinità per la miscela EtOH:H₂O 50% (tabella 1A, *Prova 3.1.2.1. Prove estrattive sulle matrici pretrattate*) la stessa ha invece evidenziato il maggior contenuto in biomolecole di interesse, con più del 50% in peso dell'estratto ottenuto (vedi tabella 1A, *Prova 3.1.2.1. Prove estrattive sulle matrici pretrattate*) costituito di polifenoli. In tabella sono evidenziati in rosso gli estratti che hanno soddisfatto l'indice di risultato rispetto al contenuto di biomolecole attive, polifenoli in questo caso.

Tabella 1B. Contenuto in polifenoli totali (TPC) espressi in grammi di acido gallico (AG) per 100 grammi di matrice iniziale (sottoprodotto) caratterizzata dai residui post-distillazione. Nei prodotti di distillazione tal quale (*) non sono presenti polifenoli. I valori si riferiscono al dato medio di 3 differenti esperimenti (\pm deviazione standard). In rosso i dati che soddisfano l'indicatore di risultato relativo al contenuto minimo di biomolecole attive.

Campioni	TPC (AG/100 g)	
VINACCE ROSSE DISTILLATO	*	
VINACCE ROSSE ACQUA AROMATICA	2,393	\pm 0,009
VINACCE ROSSE FECCIA EtOH 50%	0,387	\pm 0,016
VINACCE BIANCHE DISTILLATO	*	
VINACCE BIANCHE ACQUA AROMATICA	1,169	\pm 0,009
VINACCE BIANCHE FECCIA EtOH 50%	0,169	\pm 0,011
RASPI DISTILLATO	*	
RASPI ACQUA AROMATICA	1,753	\pm 0,002
RASPI FECCIA EtOH 50%	0,270	\pm 0,008
VINACCIOLI DISTILLATO	*	
VINACCIOLI ACQUA AROMATICA	3,038	\pm 0,011
VINACCIOLI FECCIA EtOH 50%	0,438	\pm 0,008
MELE DISTILLATO	*	
MELE ACQUA AROMATICA	0,211	\pm 0,000
MELE FECCIA EtOH 50%	0,076	\pm 0,003
PERE DISTILLATO	*	
PERE ACQUA AROMATICA	0,573	\pm 0,000
PERE FECCIA EtOH 50%	0,203	\pm 0,003

Nota: Il contenuto in polifenoli delle sanse nei campioni di idrodistillazione non sono stati rilevati dal momento che il processo estrattivo non risultava coerente con la stabilità della matrice di partenza, rendendo di fatto inefficace l'approccio estrattivo per questa tipologia di matrici. In particolare, infatti, durante il processo di idrodistillazione, le sanse determinavano un effetto matrice tale da rendere impossibile il recupero del distillato, e quindi la separazione tra i differenti sottoprodotti della distillazione non è risultata possibile. In conclusione, per questa tipologia di matrice il processo di estrazione per ultrasuoni è risultato unico ed elettivo nella sua applicazione finalizzata al recupero di polifenoli (tabella 1A).

I campioni contenuti dal processo di distillazione tal quale (*, tabella 1B) non presentavano polifenoli dal momento che la tipologia di estrazione di per sé non risulta adeguata ad ottenere tale tipologia di composti. Tuttavia, in linea con l'approccio applicativo che caratterizza il progetto, sono stati valutati per il contenuto di polifenoli totali i sottoprodotti restanti dai processi di distillazione, ovvero le fecce (matrici vegetali

esauste) e le acque di distillazione. Questa valutazione è stata effettuata per massimizzare le opportunità di resa in questi composti bioattivi e utili alle finalità del progetto, qualora il processo estrattivo stesso ne determinasse una maggiore ripartizione nella feccia piuttosto che nelle acque di distillazione (acque aromatiche).

Le acque aromatiche nella filiera vitivinicola rappresentano già di per sé uno scarto dal momento che sono il frutto della dealcolazione delle vinacce, processo imposto dalle normative europee (European Council Regulation 1493/1999). Dai nostri risultati emerge che proprio le acque derivate dalla idrodistillazione contengono circa il 90% dei polifenoli totali. Il restante 10% rimane invece presente nella feccia mentre, come già sottolineato ed atteso, i polifenoli erano assenti nei distillati (* in tabella 1B).

A titolo d'esempio, nelle vinacce rosse, l'86% dei polifenoli ($2,393 \pm 0,009$ AG/100 g) è stato rilevato nelle acque aromatiche, mentre il restante 14% nella feccia. Analogo risultato si è registrato con le vinacce bianche, con i vinaccioli e con i raspi dove nelle acque aromatiche si ripartiva la maggiore quantità di polifenoli, fino a valori prossimi compresi tra 80% e 85%. Da ultimo, il contenuto totale in polifenoli per tipologia di matrice vitivinicola era confrontabile con quanto rilevato nei corrispondenti estratti ottenuti con ultrasuoni (tabella 1A): ovvero, i valori negli estratti UAE erano analoghi alla somma di quanto rilevato nelle fecce e nelle acque aromatiche dopo idrodistillazione (tabella 1B). Questo significa che i processi estrattivi posti in essere risultavano comparabilmente efficaci ed esaustivi per l'ottenimento di polifenoli da matrici vitivinicole.

Per quanto attiene ai risultati relativi alle matrici di mele e pere (feccia e acque aromatiche; tabella 1B) i risultati in termini quantitativi di polifenoli erano molto inferiori rispetto ai valori ottenuti in media dalle matrici della filiera vitivinicola, ovvero compresi mediamente tra il 75% e l'85% in meno. Inoltre, non si è osservata una ripartizione così netta nel contenuto in polifenoli tra la feccia e le acque aromatiche. In particolare, sia per i campioni di pere sia di mele, circa il 30% in polifenoli totali era ripartito nelle fecce, contrariamente a quanto rilevato per gli scarti della filiera vitivinicola dove i valori oscillavano tra il 15% ed il 20%. Ulteriore aspetto da sottolineare è che, sia per gli scarti di mele sia di pere, il contenuto totale di polifenoli negli estratti UAE (tabella 1A) presentava una flessione del 30% rispetto a alla somma dei polifenoli totali nei residui di distillazione (tabella 1B).

I differenti risultati relativi al contenuto in composti fenolici tra gli scarti della filiera vitivinicola e quelli della lavorazione di mele e pere (tabella 1A e 1B), sono da attribuirsi sia al differente tipo di matrice vegetale sia al differente processo di filiera che le stesse hanno subito.

Contenuto in polifenoli: Analisi cromatografica su strato sottile ad alta risoluzione (HP)TLC

Gli estratti UAE e i sottoprodotti della idrodistillazione (fecce e acque aromatiche) di vinacce di uve bianche e rosse, vinaccioli, raspi, scarti di lavorazione di mele pere e olive (sanse) sono stati valutati qualitativamente per il contenuto di composti fenolici (con particolare riferimento a flavonoidi e acidi fenolici) utilizzando la cromatografia su strato sottile ad alta risoluzione (HP-TLC). Le differenti categorie di composti fenolici si evidenziano sulle lastre come bande separate e di colorazione differente (giallo, arancio, blu) (Figure 1, 2). Il numero e l'intensità delle bande sulle lastre è correlabile al numero e alla differente abbondanza relativa dei composti fenolici.

Confronto estrazione di flavonoidi tra residui di distillazione ed estrazione diretta

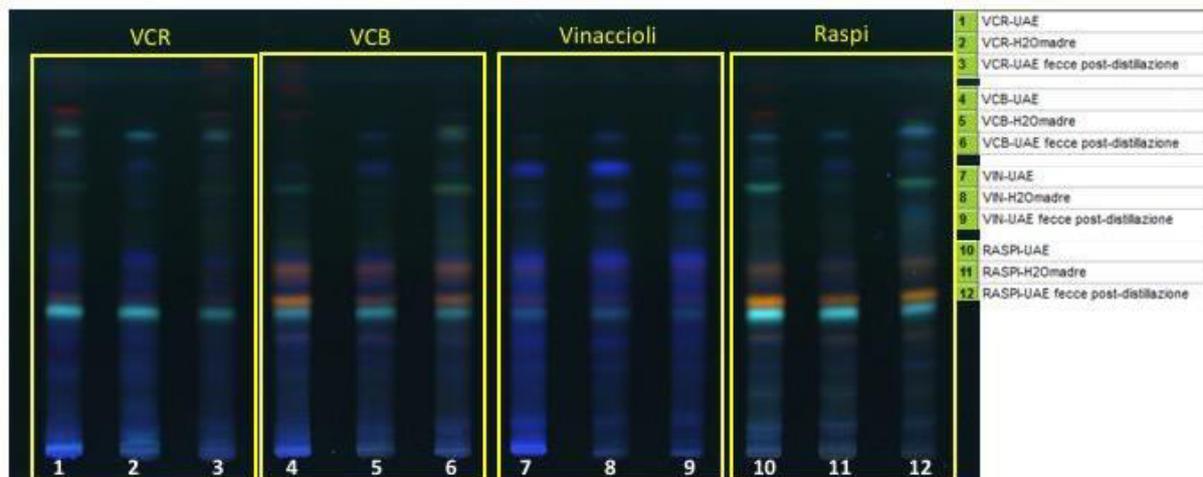


Figura 1. HP-TLC comparativa per le matrici vitivinicole degli estratti UAE (1, 4, 7, 10), delle acque aromatiche (in legenda H₂Omadre; 2, 5, 8, 11) e delle fecce di distillazione (3, 6, 9, 12). Tutte le bande presenti e distinguibili come separate rappresentano i composti fenolici che caratterizzano gli estratti. VCR-UAE: estratto idroalcolico 50% con ultrasuoni di vinacce rosse; VCR-H₂Omadre: acque aromatiche di idrodistillazione delle vinacce rosse; VCR-UAE fecce post-distillazione: estratto idroalcolico con ultrasuoni delle fecce di vinaccia rossa ottenute come residuo di idrodistillazione. VCB-UAE: estratto idroalcolico 50% con ultrasuoni di vinacce bianche; VCB-H₂Omadre: acque aromatiche di idrodistillazione delle vinacce bianche; VCB-UAE fecce post-distillazione: estratto idroalcolico con ultrasuoni delle fecce di vinaccia bianche ottenute come residuo di idrodistillazione. VIN-UAE: estratto idroalcolico 50% con ultrasuoni di vinaccioli; VIN-H₂Omadre: acque aromatiche di idrodistillazione di vinaccioli; VIN-UAE fecce post-distillazione: estratto idroalcolico con ultrasuoni delle fecce di vinaccioli ottenute come residuo di idrodistillazione. RASPI-UAE: estratto idroalcolico 50% con ultrasuoni di raspi; RASPI-H₂Omadre: acque aromatiche di idrodistillazione di raspi; RASPI-UAE fecce post-distillazione: estratto idroalcolico con ultrasuoni delle fecce di raspi ottenute come residuo di idrodistillazione.

Confronto QUALITATIVO tra estrazione di flavonoidi tramite distillazione ed estrazione UAE.

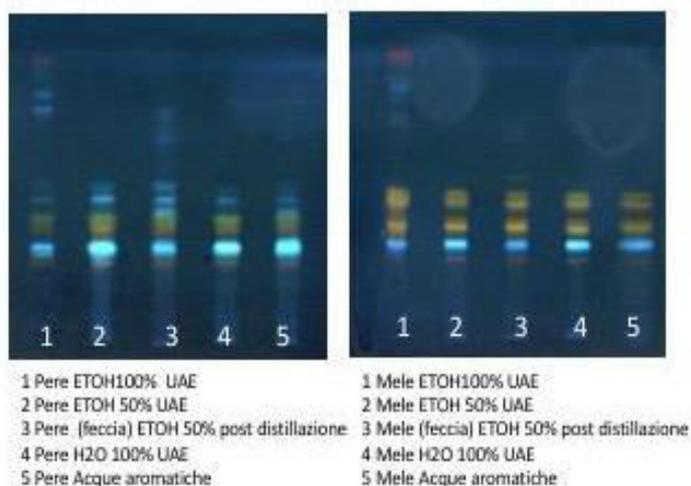


Figura 2. HP-TLC comparativa per gli estratti ottenuti dalle matrici degli scarti di pere (lastra sx) e mele (lastra a dx) in UAE (EtOH 100%, 1; EtOH 50%, 2; Acqua 100%, 4) delle acque aromatiche (5) e delle fecce di distillazione (3). Tutte le bande presenti e distinguibili come separate rappresentano i composti fenolici che caratterizzano gli estratti.

Lo sviluppo delle lastre HP-TLC ha messo in evidenza la bontà della scelta della miscela idroalcolica come solvente di estrazione e del rapporto quantitativo etanolo:acqua (50:50) dal momento che le classi di polifenoli si separano correttamente diventando così ben visibili e distinguibili.

Gli estratti degli scarti di filiera vitivinicola separati con il primo sistema eluente, hanno evidenziato lungo tutta la lunghezza della lastra, in particolare da Rf (retention factor) 0 a 0,9, la presenza di molecole di interesse, rappresentate in questo caso da flavonoidi ed acidi fenolici, distinguibili per la loro caratteristica colorazione arancio, verde, blu (flavonoidi) ed azzurro (acidi fenolici). Una caratterizzazione chimica più puntuale permetterà nella prossima fase del progetto l'identificazione delle molecole.

Per quanto riguarda gli estratti ricavati dagli scarti di lavorazione di mele e pere, le bande di interesse si concentrano tra Rf 0,2 e Rf 0,55, indicando la maggior idrofilia delle molecole di interesse presenti nei fitocomplessi, facendo pensare a molecole flavonoidiche glicosilate.

Gli estratti UAE di sanse (Figura 3) si discostano leggermente dai risultati analizzati finora negli estratti di scarti della filiera vitivinicola e di mele e pere, in quanto le molecole di interesse risultano essere distribuite tra Rf 0 ed Rf 6,5.

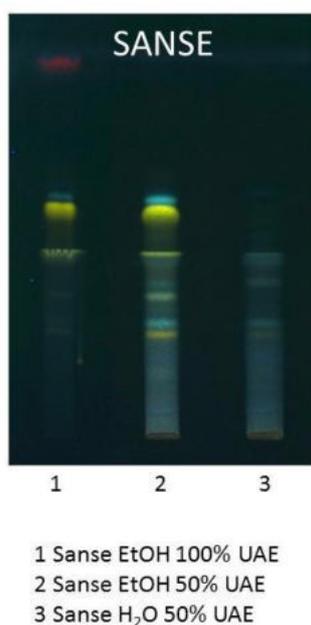


Figura 3. HP-TLC comparativa per gli estratti ottenuti dalle matrici di scarto delle olive (sanse) in UAE (EtOH 100%, 1; EtOH 50%, 2; Acqua 100%, 3). Tutte le bande presenti e distinguibili come separate rappresentano i composti fenolici che caratterizzano gli estratti.

La valutazione del contenuto di procianidine (Figura 4A relativa agli scarti vitivinicoli; Figura 4B, relativa agli scarti di mele e pere), effettuata con il secondo metodo eluente, ha mostrato la presenza, in tutti gli estratti analizzati (scarti filiera vitivinicola, mele e pere), di bande con Rf 0,9 e 0,7 identificate, per confronto con standard puri acquistati nel circuito commerciale, in epi/catechina e del suo dimero di tipo B. Inoltre, ad Rf minori si riconoscono altre bande, distinguibili grazie alla derivatizzazione con acido solforico e vanillina, attribuibili a oligomeri di procianidine (es. ad Rf 0,5 è presente il trimero) non ancora identificate in modo puntuale.

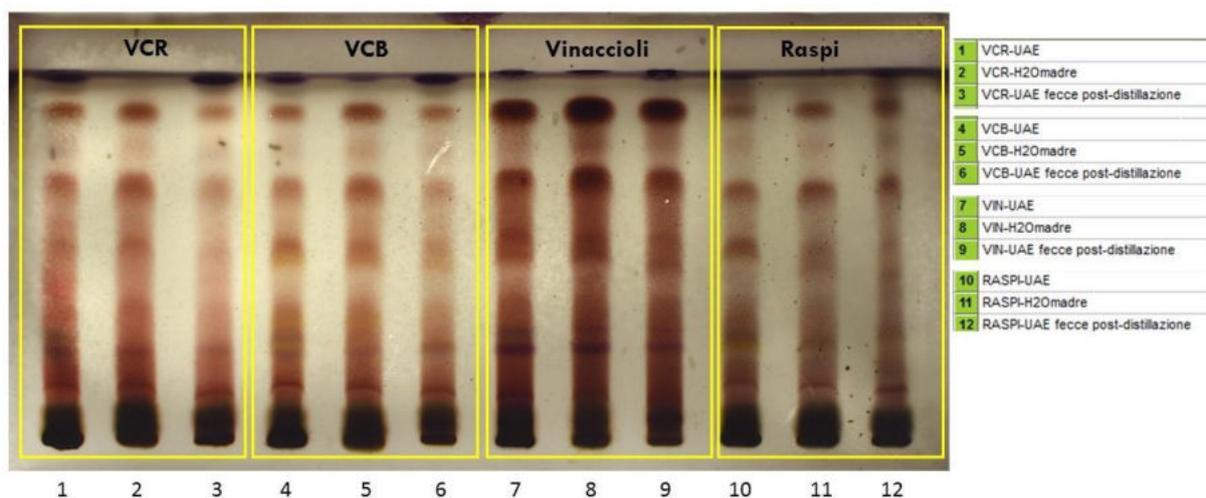


Figura 4A. HP-TLC comparativa per gli estratti ottenuti dalle matrici degli scarti vitivinicoli, UAE (1, 4, 7, 10), delle acque aromatiche (2, 5, 8, 11) e delle fecce di distillazione (3, 6, 9, 12). Tutte le bande presenti e distinguibili come separate rappresentano procianidine e loro oligomeri che caratterizzano gli estratti.

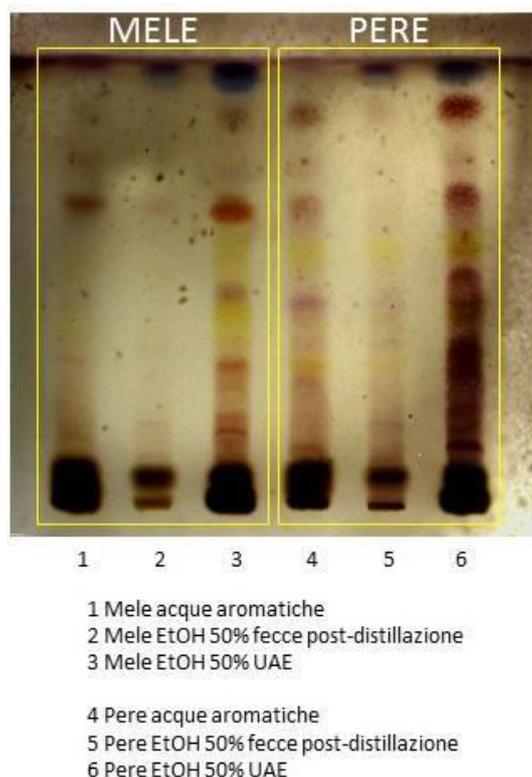


Figura 4B. HP-TLC comparativa per gli estratti ottenuti dalle matrici degli di mele e pere, UAE (3, 6), delle acque aromatiche (1, 4) e delle fecce di distillazione (2, 5). Tutte le bande presenti e distinguibili come separate rappresentano procianidine e loro oligomeri che caratterizzano gli estratti.

Si è deciso di proseguire con l'analisi più approfondita dell'estratto etanologico degli scarti di lavorazione di pera ottenuto con EtOH 50%, perché ha mostrato la miglior resa estrattiva ed il profilo fenolico più ricco. La HPTLC in figura 4C mostra il confronto tra tale estratto e standard di riferimento, quali l'acido clorogenico, l'acido caftarico, l'iperoside, la rutina, la quercetina-3-O-gluconide, quercetina e isoquercetina. Questi sono stati scelti sulla base dei dati presenti in letteratura (Suárez et al., 2010) (Vodnar et al., 2017) (Makris et al., 2007)

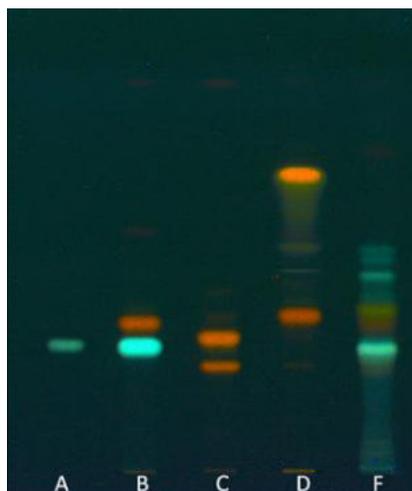


Figura 4C. Estrazione mediante ultrasuoni con EtOH 50% di scarti di lavorazione di pera. La lastra è stata derivatizzata con NP/PEG e visualizzata a 366 nm. Per operare un confronto diretto, insieme al fitocomplesso sono state depositate molecole pure: acido clorogenico (A a Rf: 0,40), acido caftarico (B a Rf: 0,30), iperoside (B a Rf: 0,36), rutina (C a Rf: 0,26), quercetina-3-O-glucuronide (C a Rf: 0,32), quercetina (D a Rf: 0,73) e isoquercetina (D a Rf: 0,38).

Confrontando gli Rf dell'estratto in esame con quelli di standard puri, le bande colorate di azzurro-blu corrispondenti a Rf 0,40 e Rf 0,30 potrebbero corrispondere, rispettivamente, ad acido clorogenico e ad acido caftarico, mentre quella colorata di arancione a Rf 0,38 ad un esoso della quercetina. Dopo aver effettuato questo screening si è reso necessario entrare più nel dettaglio, facendo una caratterizzazione più puntuale utilizzando la cromatografia liquida (RP-HPLC) accoppiata ad un detector UV (DAD, diode array detector) ed uno spettrometro di massa.

Per quanto concerne gli estratti di scarti di lavorazione della mela, è stato deciso di proseguire con un'analisi HPTLC più approfondita dell'estratto EtOH 50%, essendo quello che ha mostrato il profilo fenolico più ricco. La HPTLC in figura 4D mostra il confronto tra tale estratto e standard di riferimento, quali l'acido clorogenico, l'acido caftarico, l'iperoside, la rutina, la quercetina-3-O-glucuronide, quercetina e isoquercetina. Questi sono stati scelti sulla base dei dati presenti in letteratura (Suárez et al., 2010) (Diñeiro García et al., 2009) (Kennedy et al., 1999) (Gliszczynska-Swiglo and Tyrakowska, 2003).

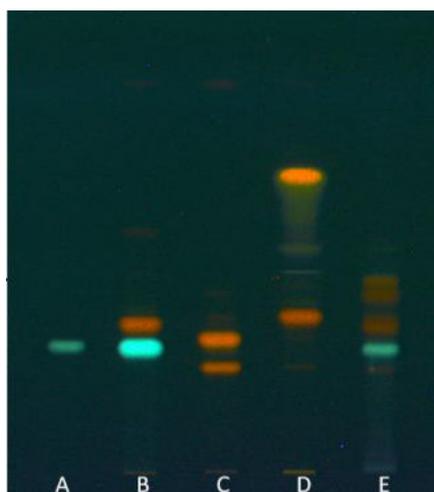


Figura 4D Estrazione mediante ultrasuoni con EtOH 50% di scarti di lavorazione di mela. La lastra è stata derivatizzata con NP/PEG e visualizzata a 366 nm. Per operare un confronto diretto, insieme al fitocomplesso sono state depositate molecole pure: acido clorogenico (A a Rf: 0,40), acido caftarico (B a Rf: 0,30), iperoside (B a Rf: 0,36), rutina (C a Rf: 0,26), quercetina-3-O-glucuronide (C a Rf: 0,32), quercetina (D a Rf: 0,73) e isoquercetina (D a Rf: 0,38).

Confrontando gli Rf dell'estratto in esame con quelli di standard puri, la banda colorata di azzurro-blu a Rf 0,40 potrebbe corrispondere ad acido clorogenico, mentre quella colorata di arancione a Rf 0,38 ad un esoso della quercetina. Dopo aver effettuato questo screening, come per l'estratto di pera, anche in questo caso si è deciso di entrare più nel dettaglio, facendo una caratterizzazione più puntuale utilizzando la cromatografia liquida (RP-HPLC) accoppiata ad un detector UV (DAD, diode array detector), ed uno spettrometro di massa.

Contenuto in polifenoli: Analisi cromatografica liquida ad alta risoluzione in fase inversa RP-HPLC

Per ottimizzare metodologicamente l'estrazione di fenoli totali (TPC) e quindi rendere la valutazione quantitativa del loro contenuto nelle foglie di vite lambrusco (scarti da potature) la più accurata possibile è stato sperimentato un approccio *in silico* (Design of Experiment, DOE). Puntando, quindi, ad ottenere l'estrazione più performante per i fenoli, il metodo è stato messo a punto rispetto a tre variabili ovvero: tempo di estrazione, rapporto solvente/solido (foglie da estrarre), qualità del solvente utilizzato per l'estrazione (EtOH: 100%; EtOH:Acqua 50:50; Acqua: 100%) (Tabella 2).

Tabella 2. Combinazioni delle variabili di Design of Experiment [DOE; tempo di estrazione, rapporto solvente/solido (=matrice da estrarre), qualità del solvente utilizzato per l'estrazione (EtOH: 100%; EtOH:Acqua 50:50; Acqua: 100%)] per l'ottimizzazione della qualità degli estratti UAE sulle foglie da potature da uve lambrusco.

Estratto	Solvente % Etanolo	Tempo (min)	Rapporto Solvente/solido
1	0	10	10
2	100	10	10
3	0	60	10
4	100	60	10
5	0	10	30
6	100	10	30
7	0	60	30
8	100	60	30
9	50	35	20
10	50	35	20
11	50	35	20

Le condizioni più performanti sono risultate essere quelle degli estratti 9, 10, 11 che vedono le condizioni di estrazione mediane ovvero: tempo, 35 min; rapporto solvente/solido, 20:1; solvente, EtOH:Acqua 50:50. Gli estratti così ottenuti (9, 10, 11) analizzati tramite RP-HPLC hanno evidenziato la maggiore quantità di polifenoli rispetto agli altri estratti del DOE, con un fingerprinting principalmente caratterizzato da flavonoidi (rutina, miquelianina/iperoside, nictoflorina, astragalina, quercetina) e da acido caftarico (Figura 5).

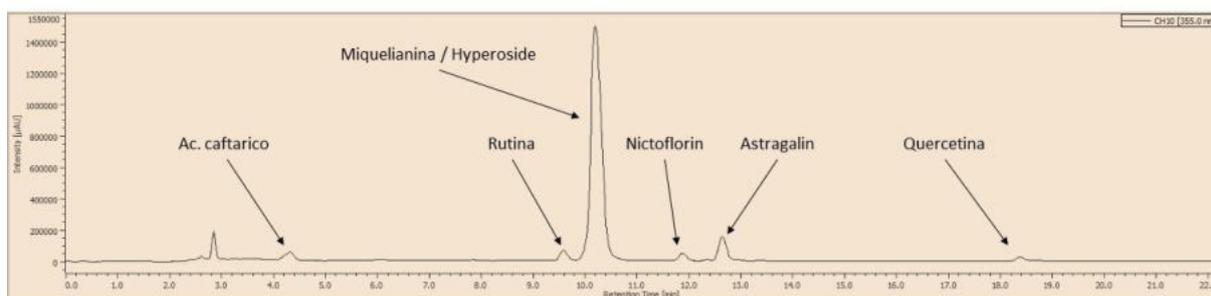


Figura 5. Cromatogramma RP-HPLC-DAD relativo agli estratti DOE (9, 10, 11) più performanti rispetto al contenuto in polifenoli totali. I picchi identificano i principali polifenoli rinvenuti (flavonoidi ed acido caftarico).

La quantità dei polifenoli totali è stata determinata con metodo spettrofotometrico (Figura 6), rispettando la metodica già utilizzata per gli estratti relativi agli altri scarti. Come emerge anche da questo riscontro quantitativo, gli estratti 9, 10, 11, risultano essere i più ricchi in polifenoli totali come previsto dall'approccio DOE.

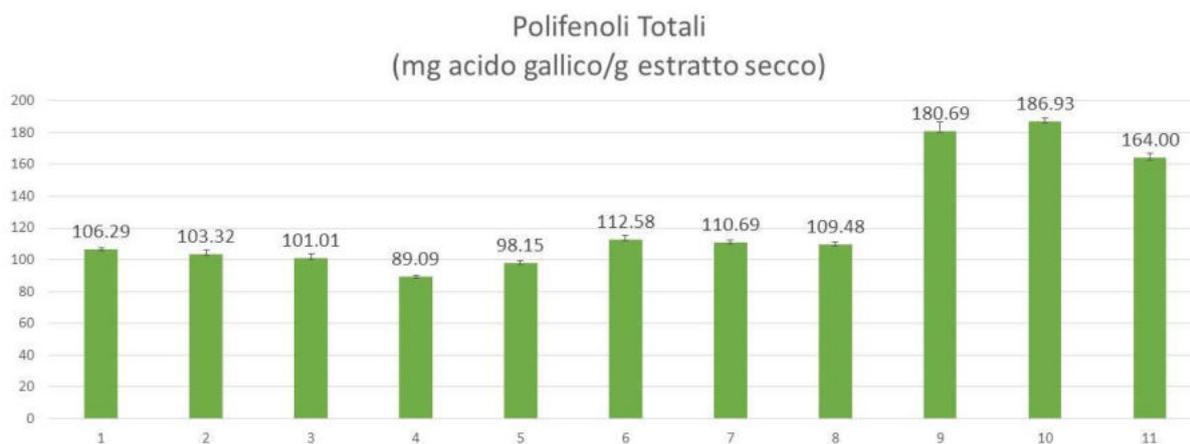


Figura 6 - Quantità dei polifenoli totali determinata con metodo spettrofotometrico

L'estratto di scarti di pera, risultato essere uno dei più ricchi in polifenoli, è stato analizzato via RP-HPLC-DAD per meglio caratterizzare la componente fenolica. Il cromatogramma (Figura 7) ha rivelato un fitocomplesso abbastanza semplice, caratterizzato principalmente da un picco principale a Rt 19.87 min e da altri picchi secondari che mostrano un profilo UV proprio dei flavonoidi a tempi di ritenzione elevati. Il picco maggioritario mostrava un massimo di assorbimento ad una lunghezza d'onda di 327nm (λ_{max}) ed un tempo di ritenzione congruente con quello dell'acido clorogenico. Anche le analisi MS hanno mostrato uno spettro riconducibile all'acido clorogenico a m/z 353. Conferma finale è stata data da un esperimento di arricchimento in RP-HPLC-DAD. Successivamente è stata costruita, in HPLC, una curva di taratura utilizzando soluzioni a concentrazione nota di acido clorogenico. Tale molecola è risultata essere presente negli scarti di lavorazione in una quantità pari a $0,62 \pm 0,05$ mg/grammo di matrice essiccata. Grazie al confronto con lo standard iniettato in HPLC, il picco a Rt 12 min è stato identificato come acido caftarico, ed il dato è stato poi confermato utilizzando la spettrometria di massa. Quest'ultima analisi ha anche mostrato la presenza nel fitocomplesso di epi/catechina (MS: m/z 289; MS/MS: m/z 245, 205, 179) e suoi oligomeri (dimero con m/z 577 e trimero con m/z 865) e di possibili molecole flavonoidiche.

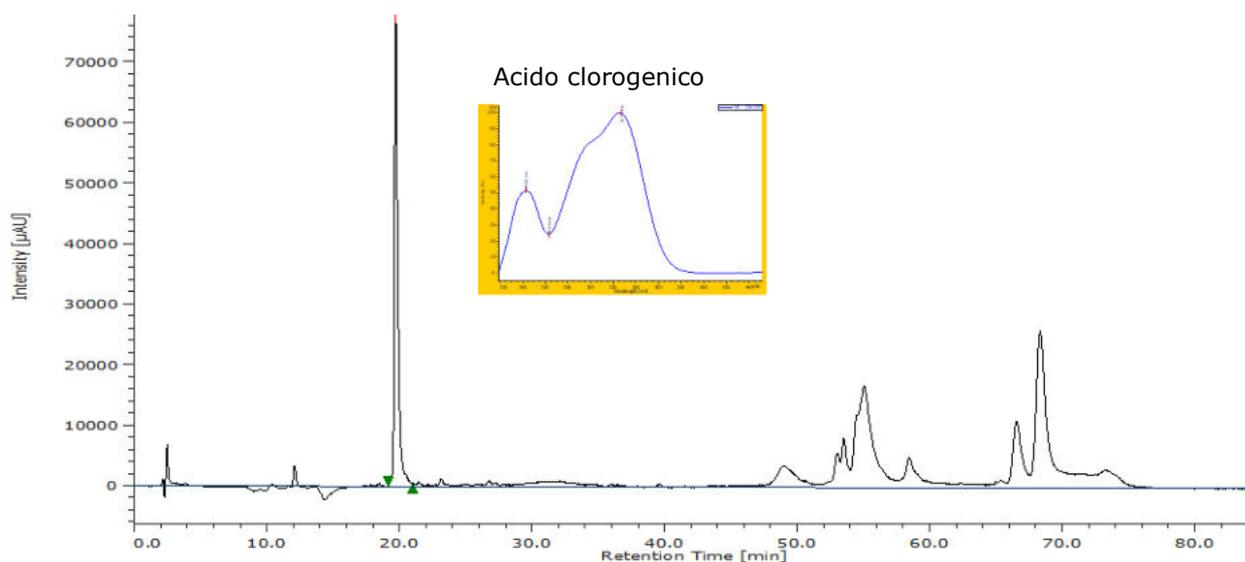


Figura 7. Cromatogramma RP-HPLC-DAD relativo all'estratto EtOH 50% dello scarto di lavorazione della pera. Lo spettro UV ed il tempo di ritenzione del picco maggioritario identificano tale molecola come acido clorogenico.

L'identificazione delle molecole presenti all'interno dell'estratto EtOH 50% derivato dagli scarti di lavorazione della mela è stata basata sul confronto dei loro tempi di ritenzione e dei dati ottenuti sperimentalmente dagli spettri di massa ed UV, con quelli degli standard di riferimento e dei dati di letteratura (Simirgiotis et al., 2016) (Alberoni et al., 2005).

Il cromatogramma ottenuto dall'analisi RP-HPLC-DAD (Figura 8) ha mostrato un fitocomplesso semplice, caratterizzato da un picco principale a rt 21,27 min e da altri picchi secondari, che mostrano un profilo UV proprio dei flavonoidi a tempi di ritenzione elevati.

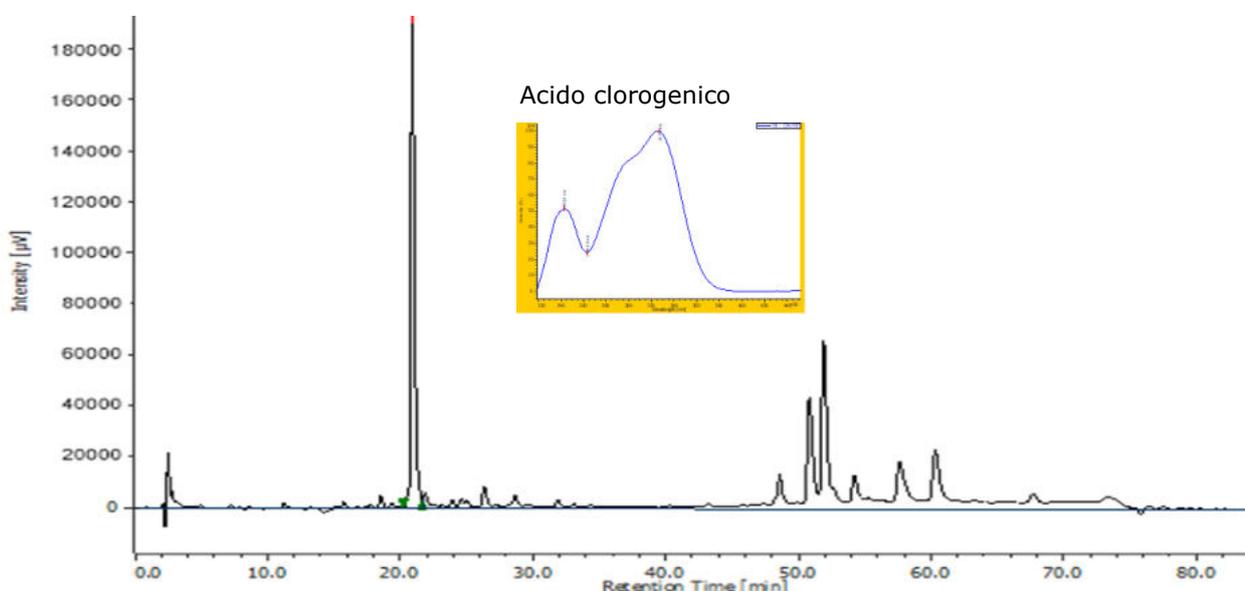


Figura 8. Cromatogramma RP-HPLC dell'estratto in EtOH 50% degli scarti della lavorazione di mela, con spettro di assorbimento UV del picco a rt 21,27, identificato come acido clorogenico.

Il picco maggioritario ha mostrato un assorbimento massimo ad una lunghezza d'onda di 327nm (λ_{max}) ed un tempo di ritenzione congruente con quello dell'acido clorogenico. Anche le analisi MS, effettuate in infusione diretta, hanno mostrato uno spettro riconducibile all'acido clorogenico a m/z 353 (MS/MS: m/z

191). Conferma finale è stata data da un esperimento di arricchimento in RP-HPLC-DAD. Per poter quantificare l'acido clorogenico, presente all'interno del fitocomplesso, è stata costruita una curva di taratura utilizzando soluzioni a concentrazione nota di acido clorogenico. Tale molecola è risultata essere presente negli scarti di lavorazione in una quantità pari a $0,24 \pm 0,01$ mg/grammo di matrice essiccata.

Mettendo a confronto le due quantificazioni effettuate dei due estratti etanolici (pera e mela), emerge che il quantitativo di acido clorogenico presente all'interno del fitocomplesso, espresso come mg/g di matrice essiccata, risulta essere superiore per l'estratto di pera, piuttosto che per quest'ultimo. La quantificazione dei polifenoli totali effettuata ha confermato il maggior contenuto in polifenoli nell'estratto etanolico di pera, piuttosto che in quello di mela.

Contenuto in polifenoli: Analisi allo Spettrometro di massa

L'analisi del contenuto totale di fenoli (Tabella 1A, B; pagg. 19-21) col metodo spettrofotometrico ha mostrato che i migliori risultati sono stati ottenuti dagli estratti ottenuti dagli scarti della filiera viti-vinicola, con l'unica eccezione degli scarti della lavorazione della pera. Infatti, i vinaccioli avevano un TPC di $5,189 \pm 0,005$ g AG/100g di sottoprodotto secco, le vinacce rosse $2,638 \pm 0,009$ g AG/100g di sottoprodotto secco ed i raspi $2,036 \pm 0,011$ g AG/100g di sottoprodotto secco.

Prendendo in considerazione la matrice vinaccioli, la motivazione di questo risultato è chiarita dallo spettro di massa totale dell'estratto riportato in Figura 9, in cui sono state identificate alcune molecole dell'importante frazione proantocianidinica che caratterizza la matrice vinaccioli.

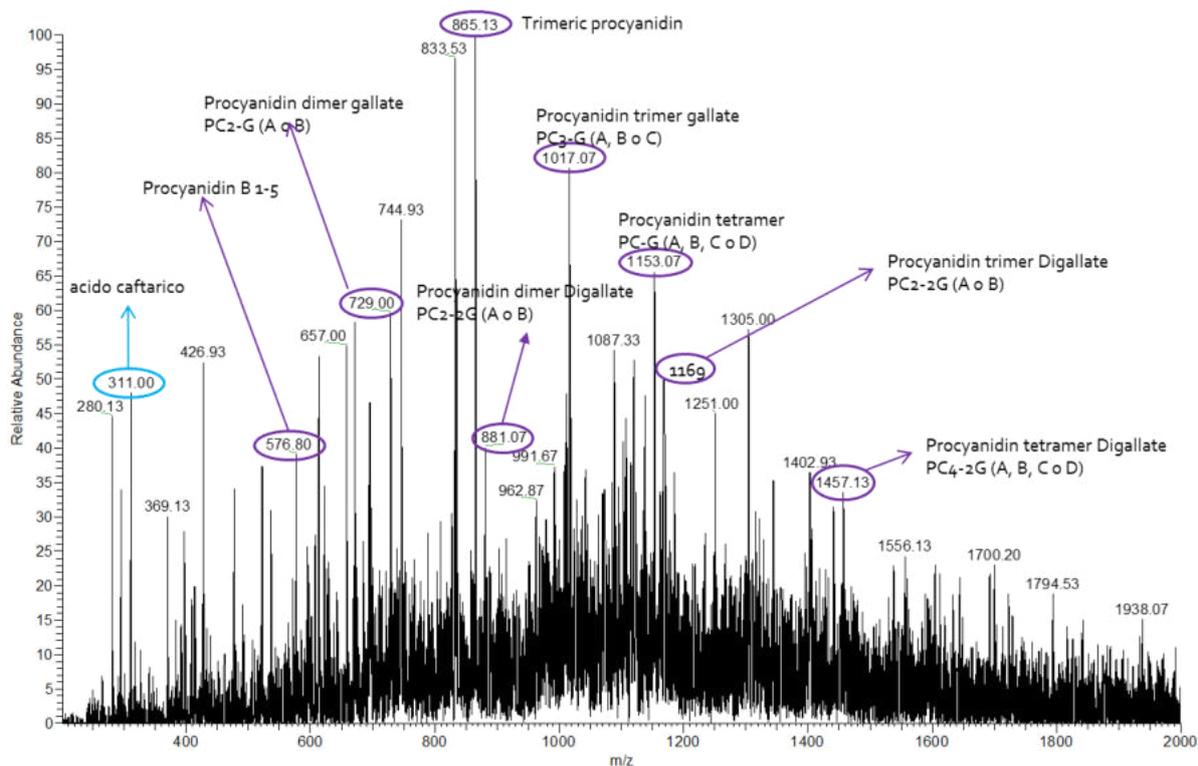


Figura 9. Spettro di massa ($[M-H]^-$) dell'estratto di vinaccioli in EtOH:H₂O 50% con indicazione delle molecole identificate.

Anche la matrice raspi ha mostrato un importante contenuto in polifenoli (~10%) e anche esibito, con l'estratto ottenuto con EtOH:H₂O 50%, attività biologica come repellente fitofago e fitoiatrico, quindi è stata prodotta una caratterizzazione chimica più approfondita per eventualmente identificare le molecole responsabili di tale attività. La Figura 10 riporta lo spettro di massa dell'estratto di raspi (2017) ed evidenzia le componenti maggioritarie di tale estratto come flavonoli (es. quercetin-3-O-glucuronide) e proantocianidine (es. (E)catechin dimer). È interessante constatare come questo fitocomplesso (poi utilizzato anche per le prove in campo) contenga molecole che singolarmente sono già note in letteratura per le loro attività di controllo delle infestazioni in agricoltura, infatti, Goławska et al. (Sylwia Goławska, Iwona Sprawka, Iwona Łukasik & Artur Goławski. Are naringenin and quercetin useful chemicals in pest-

management strategies? Journal of Pest Science volume 2016, 87, 173–180) avevano già osservato come la quercetina ed i suoi derivati potessero rispondere, anche se in modo modesto, alla necessità di nuovi prodotti per controllare le infestazioni da afidi; mentre Muema et al. (Jackson M. Muema, Joel L. Bargul, Steven G. Nyanjom, James M. Mutunga & Sospeter N. Njeru. Potential of *Camellia sinensis* proanthocyanidins-rich fraction for controlling malaria mosquito populations through disruption of larval development. Parasites & Vectors 2016, 9, Article number: 512) osservavano come una frazione vegetale ricca di proantocianidine potesse interferire negativamente sul ciclo vitale in alcuni insetti.

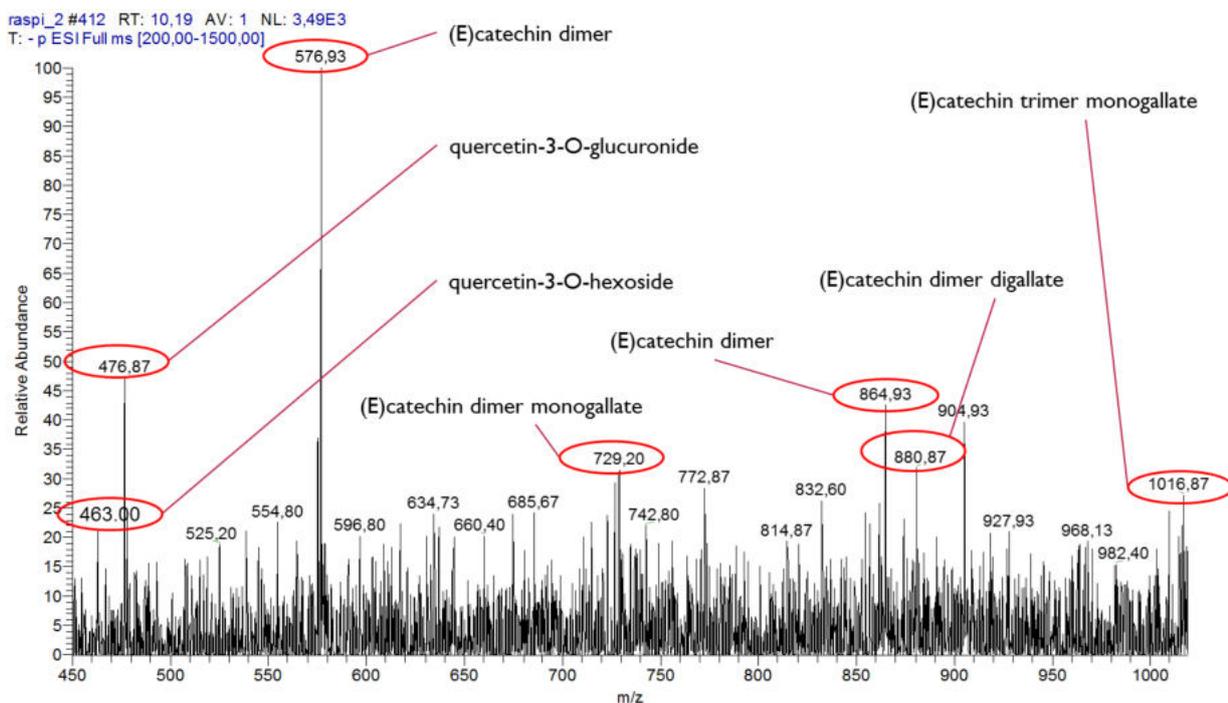


Figura 10. Spettro di massa ($[M-H]^-$) dell'estratto di raspi in EtOH:H₂O 50% con indicazione delle molecole identificate.

L'analisi effettuata mediante spettrometria di massa sull'estratto EtOH 50% degli scarti di mela ha mostrato la probabile presenza all'interno del fitocomplesso di possibili molecole flavonoidiche glicosilate, riconducibili probabilmente ad esosi della quercetina (un composto con m/z 463 che dagli esperimenti di MS/MS ha mostrato un frammento m/z 301, ed un altro m/z 447 che dagli esperimenti di MS/MS ha mostrato un frammento m/z 271), e ad esosi della naringenina (m/z 433 che dagli esperimenti di MS/MS ha mostrato un frammento m/z 271). Lo spettro ha, inoltre, mostrato la probabile presenza di un dimero della procianidina (MS: m/z 577; MS/MS: m/z 599, 451, 425, 407, 289, 245) e di acidi fenolici, quali l'acido chinico (MS: m/z 191; MS/MS: m/z 173), e di un esoso della floretina, la florizina (rt: 53,61 min; MS: m/z 435, MS/MS: m/z: 275). La presenza di quest'ultima e dell'iperoside (quercetina-3-O-galattoside, rt: 52,60 min; MS: m/z 463, MS/MS: m/z 301) all'interno del fitocomplesso, è stata confermata dall'esperimento di arricchimento in RP-HPLC-DAD.

Contenuto in polifenoli delle matrici leguminose: Mix Fagioli, Fagioli Cannellini e Fagiolini. Quantificazione Spettrofotometrica ed Analisi Cromatografica (su strato sottile - HPTLC; e liquida ad alta risoluzione in fase inversa - RP-HPLC)

Confrontando i valori riportati per i legumi in tabella 1A, si può evincere come gli estratti di fagiolini contengano il maggior quantitativo di polifenoli, seguito dal mix fagioli, dai fagioli cannellini ed infine dai ceci.

L'estratto più ricco in polifenoli per il campione mix di fagioli è quello ottenuto con un solvente idroalcolico con 60% di etanolo (Figura 12), mentre per i fagioli cannellini ed i fagiolini la quantità non subisce una grande variazione al variare delle proporzioni percentuali dei due solventi considerati (Figure 10 e 11). Anche per quanto riguarda il contenuto di flavonoidi, il solvente più performante varia a seconda della matrice: dal 100% in etanolo per mix di fagioli e fagiolini al 100% in H₂O per i fagioli cannellini.

In generale, gli estratti ottenuti dalla miscela di solventi al 50% ha un buon compromesso tra contenuto di polifenoli e flavonoidi (Figura 11), pertanto quei fitocomplessi potrebbero essere i più interessanti dal punto di vista dell'attività biologica e per un eventuale *scale up*.

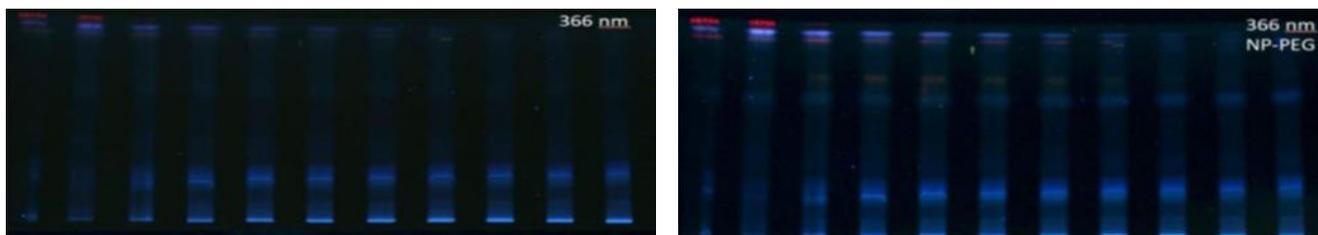


Figura 11. Valutazione cromatografica su strato sottile al fine di individuare la più efficace combinazione di solventi per ottenere la migliore resa in composti di interesse (polifenoli).

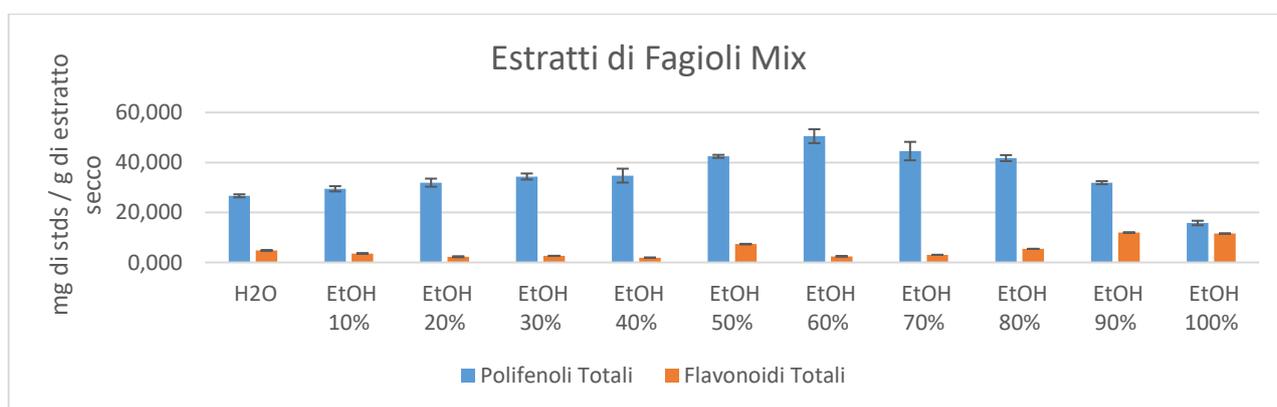


Figura 12. Quantità di polifenoli totali (espressi in mg di acido gallico/g di estratto secco) e flavonoidi totali (espressi in mg di iperoside/g di estratto secco) determinate con metodo spettrofotometrico.

L'estratto di mix di fagioli in EtOH 60% ha mostrato la maggior quantità di polifenoli all'analisi spettrofotometrica, per questo è stato analizzato anche con la cromatografia liquida. Uno studio in letteratura che ha caratterizzato le molecole polifenoliche in una varietà mista di fagioli tramite HPLC (Luthria et Pastor-Corrales, 2006) ha evidenziato 13 acidi fenolici: gallico, vanillico, caffeico, ferulico, p-cumarico, o-cumarico, m-cumarico, acido protocatecuico, sirringico, clorogenico, *p*-idrossibenzoico ed acido 2,3,4-triidrossibenzoico. Le strutture dei 13 acidi fenolici sono state confermate confrontando i loro spettri UV e il tempo di ritenzione con gli standard autentici (Luthria et Pastor-Corrales, 2006). In figura 13 è riportato il cromatogramma dell'estratto di mix di fagioli in EtOH 60% in cui sono indicati due di questi acidi fenolici identificati più un composto non presente nell'articolo di letteratura, l'epicatechina.

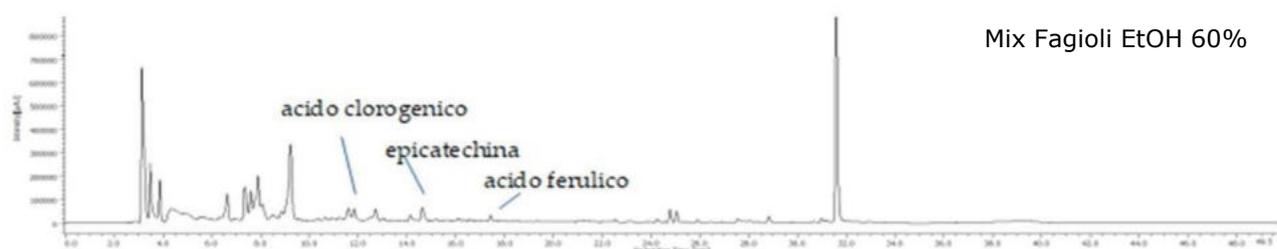


Figura 13. Cromatogramma RP-HPLC relativo all'estratto più performante, eseguito con soluzione idroalcolica al 50%, rispetto al contenuto in polifenoli totali. I picchi identificano i principali polifenoli rinvenuti.

I fagioli cannellini (Figura 14) presentano il miglior contenuto di polifenoli nell'estratto derivante dalla soluzione idroalcolica al 90%, pertanto non correlabile alla massima resa di estrazione, mentre il maggior contenuto di flavonoidi è riscontrato nell'estratto ottenuto con 100 % di H₂O, facendo pensare ad una maggiore presenza di flavonoidi glicosilati piuttosto che in forma libera.

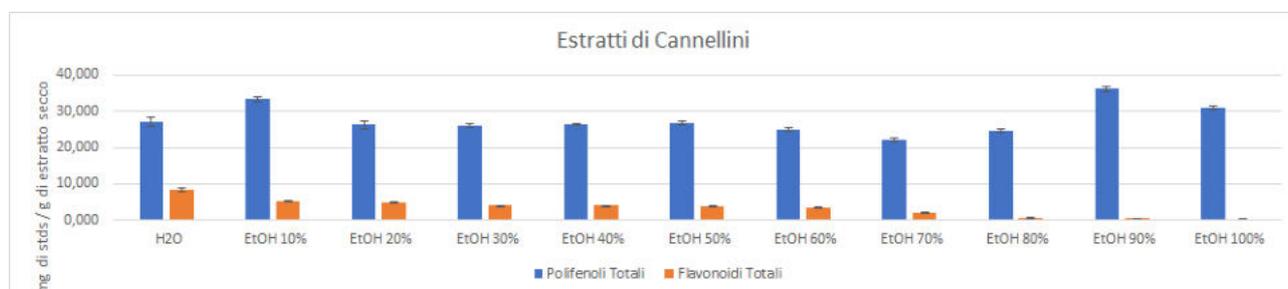


Figura 14. Quantità di polifenoli totali (espressi in mg di acido gallico/g di estratto secco) e flavonoidi totali (espressi in mg di iperoside/g di estratto secco) determinate con metodo spettrofotometrico.

I risultati ottenuti nella quantificazione dei polifenoli e delle proantocianidine degli estratti ottenuti dalla matrice fagiolini (Figura 15) non mostrano una particolare correlazione tra TPC e solvente estrattivo. Solo i dati ricavati dai test eseguiti sull'estrazione effettuata con EtOH 100% indicano questa matrice come la più povera di polifenoli, ma in cui i flavonoidi rappresentano circa 2/3 del totale. Questa matrice, pur non essendo particolarmente ricca di polifenoli, ha anche mostrato il quantitativo maggiore, di questa classe molecolare, rispetto agli altri legumi (Tabella 1).

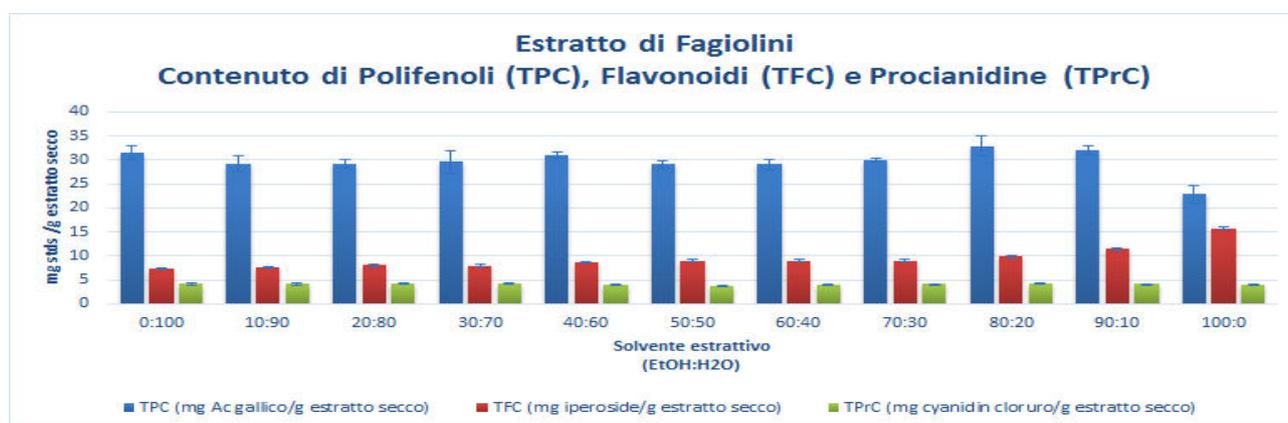


Figura 15. Quantità di polifenoli totali (espressi in mg di acido gallico/g di estratto secco), flavonoidi totali (espressi in mg di iperoside/g di estratto secco) e procianidine totali (espressi in mg di cianidin cloruro/g di estratto secco) determinate con metodo spettrofotometrico.

Contenuto in terpeni: Analisi gas cromatografica accoppiata a spettrometria di massa

I soli campioni di estratto ottenuti con l'idrodistillazione sono stati oggetto di analisi per il contenuto dei composti terpenici dal momento che è il processo elettivo per estrarre questi composti, con particolare riferimento a quelli con basso peso molecolare (C10, C15, C20).

Ci si è focalizzati sull'estrazione di tale tipologia di composti dal momento che è nota la loro possibile efficacia soprattutto nel contesto della difesa delle piante o come repellenti, uno degli obiettivi specifici del progetto.

La valutazione della componente terpenica è stata effettuata mediante gas cromatografia come strategia analitica elettiva sui seguenti prodotti di distillazione: distillato di vinacce bianche e rosse, distillato di vinaccioli, distillato di raspi, distillato di mele e di pere. Non è stato effettuato sui distillati delle sanse dal

momento che non è stato possibile processare tali matrici con l'idrodistillazione, come specificato nel paragrafo precedente (vedi Nota a piè di tabella 1B).

La componente terpenica a cui ci si è riferiti è risultata assente nei distillati di vinacce bianche, vinacce rosse e vinaccioli. Tali distillati erano caratterizzati principalmente invece da acidi grassi e la componente terpenica era rilevabile solo in tracce o sotto il limite di rilevabilità strumentale.

Nei distillati di raspi, di mele e di pere invece è risultata evidente la presenza di terpeni come illustrato in tabella 3.

Per quanto riguarda il distillato di raspi, tra i composti terpenici rilevati quelli più abbondanti erano in ordine decrescente alfa-cadinolo (0,64%), gamma-cadinene (0,40%), epizonarene (0,21%) e delta-cadinene (0,19%). In ogni caso però, i composti maggioritari erano acidi grassi, di cui l'acido palmitico è risultato il più abbondante (37,58%). Risulta evidente come la componente terpenica nei raspi, benchè quantificabile, risulti quella largamente minoritaria qualificando il processo di idrodistillazione messo in atto come scarsamente proponibile su questa matrice per uno scale up produttivo finalizzato all'ottenimento di composti terpenici.

Nei distillati di mele, invece, la componente terpenica era qualitativamente più ricca e quantitativamente più abbondante, se confrontata con il contenuto terpenico degli altri distillati, superando infatti il 20% del totale. I composti terpenici più abbondanti erano farnesene (circa il 17%), farnesolo (circa 9%) e sesquirosefurano (4%). La componente restante si caratterizzava di esteri di acidi grassi (circa 15%), idrocarburi (17%).

Nei distillati di pere, la componente terpenica era rappresentata per la maggior parte da farnesene (19%); altri composti terpenici, benchè presenti, erano quantificabili per frazioni di percentuale (ad es. sesquirosefurano, 0,22%). Anche in questo caso la componente maggioritaria è rappresentata da esteri di acidi grassi (circa 40%), acidi grassi liberi (circa 24%).

Tabella 3. Risultati relativi all'analisi cromatografica dei distillati che hanno evidenziato la presenza di composti terpenici

Distillato di raspi		Distillato di mele		Distillato di pere	
Composto	Area%	Composto	Area%	Composto	Area%
Nonanoic acid	0,14	beta-pinene	0,3	a-E,E-farnesene	19,03
Decanoic acid	1,29	hexyl butanoate	0,45	Sesquirosefurano	0,22
Epizonarene	0,21	n-hexyl 2-methyl-butanoate	1,48	Dodecanoic acid	0,26
gamma-cadinene	0,4	hexyl hexanoate	5,51	myristic acid	0,33
delta-cadinene	0,19	Butyl caprylate	0,7	Palmitoleic acid, methyl ester	0,31
Dodecanoic acid, ethyl ester	0,15	geranyl acetone	0,23	Palmitic acid, methyl ester	0,83
Dodecanoic acid	2,04	beta-farnesene	0,23	n-Pentadecanoic acid	0,16
alpha-Cadinol	0,64	alpha-Z,E-farnesene	0,45	palmitic acid, ethyl ester	0,14
myristic acid, ethyl ester	0,12	alpha-farnesene	17,27	palmitic acid	7,33
Pentadecanal	0,27	sesquirosefurano	3,71	linoleic acid, methyl ester	6,45
myristoleic acid	0,11	trans-nerolidol	0,61	linolenic acid, methyl ester	16,22
6,10,14-trimethyl-2-Pentadecanone	0,15	(2E,6E)-farnesol	9,29	oleic acid, methyl ester	10,89
myristic acid	2,41	(2E,6E)-farnesal	0,91	Stearic acid, methyl ester	0,96
cis-10-Pentadecenoic acid	0,24	n-Butyl laurate	0,28	linoleic acid, ethyl ester	1,35
n-Pentadecanoic acid	0,29	Hexadecanoic acid, ethyl ester	0,23	linolenic acid, ethyl ester	1,32
palmitoleic ethyl ester	1,69	n-heneicosane	0,78	oleic acid, ethyl ester	1,54
palmitic acid, ethyl ester	2,19	linoleic acid, ethyl ester	0,31	stearic, ethyl ester	0,21
Palmitoleic acid	8,9	oleic acid, ethyl ester	0,22	alpha-linolenic acid	5,65
palmitic acid	37,58	palmitic acid, butyl ester	0,48	oleic acid	9,04

linoleic acid, ethyl ester	3,67	propyl linoleate	0,24	elaidic acid	0,1
alpha-linolenic acid, ethyl ester	3,19	n-tricosane	0,49	stearic acid	0,46
oleic acid, ethyl ester	0,88	butyl linoleate	5,33		
linoleic acid	12,71	butyl oleate	3,22		
alpha-linolenic acid	10,94	Octadecanoic acid, butyl ester (stearic)	0,17		
oleic acid	4,87	pentyl linoleate	0,74		
elaidic acid	1,64	n-pentacosane	1,2		
stearic acid	0,32	hexyl linoleate	0,65		
		n-hexacosane	4,35		
		n-heptacosane	12,61		

CONCLUSIONI

Relativamente alle analisi spettrofotometriche finalizzate agli obiettivi specifici della prova i migliori risultati in termini di contenuto di polifenoli totali sono stati ottenuti dagli estratti di vinaccioli ottenuti con EtOH:acqua al 50%. Per quanto attiene ai risultati relativi alle matrici di mele e pere (feccia e acque aromatiche) i risultati in termini quantitativi di polifenoli erano molto inferiori rispetto ai valori ottenuti in media dalle matrici della filiera vitivinicola (mediamente tra il 75% e l'85% in meno). I differenti risultati relativi al contenuto in composti fenolici tra gli scarti della filiera vitivinicola e quelli della lavorazione di mele e pere sono certamente da attribuirsi sia al differente tipo di matrice vegetale sia al differente processo di filiera che le stesse hanno subito.

Per quanto attiene alla valutazione cromatografica (HP-TLC), gli estratti UAE e i sottoprodotti della idrodistillazione (fecce e acque aromatiche) di vinacce di uve bianche e rosse, vinaccioli, raspi, scarti di lavorazione di mele pere e olive (sanses), valutati qualitativamente per il contenuto di composti fenolici (con particolare riferimento a flavonoidi e acidi fenolici), è stata confermata la bontà della scelta della miscela idroalcolica come solvente di estrazione e del rapporto quantitativo etanolo:acqua (50:50) dal momento che le classi di polifenoli si separano correttamente diventando così ben visibili e distinguibili. Gli estratti degli scarti di filiera vitivinicola, da Rf (retention factor) 0 a 0,9 sulla lastra sono evidenti le molecole di interesse, rappresentate da flavonoidi ed acidi fenolici. Per quanto riguarda gli estratti ricavati dagli scarti di lavorazione di mele e pere, le bande di interesse si concentrano tra Rf 0,2 e Rf 0,55, indicando la maggior idrofilia delle molecole di interesse presenti nei fitocomplessi, facendo pensare ad una prevalenza di molecole flavonoidiche glicosilate. Relativamente al contenuto di procianidine in tutti gli estratti analizzati (scarti filiera vitivinicola, mele e pere), è stata identificata epi/catechina, il suo dimero di tipo B ed altri diversi oligomeri, non ancora identificate in modo puntuale. La valutazione cromatografica per RP-HPLC ha invece messo in evidenza la maggiore ricchezza di biomolecole di interesse negli estratti ottenuti con soluzione idroalcolica al 50%, confermato anche da evidenze *in silico* sviluppate con tecnica DOE (Design Of Experiment). Il fingerprinting cromatografico ha infine messo in evidenza la presenza nello specifico delle molecole di interesse rutina, miquelianina/iperoside, nictoflorina, astragalina, quercetina (flavonoidi) e da acido caftarico. I dati ottenuti dalle quantificazioni dei polifenoli totali nelle estrazioni effettuate sulle ultime matrici di scarto ottenute (mix fagioli, cannellini e fagiolini) hanno confermato il solvente idroalcolico come quello più performante per la loro estrazione. In particolare, la matrice fagiolini è risultata la più ricca con 1.302 ± 0.036 g equivalenti di acido gallico per 100 g di matrice iniziale secca.

Infine, per quanto riguarda i distillati, quello di raspi, benchè le rese fossero sotto il livello di significatività per il progetto, tra i composti terpenici di maggiore interesse e più abbondanti erano alfa-cadinolo, gamma-cadinene, epizonarene e delta-cadinene, ma in quantità non proponibile per uno scale up industriale, dal momento che per ottenere pochi ml di olio essenziale, in cui peraltro le sostanze putativamente utili sono in tracce di quantità, occorrerebbe estrarre quintali di matrice. Nei distillati di mele e di pere, invece, la componente terpenica era qualitativamente più ricca e quantitativamente più abbondante, ma sempre non proponibile per uno scale up produttivo.

- **ATTIVITÀ 3.1.3. CARATTERIZZAZIONE CHIMICA DEGLI ESTRATTI PER L'INDIVIDUAZIONE E QUANTIFICAZIONE DELLE PRINCIPALI CATEGORIE CHIMICHE ATTIVE.**

Questa attività fa seguito alle valutazioni preliminari di quali-quantificazione delle biomolecole di interesse effettuate rispetto alle prove 3.1.1.2, 3.1.2.2, da cui si sono ottenuti anche risultati coerenti con quanto qui previsto (analisi RP-HPLC-DAD, GC-MS).

Prova 3.1.3.1. Analisi chimiche sugli estratti per diversificare la fonte delle categorie molecolari.

Questa prova si è sviluppata e parzialmente realizzata per quanto attiene alle valutazioni RP-HPLC-DAD e GC-MS degli estratti idroalcolici da matrici di scarto in relazione alla determinazione dei polifenoli e acidi organici e dei terpeni (vedi prove 3.1.1.2. e 3.1.2.2).

MATERIALI E METODI

Analisi gas cromatografica accoppiata a spettrometria di massa (GC-MS): Le analisi gas cromatografiche sono state sviluppate sui campioni ottenuti dalla distillazione di matrici fresche e non essiccate. Le analisi sono state sviluppate seguendo le indicazioni riportate in Tardugno et al. (2018; Plant Biosystems, 152(1, 2), 120-129).

Valutazione preliminare del contenuto zuccherino nella matrice "mix fagioli" tramite Risonanza Magnetica Nucleare Protonica: gli spettri sono stati registrati in soluzione CD₃OD in tubi da 5 mm, a temperatura ambiente, con un Varian MercuryPlus400, operante a 400(1H).

Analisi cromatografica liquida ad alta risoluzione in fase inversa RP-HPLC-DAD: La caratterizzazione dei campioni finalizzata alla rilevazione dei principali flavonoidi è stata eseguita sui campioni di estrazione idroalcolica utilizzando un sistema HPLC modulare JASCO (Tokyo, Giappone, modello PU 2089) accoppiato ad un detector a fotodiodi (MD 2010 Plus). Per l'analisi si è fatto riferimento a quanto riportato in Tacchini et al. (2015; Natural Product Research, 29(22), 2071-2079).

RISULTATI

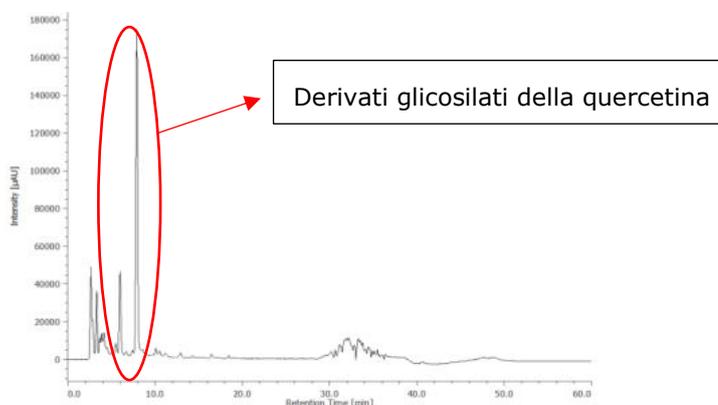
Oltre alla caratterizzazione degli estratti dal punto di vista del contenuto fenolico e terpenico, alcune matrici sono state indagate, utilizzando la letteratura specialistica come guida e confronto, per verificare la presenza di specifiche molecole di interesse nutraceutico.

Valutazione del contenuto di *trans*-licopene nella matrice bucce di pomodoro tramite RP-HPLC-DAD

Le estrazioni con fluidi supercritici non hanno mostrato risultati di resa totale in linea con gli indicatori di esplicitati dal progetto (minimo 10 %), ma la strada della rivalutazione delle bucce di pomodoro (che ha avuto la resa estrattiva migliore tra tutte le matrici estratte) è stata comunque percorsa puntando a quantificare il loro probabile contenuto di *trans*-licopene, molecola importante per l'altissima capacità antiossidante, in particolare *radical-scavenger*.

È stata quindi eseguita una caratterizzazione chimica preliminare dell'estratto SFE di bucce di pomodoro. Le analisi RP-HPLC-DAD degli estratti non hanno mostrato la presenza di tale molecola, ma hanno evidenziato due derivati glicosilati della quercetina (FIG. 1A).

Figura 1A. Cromatogramma RP-HPLC-DAD dell'estratto SFE di bucce di pomodoro.

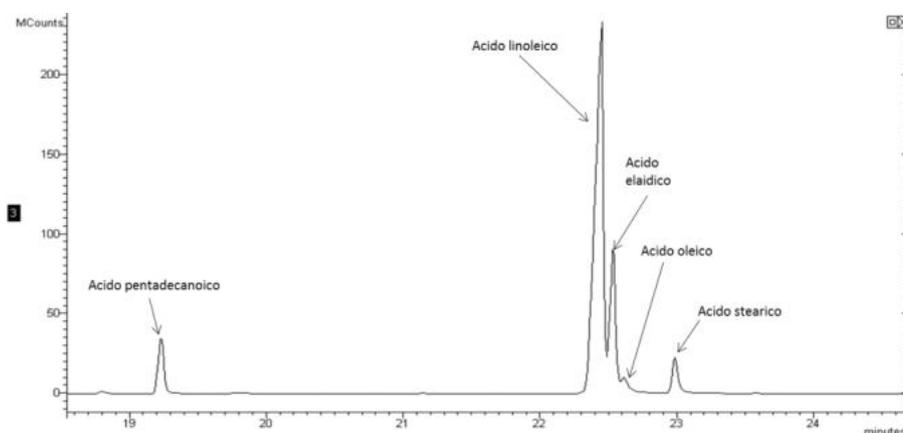


Konar et al. (Nevzat Konar, Iraz Haspolat, Ender Sinan Poyrazoğlu, Köksal Demir, Nevzat Artık. A Review on Supercritical Fluid Extraction (SFE) of Lycopene from Tomato and Tomato Products. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi /Karaelmas Science and Engineering Journal* 2 (1), 69-75, 2012) indicano che la quantità di *trans*-licopene estratta è direttamente proporzionale alla temperatura di estrazione, ma già a 80 °C la molecola tende ad isomerizzare ed a perdere le sue caratteristiche di *radical-scavenger*. Inoltre, Lee & Chen (M.T. Lee, B.H. Chen. Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. *Food Chemistry* 78 (2002) 425–432) confermano tale osservazione ed aggiungono che, oltre all'incremento della temperatura, anche una illuminazione costante porta ad una esponenziale perdita di *trans*-licopene.

Valutazione qualitativa del contenuto di acidi grassi nella matrice vinaccioli tramite GC-MS

L'estrazione SFE dei vinaccioli ha mostrato una resa totale non particolarmente lontana dall'indicatore del 10% di resa totale, ed essendo una matrice già ampiamente conosciuta per le sue proprietà salutistiche ed organolettiche, è stata investigata chimicamente per il contenuto di molecole oltre a fenoli e terpenoidi. Infatti, le analisi GC-MS hanno identificato all'interno del fitocomplesso una notevole presenza di acidi grassi, di cui il linoleico è il più abbondante, seguito dall'acido elaidico, pentadecanoico, stearico ed oleico (Figura 1B).

Figura 1B. Particolare del cromatogramma GC-MS dell'estratto SFE di vinaccioli che evidenzia la presenza di acidi grassi.



Valutazione preliminare del contenuto zuccherino nella matrice "mix fagioli" tramite Risonanza Magnetica Nucleare Protonica

L'analisi NMR protonica condotta in via preliminare sui fagioli essiccati in forno e poi estratti (UAE), mette in rilievo la presenza di una importante componente zuccherina, tra 3-4 ppm, confermata dalla presenza di segnali anomeric tra 4.4 e 5.4 ppm (Figura 1C sezione *Prova 3.1.2.1.*). Questa valutazione doveva essere propedeutica alla valutazione del contenuto di β -glucani, che causa *lockdown* per Covid-19 non è stata possibile svolgere in modo sperimentale, ma è stata sviluppata in forma teorica.

Valutazione guidata da ricerca bibliografica per l'estrazione di β -glucani dal mix fagioli per uso salutistico (nutraceutico, ingredientistico alimentare)

Gli scarti di fagiolo/fagiolino eliminati precocemente dalla filiera agroalimentare perché non conformi alle normative rappresentano un coacervo di molecole come polifenoli e flavonoidi, ma anche β -glucani con un alto potenziale salutistico e di mercato per lo sviluppo di integratori alimentari. In particolare questi ultimi annoverano numerose attività biologiche (<https://www.betaglucan.org/>): la riduzione del colesterolo plasmatico attraverso la regolazione della biosintesi di quello endogeno; la riduzione della glicemia post prandiale; il rallentamento dello svuotamento gastrico grazie alla loro viscosità, con effetti positivi sul senso di sazietà; il miglioramento della risposta insulinica al carico di glucosio; l'effetto immunostimolante, attraverso il potenziamento dell'attività dei macrofagi ed il sostegno delle difese primarie aspecifiche; un effetto scavenger.

La letteratura scientifica annovera quattro metodi principali per l'estrazione di β -glucano da matrici leguminose da utilizzare a scopi salutistici:

1. estrazione in acqua acida;
2. estrazione in acqua alcalina;

3. estrazione ad acqua calda;
4. estrazione enzimatica.

Considerando i costi ed i presupposti *green* del progetto BIOFACE, l'estrazione con acqua calda è quella che ridurrebbe al minimo l'uso di sostanze chimiche e rappresenterebbe la scelta migliore per sviluppo del progetto.

Dopo una prima fase di trattamento della matrice a reflusso con etanolo, che contribuisce alla disattivazione degli enzimi (β -glucanasi) e alla estrazione della maggior parte dei lipidi, l'amido sarebbe rimosso tramite un'estrazione a temperatura inferiore a 50°C e le proteine precipitate a pH 10 con soluzione di bicarbonato (vantaggio nell'utilizzo di enzimi). A questo punto una estrazione con acqua bollente a reflusso consentirebbe di ottenere un estratto ricco di β -glucani

Conclusioni

La matrice bucce di pomodoro è indagata per verificare il probabile contenuto di *trans*-licopene, molecola importante per l'altissima capacità antiossidante, in particolare *radical-scavenger*. Le analisi RP-HPLC-DAD degli estratti non hanno mostrato la presenza di tale molecola, ma hanno evidenziato due derivati glicosilati della quercetina. La letteratura aiuta a motivare l'esponenziale perdita di *trans*-licopene: questo è possibilmente il risultato delle alte temperature a cui è sottoposta la matrice durante la lavorazione, ed alla illuminazione costante che subiscono le bucce nella fase di post-trattamento.

Una volta in più questo risultato porta alla conclusione che per ottimizzare il recupero delle molecole ad alto valore aggiunto presenti negli scarti, senza naturalmente modificare le varie fasi di lavorazione della materia prima, si dovrebbe programmare un subitaneo trattamento delle matrici post-lavorazione o predisporre un sistema di stoccaggio efficace prima della loro rivalutazione.

L'estrazione SFE dei vinaccioli ha mostrato una resa totale non particolarmente lontana dall'indicatore del 10% di resa totale ed un contenuto interessante di acidi grassi, di cui il linoleico è il più abbondante.

Per quel che riguarda la valorizzazione del fagiolo comune dalla filiera agro-alimentare, questo alimento che viene scartato all'inizio della catena di distribuzione, perché non conforme alle normative nel campo alimentare, rappresenta un fitocomplesso di molecole quali polifenoli, flavonoidi e possibili β -glucani con un potenziale di mercato nello sviluppo di un integratore alimentare che può essere di supporto alla dieta.

Conclusioni triennio

L'impiego di miscele di enzimi determinano variazioni nella composizione degli estratti ottenuti in particolare per composti appartenenti alle classi dei flavonoidi, degli acidi idrossibenzoici e delle cumarine, di interesse appunto per il progetto. In termini di protocollo operativo, il trattamento enzimatico richiede un ambiente acquoso a pH 4,5, una concentrazione della miscela enzimatica ottimale non superiore al 5%, ed un tempo di processo non oltre le 6/10 ore a seconda della matrice. Questo processo però sembra favorire in particolare la liberazione di composti polifenolici e non terpenici.

Per quanto attiene alle rese di estrazione, le migliori si sono ottenute con il metodo dell'estrazione assistita da ultrasuoni (UAE) con una miscela di solvente idroalcolico (Etanolo:acqua, 50%), quindi con un relativo ridotto uso di solvente organico (etanolo) a beneficio delle finalità del progetto rispetto all'utilizzo di metodiche a basso impatto ambientale. Tutte le rese totali con UAE erano al di sopra del 15%, ovvero rispettando l'indicatore di progetto per questa metodica, tranne che per le matrici di sanse e vinaccioli. Anche per l'estrazione MAE si sono ottenute rese di estrazione confrontabili con UAE ma il profilo fitochimico degli estratti risulta impoverito della frazione polifenolica in particolare per le condizioni di temperatura che sono previste dalla metodica e che degradano le molecole più termolabili. Da qui, l'estrazione con ultrasuoni è senz'altro la metodica individuata come più performante.

Per l'idrodistillazione e l'estrazione con fluidi supercritici, invece, le rese estrattive sono tutte mediamente più ridotte. Per l'idrodistillazione, sebbene le quantità siano in linea per diverse matrici con l'indicatore di risultato, l'espressione composizionale in biomolecole attive è estremamente ridotta (vedi prova 3.1.2.2) ed al di sotto del limite richiesto dall'indicatore (1%) in contrasto con le attese coerenti con uno scale up di produzione industriale. Tutte le estrazioni SFE, infine, hanno prodotto risultati al di sotto dell'indicatore di risultato sia rispetto alla resa (10%) che rispetto al contenuto di biomolecole attive. Come elemento critico va rilevata la scarsa standardizzazione della qualità delle matrici da estrarre nelle diverse annate, dal momento che si sono osservate differenze dell'ordine di 10 volte la resa estrattiva e in concentrazione di biomolecole di interesse suggerendo la necessità di un subitaneo trattamento delle matrici post-lavorazione o sul valore di un sistema di stoccaggio efficace degli scarti prima della loro rivalutazione.

Tra le diverse matrici valutate, quelle di derivazione vitivinicola, con particolare riferimento alle uve rosse, e quelle delle leguminose sono risultate quelle più promettenti in termini di contenuto in polifenoli totali, evidenziando un contenuto superiore del 75-85% in media rispetto a tutte le altre matrici. Il contenuto

terpenico invece è sempre risultato particolarmente basso e non in linea con l'indicatore quantitativo di progetto, anche per quanto riguarda le matrici della frutta che pur presentando i valori maggiori non risultano promettenti per uno scale up produttivo.

In sintesi, la metodica estrattiva più performante è risultata essere la macerazione assistita da ultrasuoni (UAE), a temperatura ambiente, per un tempo di 80 minuti e con un solvente idroalcolico al 50% di etanolo. L'eventuale trattamento enzimatico richiede un ambiente a pH 4.5, una concentrazione della miscela enzimatica ottimale non superiore al 5%, ed un tempo di processo non oltre le 6/10 ore a seconda della matrice. Questo processo però sembra favorire in particolare la liberazione di composti polifenolici e non terpenici. Le matrici di maggiore interesse e che hanno dimostrato di raggiungere gli indicatori di risultato sono quelle di derivazione vitivinicola, pere e mele per quanto riguarda il contenuto in polifenoli e flavonoidi, e β -glucani per le leguminose con un potenziale di mercato nello sviluppo di integratori alimentari, o nell'ambito dell'ingredienteistica per l'alimentazione funzionale. Per quanto riguarda il contenuto terpenico invece, la metodica estrattiva elettiva (idrodistillazione) non ha mai evidenziato rese in grado di raggiungere l'indicatore di risultato per tutte le matrici anche se gli scarti della frutta presentavano un maggior contenuto di terpeni rispetto a tutte le altre matrici di scarto.

In relazione ai risultati conclusivi del progetto è possibile affermare che il protocollo estrattivo può essere replicabile e adattabile anche ad altri contesti di filiera per l'ottenimento di biomolecole attive, raggiungendo per il relativo indicatore di risultato un esito favorevole.

Per una corretta e profittevole valorizzazione delle biomasse però è essenziale procedere con un rapido trattamento conservativo ed estrattivo per evitare problematiche di standardizzazione di quantità e qualità degli estratti.

Le matrici che hanno evidenziato con UAE un contenuto di biomolecole attive (polifenoli) in linea con l'indicatore di risultato (non meno dell'1%) erano: Vinacce rosse, vinacce bianche, raspi, vinaccioli, pere, sanse, fagiolini. Per quanto riguarda la componente attiva terpenica, nessuna delle biomasse ha evidenziato un contenuto di composti putativamente attivi tale da raggiungere l'indicatore di risultato.

SOTTO-AZIONE 3.2 – VALORIZZAZIONE FITOSANITARIA

Le attività e le relative prove in oggetto alla presente sotto-azione rappresentano un output sostanziale e cruciale dell'intero progetto di valorizzazione dei sottoprodotti delle filiere agro-alimentari. La sotto-azione mira infatti ad individuare attraverso valutazioni che, progressivamente, dalla scala di laboratorio arrivano in campo, l'efficacia di estratti ottenuti con metodiche *green* (trattati e non trattati enzimaticamente) verso fitopatogeni di orticole e coltivazioni da frutto. La sotto-azione si sviluppa seguendo lo schema di attività e prove sotto riportato, in cui le evidenze ottenute in una attività risultano il sostanziale punto di partenza della successiva.

Sottoazione	
3.2 – Valorizzazione fitosanitaria	
Attività	Prova
3.2.1. Attività di laboratorio relativa al controllo di fitopatogeni (batteri e funghi) e fitofagi dei fruttiferi e delle orticole utilizzando i prodotti della sottoazione 3.1.	3.2.1.1. Valutazioni di laboratorio di attività biostatiche e/o biocide 3.2.1.2. Prove olfattometriche 3.2.1.3. Prove in laboratorio di elettropetrografia
3.2.2. Attività di semi campo per la valutazione sul contenimento di fitopatogeni e fitofagi	3.2.2.1. Prove su fitopatogeni 3.2.2.2. Prove su fitofagi
3.2.3. Attività di campo relativa al controllo di fitopatogeni (batteri e funghi) e di fitofagi dei fruttiferi e delle orticole	3.2.3.1. Prove di campo per valutare l'attività anticrittogamica e/o insetticida

Le attività della presente sotto-azione prevedono obiettivi specifici che si riassumono nella valutazione dell'efficacia e dell'applicabilità degli estratti arricchiti e di biomolecole messi a punto nella sotto-azione 3.1 verso fitopatogeni e fitofagi. Questa sotto-azione è articolata lungo il triennio in attività in cui sono previste

sia prove di laboratorio che di semi campo e di campo. In questo contesto vengono descritte di seguito le attività e le prove sviluppate durante il primo periodo di rendicontazione.

• **ATTIVITÀ 3.2.1. ATTIVITÀ DI LABORATORIO RELATIVA AL CONTROLLO DI FITOPATOGENI (BATTERI E FUNGHI) E FITOFAGI DEI FRUTTIFERI E DELLE ORTICOLE UTILIZZANDO I PRODOTTI DELLA SOTTOAZIONE 3.1**

L'obiettivo specifico di questa attività (indicatore di risultato) è quello di individuare almeno un estratto arricchito/biomolecola attiva verso almeno un fitofago e verso almeno un ceppo batterico o fungino con una concentrazione efficace non superiore a 20mg/ml.

Prova 3.2.1.1. Valutazioni di laboratorio di attività biostatiche e/o biocide

Valutazioni di laboratorio di attività biostatiche e/o biocide verso diversi fitopatogeni batterici e fungini. Si sono svolte prove di carattere predittivo di quanto si potrebbe saggiare in semicampo e campo su *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* (gemma nera del pero), *Sclerotinia minor*, *Sclerotinia sclerotiorum* (Marciumi e necrosi), *Agrobacterium* spp. (tumori piante da frutto), *Fusarium* spp. (tracheofusariosi delle orticole), *Botrytis cinerea* (muffa grigia della vite, fragola, etc.), *Stemphylium vesicarium* (maculatura bruna del pero).

Con questa prova si mira ad ottenere almeno un estratto arricchito/biomolecola attiva in laboratorio verso almeno un ceppo batterico o fungino con una concentrazione efficace non superiore a 20mg/ml.

MATERIALI E METODI

Attività biostatiche/biocide

L'attività antimicrobica è stata valutata sia verso batteri sia verso funghi fitopatogeni per verificare in via preliminare quegli estratti potenzialmente utilizzabili per proprietà fitoiatriche. Per valutare l'attività antibatterica degli estratti vegetali sono stati utilizzati i seguenti ceppi:

- *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*: DMS no. 10604 (equivalente a ATCC 19310) (PSS)
- *Agrobacterium vitis*: DMS no. 6583 (AV)
- *Agrobacterium tumefaciens*: DMS no. 30207 (AT)
- *Fusarium moniliforme*: ATCC 36541 (FM)
- *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*: (SIAPA) (FOR)
- *Botrytis cinerea*: DSM 5145 (BC)
- *Stemphylium vesicarium*: ATCC 18521 (SV)
- *Sclerotinia minor*: DSM 63016 (SM)
- *Sclerotinia sclerotiorum*: (SIAPA) (SS)

l'allestimento delle colture dei funghi filamentosi e gli esperimenti di attività antifungina sono stati condotti seguendo le indicazioni riportate in Guerrini et al. (2009. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. Environmental Toxicology and Pharmacology, 27: 39–48). La Minima Concentrazione Inibente la crescita fungina (MIC) e la Minima Concentrazione Fungicida (MCF) sono state determinate seguendole indicazioni riportate in Cavalerio et al. (2006. Antifungal activity of Juniperus essential oils against dermatophyte, Aspergillus and Candida strains. Journal of Applied Microbiology, 100: 1333–38). Infine, è stata calcolata la concentrazione efficace in grado di dare il 50% di effetto massimale (EC_{50}).

RISULTATI

Sono stati allestiti saggi *in vitro* per la valutazione dell'attività antimicrobica, preliminare all'eventuale attività in semicampo, con il preciso scopo di individuare estratti eventualmente promettenti rispetto all'attività fitoiatrica, ovvero per la difesa sostenibile delle coltivazioni come ulteriore ricaduta applicativa prevista dal progetto (concentrazione minima efficace non superiore a 20mg/ml) (Tabella 1).

Tabella 1. Attività antimicrobica di tutti gli estratti prodotti. I risultati sono espressi come Minima concentrazione Inibente la crescita (MIC mg/ml) per l'attività antibatterica e come concentrazione efficace in grado di dare il 50% di effetto massimale (EC₅₀) per quanto riguarda l'attività antifungina (dev. St. <10%).

	Antibatterica (MIC - mg/ml)			Antifungina (EC ₅₀ - mg/ml)					
	PSS	AV	AT	FM	FOR	BC	SV	SM	SS
Vinacce Rosse (50%)	400	355	385	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Vinacce Bianche (100%)	650	600	630	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Raspi (50%)	505	385	400	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Raspi d'uva (100%)	350	550	560	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Vinaccioli (100%)	755	600	600	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Foglie Vite Lambrusco (H ₂ O)	600	715	725	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Foglie vite Lambrusco (50%)	650	535	480	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Foglie vite Lambrusco (100%)	685	560	510	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Mele (H ₂ O)	n.d.	780	855	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Mele (50%)	850	540	550	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Mele (100%)	980	625	640	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pere (H ₂ O)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pere (50%)	870	990	1000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pere (100%)	980	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sanse (H ₂ O)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sanse (50%)	820	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sanse (100%)	930	750	765	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Acque di Vegetazione olive	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pomodori bucce (H ₂ O)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pomodori bucce (50%)	960	705	715	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pomodori bucce (100%)	n.d.	n.d.	1000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pomodori (SFE)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ceci (H ₂ O)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ceci (50%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ceci (100%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Mix fagioli (H ₂ O)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Mix fagioli (50%)	990	635	630	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Mix fagioli (100%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cannellini (H ₂ O)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cannellini (50%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cannellini (100%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Fagiolini (H ₂ O)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fagiolini (50%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fagiolini (100%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Delan 70WG	0,125	0,125	0,125						
Heliocuive S				$5 \cdot 10^{-4}$					

n.d.: non definite. In questi casi il ceppo ha evidenziato invece un forte incremento di crescita anziché un'inibizione, probabilmente dovuta alla componente zuccherina degli estratti. Controlli positivi: Delan 70 WG, per i ceppi batterici PSS, AV, AT); Heliocuivre S, per i ceppi fungini FM, FOR, BC, SV, SM, SS; dev. St. per valori di controllo < 0,1%)

Sono stati saggiati *in vitro* tutti gli estratti prodotti dalle matrici di scarto sui ceppi fitopatogeni dei batteri *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* (PSS), *Agrobacterium vitis* (AV), *Agrobacterium tumefaciens* (AT), e dei ceppi fungini *Fusarium moniliforme*: ATCC 36541 (FM), *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis licopersici*: (SIAPA) (FOR), *Botrytis cinerea* (BC), *Stemphylium vesicarium* (SV), *Sclerotinia minor* (SM) e *Sclerotinia sclerotiorum* (SS). Sono state impiegate diverse concentrazioni comprese tra 1 mg/ml e 1000 mg/ml. L'attività antibatterica emersa è stata sempre molto debole oppure non determinabile (n.d.) perché non distinguibile dal controllo negativo (ceppo senza estratto). Nessuno degli estratti si è distinto per raggiungere l'indicatore previsto.

Per quanto riguarda l'attività antifungina, non è stato possibile rilevare alcuna inibizione, poiché il trattato alla massima dose non presentava alcuna differenza di crescita rispetto al controllo negativo (ceppo fungino allevato in terreno senza estratto). Anzi, in molti casi si è osservato un incremento di crescita, probabilmente dovuta alla componente zuccherina in grado di determinarsi come fattore di stimolo metabolico in quanto fonte energetica suppletiva rispetto a quanto presente di default nel terreno di coltura. L'eliminazione della componente zuccherina dagli estratti non risulterebbe proficua ai fini della sostenibilità di progetto poiché comporterebbe da un lato l'impoverimento significativo della frazione polifenolica e, dall'altro, la necessità comunque di una implementazione strumentale - e quindi un onere economicamente importante specie se a livello industriale - ed un non banale incremento della complessità dell'intero processo. Anche per l'attività antifungina non si sono quindi evidenziati estratti in grado di generare un'attività biostatica/biocida *in vitro* non superiore a 20mg/ml.

CONCLUSIONI

La prova relativa alle valutazioni di laboratorio (*in vitro*) di attività biostatiche e/o biocide degli estratti prodotti verso i ceppi fitopatogeni dei batteri *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* (PSS), *Agrobacterium vitis* (AV), *Agrobacterium tumefaciens* (AT), e dei ceppi fungini *Fusarium moniliforme*: ATCC 36541 (FM), *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis licopersici*: (SIAPA) (FOR), *Botrytis cinerea* (BC), *Stemphylium vesicarium* (SV), *Sclerotinia minor* (SM) e *Sclerotinia sclerotiorum* (SS) non ha fatto emergere risultati compatibili con l'indicatore atteso (almeno un estratto arricchito/biomolecola attiva in laboratorio verso almeno un ceppo batterico o fungino con una concentrazione efficace non superiore a 20mg/ml).

I valori ottenuti, benché molto lontani dall'indicatore di risultato, sono stati comunque riportati come elemento qualificante della prova dato l'ampio range di concentrazione utilizzato e dunque del lavoro prodotto per cercare di raggiungere comunque l'obiettivo.

Il dato che in molti ceppi si è verificato un aumento di crescita anziché un'inibizione può essere dovuto alla componente zuccherina che, caratterizzandosi come fattore di stimolo metabolico in quanto fonte energetica suppletiva rispetto a quanto presente di default nel terreno di coltura, potrebbe mascherare l'eventuale attività antimicrobica della frazione polifenolica.

L'eliminazione della componente zuccherina dagli estratti, ipotizzata nella relazione a breve termine) non risulterebbe proficua ai fini della sostenibilità di progetto poiché comporterebbe da un lato l'impoverimento significativo della frazione polifenolica e, dall'altro, la necessità comunque di una implementazione strumentale - e quindi un onere economicamente importante specie se a livello industriale - ed un non banale incremento della complessità dell'intero processo. In ogni caso, anche con l'impiego di estratti privati della frazione zuccherina, non si sono registrati miglioramenti tali da identificarsi con l'indicatore di risultato.

In relazione a queste evidenze antimicrobiche non positive, si è ritenuto coerente, ai fini della prosecuzione efficace del progetto, procedere comunque con le prove in semi campo concentrando però gli sforzi verso la valutazione di una possibile attività anti-fitofago o fitofago-repellente (prova 3.2.1.2: prove olfattometriche; prova 3.2.1.3. Prove in laboratorio di elettropenetragrafia).

Prova 3.2.1.2. Prove olfattometriche

Questa prova è finalizzata alla valutazione delle risposte comportamentali di *Drosophila suzukii* e *Cacopsylla pyri* in relazione all'esposizione agli estratti presunti repellenti mediante olfattometro a 2 vie (o ad Y).

Prove olfattometriche con olfattometro a Y in laboratorio sono state sviluppate per la valutazione preliminare dell'attività repellente su diverse specie fitofaghe tra cui Cimice asiatica (*Halyomorpha halys*) *Drosophila* (*Drosophila suzukii*), *Cacopsylla pyri*, Tingide del pero. Sono state sviluppate 3 prove su target diversi a partire da adulti. Ogni prova per specie è stata sviluppata osservando la scelta/repellenza esercitata dai prodotti forniti dalla sottoazione 3.1 su 50 individui (5 repliche per 10 individui, 10 minuti di periodo di osservazione per ogni individuo).

L'obiettivo delle prove olfattometriche di laboratorio è prodromico alle attività di semi campo, ovvero cercare di individuare un estratto attivo come insetticida complessivo verso almeno uno dei fitofagi con una efficacia non inferiore al 40%.

MATERIALI E METODI

Prova olfattometrica su *Drosophila suzukii*: Le risposte comportamentali di *Drosophila suzukii* agli estratti presunti repellenti sono state osservate in un olfattometro a 2 vie detto ad Y in vetro (lunghezza braccio 35 cm; angolo 75°; lunghezza base tubo 40 cm; Ø interno 4,1 cm). Un flusso di aria (0,5 L min.), generato da una pompa e regolato attraverso due flussometri, veniva fatto passare attraverso un filtro a carbone attivo ed una beuta contenente acqua distillata. L'aria, una volta purificata ed umidificata, attraversava le due "camere di scelta", costituite da due cilindri di vetro. Successivamente l'aria fluiva nell'olfattometro ad Y dove erano registrate le risposte comportamentali degli insetti. L'apparato è stato collocato in un contenitore (50 cm x 50 cm x 30 cm), rivestito di carta bianca per consentire alla luce di diffondersi in maniera uniforme. La sorgente luminosa, rappresentata da due neon bianchi da 58 W posti ad un'altezza di circa 1 m dal fondo e posizionati sull'olfattometro in modo da non influenzare la scelta degli insetti, garantiva un'illuminazione omogenea all'interno del tubo. Le prove sono state condotte saggiando un estratto alla volta e lasciando vuota una delle camere di scelta o inserendo un disco di carta da filtro (1 cm²) impregnato solo con solvente. Al fine di verificare la specificità dell'insetto nei confronti dei segnali di repellenza emessi dall'estratto, sono stati condotti tre esperimenti: (1) attrattivo (acetato di isoamile) vs il solvente (esano); (2) attrattivo (acetato di isoamile) vs attrattivo (acetato di isoamile) + repellente (Estratto di raspi d'uva 0,1%); (3) attrattivo (acetato di isoamile) vs attrattivo (acetato di isoamile) + repellente (Estratto di raspi d'uva 1%) disponendo nella camera di scelta un dischetto innescato con 10 µl sia di attrattivo che di repellente. Le due diverse concentrazioni dell'estratto di raspi d'uva (1 % e 0,1 %) sono state preparate sciogliendo le sostanze in etanolo 50%. Entrambi i dischi di carta erano posizionati al centro della sezione trasversale della camera di scelta e sostituiti ad ogni replica. Due femmine di *D. suzukii* (5 giorni di età) erano rilasciate alla base dell'olfattometro (punto di rilascio). Il parametro assunto per misurare la risposta olfattometrica degli insetti è stato la "scelta" entro 15 minuti nei due bracci dell'olfattometro. In caso contrario, la risposta era registrata come "non scelta". La posizione dei differenti stimoli nei due bracci dell'olfattometro è stata invertita dopo 5 osservazioni (10 insetti) per evitare eventuali effetti di posizione. Per ogni stimolo saggiato sono stati utilizzati almeno 75 individui. Dopo ogni prova (10 osservazioni con 20 insetti), l'olfattometro veniva lavato con acqua distillata e successivamente con etanolo 90% ed asciugato in stufa a 150 °C per 60 minuti prima di ripetere la prova

Prova olfattometrica su *Cacopsylla pyri*: Le risposte comportamentali di *Cacopsylla pyri* agli estratti presunti repellenti sono state osservate con la stessa metodologia impiegata su *Drosophila suzukii* utilizzando come attrattivo 5 µl di esenale 0,5M.

Prova olfattometrica su Cimice asiatica: Le risposte comportamentali della cimice asiatica agli estratti presunti repellenti sono state osservate con la stessa metodologia impiegata su *Drosophila suzukii* utilizzando come attrattivo il feromone di aggregazione.

Prova olfattometriche su Tingide del pero: Le risposte comportamentali della tingide del pero agli estratti presunti repellenti sono state osservate con la stessa metodologia impiegata su *Drosophila suzukii* utilizzando come agente attrattivo delle foglie di pero.

RISULTATI

Prova olfattometrica su *Drosophila suzukii*

Dalle risposte comportamentali di *D. suzukii* alle 2 differenti dosi di estratto di raspi d'uva (Tabella 1) si evince una significativa repellenza dell'insetto quando esposto alle dosi di 1% nel braccio insieme allo stimolo attrattivo. Nessuna repellenza sostanziale è stata mostrata alla dose più bassa 0,1%.

Tabella 1. Risposte comportamentali di *D. suzukii* alle 2 differenti dosi di estratto di raspi d'uva

Isoamile (in esano)	Esano (solvente)	No scelta	
27	15	35	N = 77
35.06 %	19.48 %	45.45 %	100 %

Isoamile	Raspi 0,1% (+ Isoamile)	No scelta	
25	24	38	N = 87
28.74 %	27.59 %	43.68 %	100 %

Isoamile	Raspi 1% (+ Isoamile)	No scelta	
32	11	32	N = 75
42.67 %	14.67 %	42.67 %	100 %

Prova olfattometrica su *Cacopsylla pyri*

Dalle risposte comportamentali di *Cacopsylla pyri* all'estratto di raspi d'uva (Tabella 2) si evince una significativa repellenza dell'insetto quando esposto alla concentrazione dell'1% nel braccio insieme allo stimolo attrattivo.

Tabella 2. risposte comportamentali di *Cacopsylla pyri* all'estratto di raspi d'uva.

esenale (in esano)	Esano (solvente)	No scelta	
37	22	39	N = 98
37.75 %	22.44 %	39.79 %	100 %

esenale (in esano)	Raspi 1% (+ esenale)	No scelta	
23	11	26	N = 60
38.33 %	18.33 %	43.33 %	100 %

Prova olfattometrica su Cimice asiatica

La prova olfattometrica per valutare gli estratti di raspi come potenziali repellenti verso la Cimice asiatica non ha fornito, a differenza di *D. suzukii* (e, in parte, *C. pyri*), risultati valutabili dovuti al comportamento non misurabile per mancanza di attività di scelta o pura casualità di comportamento di questo insetto utilizzando questa metodologia

Prova olfattometriche su Tingide del pero

La prova olfattometrica per valutare gli estratti di raspi come potenziali repellenti verso la Tingide del pero non ha fornito, a differenza di *D. suzukii* (e, in parte, *C. pyri*), risultati valutabili dovuti al comportamento non misurabile per mancanza di attività di scelta o pura casualità di comportamento di questo insetto utilizzando questa metodologia

CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti rispetto alle risposte comportamentali di *D. suzukii*, con particolare riferimento alle 2 differenti dosi di estratto di raspi d'uva, si evince una significativa repellenza dell'insetto quando esposto alle dosi di 1% nel braccio insieme allo stimolo attrattivo.

Nessuna repellenza sostanziale è stata invece mostrata a dosi inferiori (0,1%). Per quanto riguarda invece analoghe prove effettuate su *Cacopsylla pyri* degli estratti di raspi d'uva da filiera vitivinicola, si è riscontrata una significativa repellenza dell'insetto, in particolare quando esposto alla concentrazione dell'1% nel braccio insieme allo stimolo attrattivo.

Prova 3.2.1.3. Prove in laboratorio di elettropenetragrafia

Sono state effettuate prove in laboratorio di elettropenetragrafia con EPG-DC per la valutazione dell'attività antifeeding sul fitofago *H. halys* (forme giovanili) e su psilla del pero, valutando tutte le fasi alimentari dell'insetto su frutti di pero trattati e non trattati.

Ogni prova è stata sviluppata con 20 individui per specie registrando per 6 ore le attività alimentari con o senza (controllo negativo) i prodotti forniti dalla sotto-azione 3.1.

MATERIALI E METODI

Prova di elettropenetragrafia (EPG) su *Cacopsylla pyri*: La valutazione comportamentale agli estratti presunti fagodeterrenti (antifeeding) sono state osservate attraverso la metodologia di Elettropenetragrafia EPG). La registrazione EPG in laboratorio è stata eseguita su circa 20 femmine svernanti di *Cacopsylla pyri* per estratto più il controllo non trattato, a temperatura di $21 \pm 1^\circ$ C e illuminazione artificiale con 2 neon bianchi rispettivamente di 58 W. L'EPG-DC utilizzato era un amplificatore modello Giga 4 (Wageningen University, Olanda) di 100 Hz e con un input di resistenza di 1 G Ω . Un elettrodo, costituito da un sottile filo d'oro di circa 20 μ m di diametro e 2 cm di lunghezza, era fissato sul dorso di *C. pyri* usando una colla

conduttiva a base acquosa unita a polvere d'argento. Il filo d'oro era collegato all'amplificatore con un filo di rame lungo e robusto. Un secondo elettrodo di rame era inserito in profondità nel terreno umido del vaso in cui era allevata la piantina di pero. Durante l'esperimento la pianta, l'insetto e l'amplificatore erano posti all'interno di una gabbia di Faraday, per escludere dall'esperimento il rumore elettromagnetico. Ogni segnale EPG è stato rilevato per 5 ore (18.000 sec) e trasformato mediante un convertitore da analogico a digitale (A-D). Il tracciato è stato osservato sullo schermo di un PC a cui il sistema di rilievo era collegato. Tutti i dati ottenuti sono stati registrati su disco rigido e in seguito analizzati seguendo le indicazioni di Civolani et al. (2011) utilizzando il software Stylect+ valutando solamente la fase di probing (alimentazione) e non probing (non alimentazione).

RISULTATI

I risultati ottenuti dalle 5 ore di registrazione EPG con adulti di *C. pyri* su piantine di pero trattate con i diversi estratti (vinacce e raspi) 2 ore prima dell'esperimento, non hanno messo in evidenza sostanziali effetti antifeeding rispetto alle piantine di pero non trattate utilizzate come controllo (Tabella 1).

Tabella 1 - Risultati ottenuti dalle 5 ore di registrazione EPG con adulti di *C. pyri* su piantine di pero

Comportament o EPG	Controllo (in vaso non trattata)	Vinacce bianche 24 h	Estratto vinacce (non trattato enzimaticamente)	Estratto vinacce (no DMSO)	Estratt o di Raspi 1%
non probing (sec)	5045	5880	6946	8452	7584
Probing (sec)	12983	11825	11018	9583	8245

CONCLUSIONI

Le prove di elettropenetragrafia svolte con diversi estratti forniti dall'industria vitivinicola, tra cui vari tipi di vinacce e raspi, distribuiti su piante di pero non hanno messo in evidenza sostanziali effetti *antifeeding* sulla Psilla del pero.

Dati comunque i risultati tendenzialmente confortanti rispetto alle prove olfattometriche, si è proceduto con le attività di semi campo sul contenimento di fitopatogeni e fitofagi (attività 3.2.2 - Attività di semi campo per la valutazione sul contenimento di fitopatogeni e fitofagi).

• **ATTIVITÀ 3.2.2. ATTIVITÀ DI SEMI CAMPO PER LA VALUTAZIONE SUL CONTENIMENTO DI FITOPATOGENI E FITOFAGI**

Questa attività è indirizzata alla valutazione dell'attività di contenimento degli estratti e/o loro miscele verso fitopatogeni (batteri e funghi) e fitofagi dei fruttiferi e delle orticole in condizioni di semicampo. Questa azione prevede prove sviluppate in relazione ed in conseguenza dei risultati ottenuti nella sotto-azione 3.2 attività 3.2.1 e relative prove.

L'obiettivo dell'attività è quello di ottenere un estratto arricchito/biomolecola attiva come insetticida complessivo da valutare in semi campo verso almeno uno dei fitofagi con una efficacia non inferiore al 40%.

In relazione ai risultati ottenuti in laboratorio (attività 3.2.1.1) che indicavano l'assenza di qualsiasi attività antifungina e antibatterica nei confronti di fitopatogeni si è ritenuto di procedere con prove di semi campo su quei fitofagi che avevano mostrato una sostanziale sensibilità verso gli estratti in laboratorio.

- **Prova 3.2.2.2. Prove su fitofagi**

Sono state effettuate prove di semicampo con *Drosophila suzukii* attraverso la Torre di Potter mediante test residuali e topici, utilizzando l'estratto di raspi alle due concentrazioni 0,1% e 1%, usate nei test precedenti.

MATERIALI E METODI

Test residuale

15 insetti adulti di *Drosophila suzukii* sono stati depositati all'interno di una piastra Petri di 12 cm di diametro contenente dieta zuccherina artificiale, dopo 2 ore dall'applicazione spray (2 ml, 7 bar) dell'estratto di raspi alle due concentrazioni, (0.1% e 1% p/v) mediante una Torre di Potter modello Burkhard. La mortalità corretta è stata valutata dopo 24 e 48 ore dall'applicazione. Sono state svolte 4 repliche per un totale di 60 adulti.

Test topico

15 insetti adulti di *Drosophila suzukii* sono stati esposti all'interno di una piastra Petri di 12 cm di diametro contenente dieta zuccherina artificiale all'applicazione spray di 2 ml (7 bar) dell'estratto di raspi alle due concentrazioni (0.1% e 1% p/v) ottenuta mediante una Torre di Potter modello Burkhard. La mortalità corretta è stata valutata dopo 24 e 48 ore dall'applicazione. Sono state svolte 4 repliche per un totale di 60 adulti.

RISULTATI

La tabella 2 mostra i risultati di mortalità ottenuti dopo 24 e 48 ore dall'applicazione delle due concentrazioni di estratto di raspi. Nessuna mortalità è stata ottenuta dopo applicazione preventiva (test residuale) su adulti di *D. suzukii*. Contrariamente, è stata osservata una significativa mortalità a seguito dell'applicazione diretta sugli individui adulti di *D. suzukii* (test topico), soprattutto alla dose maggiore e dopo 48 ore, confermando alcune osservazioni ottenute nei test preliminari precedenti.

Tabella 2 - Risultati di mortalità ottenuti dopo 24 e 48 ore dall'applicazione delle due concentrazioni di estratti su adulti di *D. suzukii*

Test residuale	Efficacia Abbot	
	24 ore	48 ore
0.1% estratto di raspi	0%	0%
1% estratto di raspi	0%	0%

Test topico	Efficacia Abbot	
	24 ore	48 ore
0.1% estratto di raspi	20%	42%
1% estratto di raspi	95%	100%

Conclusioni

La concentrazione dell'1% di estratti di raspi ha dimostrato una elevata mortalità diretta sugli adulti di *D. suzukii* in condizioni di semi campo (Torre di Potter), condizione che suggerisce di proseguire lo studio con prove direttamente in campo.

ATTIVITÀ 3.2.3. ATTIVITÀ DI CAMPO RELATIVA AL CONTROLLO DI FITOPATOGENI (BATTERI E FUNGHI) E DI FITOFAGI DEI FRUTTIFERI E DELLE ORTICOLE.

Prova 3.2.3.1. Prove di campo per valutare l'attività anticrittogamica e/o insetticida

Obiettivo della prova in campo è di valutare l'efficacia degli estratti ricavati nelle sottoazioni precedentemente descritte verso alcuni fitofagi. Nel primo step di progetto ed alla luce delle indagini preliminari di laboratorio, l'obiettivo è di verificare l'attività repellente degli estratti al dittero *Drosophila suzukii*, il nuovo fitomizo chiave del ciliegio.

Nel corso del 2018 e 2019 sono state effettuate 3 prove per testare, in condizioni di pieno campo, l'attività insetticida e di repellenza di un estratto di polifenoli nei confronti di *Drosophila suzukii* su ciliegio. Questo estratto, ottenuto attraverso processi di distillazione dall'Università degli studi di Ferrara a partire da raspi d'uva nera, era stato precedentemente testato in condizioni di laboratorio su alcuni insetti target (tra cui *Drosophila suzukii*, *Cacopsylla pyri* e *Stephanitis pyri*) mostrando una discreta/buona attività.

MATERIALI E METODI

La sperimentazione si è svolta in 3 frutteti siti in provincia di Forlì/Cesena delle cv. Van (2018), Lapins e Durone (2019). Le prove sono iniziate subito dopo la raccolta aziendale su branche (cv. Van), piante non raccolte (cv. Durone) o coprendo con un manicotto di rete (Foto 1) delle branche fruttifere in un frutteto non trattato (cv. Lapins). Una settimana prima della raccolta i manicotti sono stati scoperti e trattati. In tutte le prove i trattamenti (Foto 2) sono stati effettuati con un nebulizzatore spalleggiato (modello Sthil SR 420) avendo cura di bagnare la vegetazione fino al limite del gocciolamento seguendo lo schema di impostazione (Tab.1). Lo schema sperimentale utilizzato prevedeva 4 o 6 repliche per ogni tesi.

I dati ottenuti sono stati sottoposti all'analisi della varianza (Anova) e la differenza delle medie confrontate con il test SNK per $p \leq 0,05$.

Foto 1 – Brancha con frutti chiusa in un manicotto di rete



Foto 2 – Trattamento



Tabella 1. Schema di impostazione

Tesi	Formulato commerciale	P.a.	Dose	Epoca dei trattamenti
1	Testimone	-	-	-
2	Laser	spinosad	30 ml/hl	A
3	Estratto di polifenoli	polifenoli	0,4 %	A, B, C

A = 7 giorni prima della raccolta, B = 3 giorni dopo A, C = 2 giorni dopo B

Rilievi

I rilievi sono stati eseguiti raccogliendo tutte le ciliegie presenti sulle branche o sulle piante trattate e lasciandole per qualche giorno in shelf-life a temperatura ambiente allo scopo di far crescere le larve e rendere i sintomi più evidenti.

Sono state eseguite 3 valutazioni: subito dopo la raccolta e dopo 2 e 5 giorni. Ad ogni rilievo le ciliegie colpite sono state conteggiate ed eliminate.

RISULTATI

Nelle Tab. 2, 3 e 4 è riportata la sintesi dei rilievi effettuati.

Tabella 2 Tabella dei risultati Prova 2018 su cv. Van (Raccolta 6/7)

Tesi	Formulato commerciale	P.a.	Dose	Data dei trattamenti	Rilievi % di frutti colpiti
1	Testimone	-	-	-	13 ⁽¹⁾
2	Laser	spinosad	30 ml/hl	26/6	9 (30,8)⁽²⁾
3	Estratto di polifenoli	polifenoli	0,4 %	26/6, 2/7, 4/7	4 (69)
Significatività					No

⁽¹⁾ Valore medio di 3 ripetizioni, ⁽²⁾ Efficacia Abbott

Tabella 3. Tabella dei risultati Prova 2019 su cv. Lapins (Raccolta 14/6)

Tesi	Formulato commerciale	P.a.	Dose	Data dei trattamenti	Rilievi % di frutti colpiti
1	Testimone	-	-	-	60,3 ⁽¹⁾
2	Laser	spinosad	30 ml/hl	7/6	34 (43,7)⁽²⁾
3	Estratto di polifenoli	polifenoli	0,4 %	7/6, 10/6, 12/6	45,3 (24,9)
Significatività					No

⁽¹⁾ Valore medio di 4 ripetizioni, ⁽²⁾ Efficacia Abbott

Tabella 4. Tabella dei risultati Prova 2019 su cv. Durone (Raccolta 26/6)

Tesi	Formulato commerciale	P.a.	Dose	Data dei trattamenti	Rilievi % di frutti colpiti
1	Testimone	-	-	-	84,6 a ⁽¹⁾
2	Laser	spinosad	30 ml/hl	19/6	39,5 b (53,3) ⁽²⁾
3	Estratto di polifenoli	polifenoli	0,4 %	19/6, 21/6, 24/6	80 a (0)
Significatività					Sì

⁽¹⁾ Valore medio di 4 ripetizioni. A lettere differenti corrisponde una differenza statisticamente significativa ($p \leq 0,05$), Test SNK ⁽²⁾ Efficacia Abbott

CONCLUSIONI

L'estratto ha evidenziato un'alta efficacia (69%). Tuttavia la bassa infestazione (13 % dei frutti colpiti nel testimone) e le differenze di attacco rilevate nelle diverse repliche non hanno consentito di ottenere dati statisticamente significativi.

Nella prova 2 in presenza di un importante attacco di *Drosophila* (60% dei frutti colpiti nel testimone) l'estratto ha evidenziato una bassa efficacia (25%). La variabilità di campo non ha consentito di differenziare tra loro le diverse tesi.

La prova 3 con un attacco elevato del fitofago (85% dei frutti sintomatici nel non trattato) è risultata statisticamente significativa: lo standard di riferimento (spinosad) si è statisticamente differenziato dalle altre tesi mentre l'estratto ha evidenziato un'efficacia nulla con valori analoghi a quelli del testimone.

Conclusioni triennio

Sono stati saggiati tutti gli estratti selezionati dalla sotto-azione 3.1 sui ceppi batterici e fungini previsti dal progetto ma nessun risultato ha permesso di raggiungere l'indicatore di risultato per questo attività. Per questo motivo ci si è concentrati sulla valutazione di attività di estratti su fitofagi sia in laboratorio sia in semi campo. Queste hanno permesso di individuare come solamente l'estratto di raspi all'1% manifesti una potenziale attività nel contenimento del moscerino dei piccoli frutti mentre non ha evidenziato effetti degni di essere presi in considerazione in prove seguenti nel controllo di fitofagi (Psilla del pero, Tingide del pero, Cimice asiatica) e dei fitopatogeni. Gli altri estratti analizzati nei test preliminari non hanno mostrato attività degna di nota per lo sviluppo successivo. L'estratto di raspi alla concentrazione 1% (meno efficace quella allo 0,1%) che in semi campo (una condizione meno estrema rispetto al pieno campo) forniva una mortalità del 100% sugli individui di *Drosophila suzukii* dopo 48 ore dall'esposizione. Questo promettente risultato può essere il punto di partenza per la sperimentazione in pieno campo.

Per quanto attiene appunto alle sperimentazioni in campo, l'estratto di polifenoli da raspi ha evidenziato risultati altalenanti: promettenti nella prima esperienza del 2018 su cv. Van dove ha raggiunto un'alta efficacia (69%) superiore a quella dello standard di riferimento, bassa efficacia (25%) nella seconda prova e assenza di efficacia nella terza esperienza. L'impressione è che con il crescere dell'infestazione in campo l'efficacia dell'estratto tenda a calare in maniera significativa. Un ulteriore aspetto non trascurabile è la riscontrata scarsa standardizzazione dei sottoprodotti in termini di contenuto di biomolecole attive nelle diverse annate. Il formulato alla dose impiegata è risultato selettivo sulla cultura e non si sono riscontrati problemi di fitotossicità. Un altro aspetto importante da sottolineare è l'unicità di ogni estratto: indipendentemente dal tipo di matrice impiegata (in questo caso raspi di uva della cv Sangiovese) e dalla modalità di estrazione scelta l'estratto che ne deriva è per composizione unico e irripetibile. Vista la bassa resa la produzione dell'estratto ha richiesto tempi molto lunghi che non hanno consentito di ottenere un quantitativo sufficiente per consentire di provare l'estratto in campo al dosaggio (1%) che nelle prove di

laboratorio aveva fornito i migliori risultati. In questo senso, le limitazioni dovute alla pandemia Covid-19 hanno influito molto negativamente sugli aspetti operativi, in particolare quelli legati alle estrazioni per poter ottenere una quantità di estratto sufficiente ad ulteriori prove.

SOTTO-AZIONE 3.3 – VALORIZZAZIONE ALIMENTARE (NUTRACEUTICA, INGREDIENTISTICA)

Uar: UNIFE (Tutte le attività e prove di questa sotto-azione sono svolte presso i laboratori UniFE sotto la supervisione della prof.ssa Alessandra Guerrini e dott. Nicola Marchetti)

Le attività e le relative prove in oggetto alla presente sotto-azione rappresentano un output sostanziale e cruciale dell'intero progetto di valorizzazione dei sottoprodotti delle filiere agro-alimentari. La sotto-azione mira infatti ad individuare l'efficacia di estratti e/o biomolecole ottenuti con metodiche *green* (trattati e non trattati enzimaticamente) rispetto a contesti salutistici della nutraceutica ed ingredientistica alimentare di grande attualità ed impatto sia di mercato, sia sociale. La sotto-azione si sviluppa seguendo lo schema di attività e prove sotto riportato.

Obiettivo specifico di questa sotto-azione è valutare l'efficacia antiossidante e l'applicabilità nel contesto alimentare, con specifico riferimento alla nutraceutica ed ingredientistica, degli estratti arricchiti e di biomolecole messi a punto nella sotto-azione 3.1.

Indicatore di risultato della sotto-azione è quello di concorrere all'individuazione di almeno un estratto arricchito/biomolecola attiva con una attività antiossidante espressa in laboratorio come equivalenti di trolox con valore non inferiore a 0.5 mmol trolox/g di matrice estratta.

Sotto-azione	
3.3 – Valorizzazione alimentare (nutraceutica, ingredientistica)	
Attività	Prova
3.3.1. Identificazione e quantificazione puntuale di classi chimiche presenti negli estratti per un loro successivo e mirato indirizzo in ambito nutraceutico e ingredientistico alimentare	3.3.1.1. Valutazioni semi-quantitative e bio-autografiche di attività antiossidante
3.3.2. Determinazione della risposta ossidativa e valutazione dell'espressione genica di enzimi ad attività pro- ed anti-ossidante	3.3.2.1. Valutazioni <i>in vitro</i> mediante differenti saggi con valenza complementare alla determinazione complessiva della capacità antiossidante
3.3.3. Individuazione di molecole utili all'ingredientistica alimentare	3.3.3.1. Saggi shelf-life rispetto alla capacità biostatica e biocida
3.3.4. Attività in laboratorio per la valutazione di bioaccessibilità e biodisponibilità di componenti funzionali bioattivi	3.3.4.1. Simulazione in laboratorio del processo digestivo
	3.3.4.2. Biodisponibilità di fitocomposti bioattivi, prove in laboratorio
	3.3.4.3. Valutazione di sistemi di incapsulamento

ATTIVITÀ 3.3.1. IDENTIFICAZIONE E QUANTIFICAZIONE PUNTUALE DI CLASSI CHIMICHE PRESENTI NEGLI ESTRATTI PER UN LORO SUCCESSIVO E MIRATO INDIRIZZO IN AMBITO NUTRACEUTICO E INGREDIENTISTICO ALIMENTARE.

Questa attività si è svolta con l'obiettivo dell'individuazione di un estratto arricchito/biomolecola attiva con una attività antiossidante espressa in laboratorio come equivalenti di trolox con valori non inferiori a 0.5 mmol trolox/mg di matrice estratta. Questo valore viene considerato di indirizzo per la valutazione dell'estratto in ambito nutraceutico ed ingredientistico.

Prova 3.3.1.1. Valutazioni semi-quantitative e bio-autografiche di attività antiossidante

Questa prova è finalizzata alla determinazione dell'attività antiossidante degli estratti ottenuti mediante metodo spettrofotometrico e HP-TLC bioautografica. La strategia spettrofotometrica permette di evidenziare le proprietà antiossidanti dell'estratto *in toto*, mentre la valutazione bioautografica evidenzia le classi chimiche e/o le biomolecole dell'estratto principalmente responsabili della bioattività dell'intero fitocomplesso (fitocomplesso=estratto).

Per maggiore completezza questa prova riporta valutazioni semi-quantitative associate a diverse valutazioni di attività antiossidante (es. saggi bioautografici), già poi ugualmente replicate nella successiva azione 3.3.2 (determinazione della risposta ossidativa e valutazione dell'espressione genica di enzimi ad

attività pro- ed anti-ossidante) e relativa prova (3.3.2.1 - Valutazioni *in vitro* mediante differenti saggi con valenza complementare alla determinazione complessiva della capacità antiossidante) poiché i risultati qui ottenuti rispondono anche agli obiettivi della successiva azione.

MATERIALI E METODI

Le proprietà antiossidanti sono state valutate per poter verificare in via preliminare gli estratti potenzialmente utili ad una proiezione salutistica (nutraceutica).

Attività antiossidante (DPPH, metodo spettrofotometrico): Valutazioni semi-quantitative e bio-autografiche di attività antiossidante (DPPH; ABTS assays) utilizzando strategie di cromatografia planare ad alta risoluzione (HP-TLC bio-autografica). Questa prova verrà effettuata su ogni prodotto della sotto azione 3.1 contenente una quantità di molecole attive coerente con quanto indicato negli indicatori di risultato. Ogni prova prevederà 1 replica.

L'attività antiossidante dei vari estratti valutata per via spettrofotometrica è stata espressa secondo due modalità:

1. IC₅₀: concentrazione di un campione necessaria ad eliminare il 50% dei radicali liberi (DPPH);
2. mmol trolox/g (unità di misura dell'indicatore di risultato)

Attività antiossidante (DPPH, HP-TLC bioautografico): È stata valutata sia mediante analisi bioautografica (DPPH-(HP)TLC-bioautographic assay) che mediante saggio spettrofotometrico (Spettrofotometro UV-Vis Helios) impiegando per entrambi i test il radicale DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil). I saggi sono stati sviluppati come riportato in Nostro et al. (2016). Tutti gli esperimenti sono stati effettuati in triplicato e i risultati ottenuti sono stati riportati come media ± deviazione standard.

RISULTATI

Attività antiossidante (DPPH, metodo spettrofotometrico)

Per valutare le proprietà antiossidanti con test DPPH sono stati presi in considerazione gli estratti idroalcolici ottenuti con metodo UAE, in quanto caratterizzati dalla componente polifenolica più abbondante e normalmente presa a riferimento per esprimere attività antiossidante, ed i derivati dei processi di idrodistillazione (Tabelle 1A e 1B).

Tabella 1A. Attività antiossidante espressa come concentrazione (µg/ml di estratto) capace di inibire il 50% delle forme radicaliche presenti in soluzione (IC₅₀) e mmol trolox/g. I valori si riferiscono al dato medio di 3 differenti esperimenti.

Campioni	DPPH IC ₅₀ (µg/ml)	mmol trolox/g
VINACCE ROSSE EtOH 50%	11,09 ± 0,78	0,32
VINACCE BIANCHE EtOH 50%	20,45 ± 1,25	0,18
RASPI EtOH 50%	13,36 ± 0,58	0,27
VINACCIOLI EtOH 50%	6,51 ± 0,10	0,55
FOGLIE VITE var Lambrusco H ₂ O 100%	21,56 ± 2,19	0,17
FOGLIE VITE var Lambrusco EtOH 50%	8,07 ± 0,46	0,44
FOGLIE VITE var Lambrusco EtOH 100%	49,78 ± 5,92	0,07
MELE H ₂ O 100%	>100	/
MELE EtOH 50%	50,11 ± 1,96	0,07
MELE EtOH 100%	>100	/

PERE H ₂ O 100%	32,37	± 0,98	0,11
PERE EtOH 50%	11,97	± 0,89	0,30
PERE EtOH 100%	98,81	± 2,91	0,04
SANSE H ₂ O 100%	36,16	± 1,09	0,10
SANSE EtOH 50%	10,23	± 0,57	0,35
SANSE EtOH 100%	27,54	± 0,21	0,13
MIX FAGIOLI H ₂ O 100%	>100		/
MIX FAGIOLI EtOH 50%	>100		/
MIX FAGIOLI EtOH 100%	>100		/
CANNELLINI H ₂ O 100%	>100		/
CANNELLINI EtOH 50%	>100		/
CANNELLINI EtOH 100%	>100		/
FAGIOLINI H ₂ O 100%	>100		/
FAGIOLINI EtOH 50%	>100		/
FAGIOLINI EtOH 100%	>100		/

È stata valutata l'attività antiossidante, per via analisi spettrofotometrica, degli estratti ottenuti con UAE in un range di concentrazione compreso tra 1 e 100 µg/ml. La maggior parte degli estratti non è stato coerente con il valore limite stabilito dal progetto.

Solo i campioni di estratti di vinaccioli ottenuto con EtOH 50% ha riportato valori di attività antiossidante in linea con l'indicatore di risultato.

L'estratto EtOH 50% di foglie di vite ha espresso anch'esso risultati di rilievo, sia per quanto riguarda l'estratto UAE che i sottoprodotti della distillazione (feccia ed acque aromatiche).

Per tali scarti, la valutazione di attività antiossidante ha confermato la qualità dell'impostazione dello schema sperimentale *in silico* (DOE), indicando nuovamente gli estratti ottenuti con le condizioni intermedie (9, 10 e 11) come quelli più performanti (Figura 1).

In linea generale l'attività più rilevante è stata espressa dagli estratti degli scarti della filiera vitivinicola, risultati certamente attesi, tuttavia anche i risultati degli estratti UAE eseguiti con EtOH 50% di scarti di pere ed olive (sanse) hanno mostrato un'attività interessante, essendo il loro valore di mmol trolox/g di poco inferiore a quello posto come indicatore del limite di significatività all'interno del progetto.

Per queste matrici di scarto, si è osservata una corrispondenza tra il contenuto di polifenoli e l'attività antiossidante espressa nel saggio spettrofotometrico, infatti a maggior quantità di polifenoli totali corrisponde un IC₅₀ minore, e quindi una attività maggiore.

I distillati non sono stati testati perché si è preferito utilizzare il poco campione prodotto per le prove di attività fitoiatrica. La capacità antiossidante delle acque aromatiche è risultata essere leggermente inferiore rispetto a quella degli estratti UAE,

I dati ottenuti dalle analisi degli estratti di feccia di distillazione delle matrici di scarto della filiera vitivinicola sono risultati in linea con gli estratti UAE delle stesse, forse a causa delle similitudini di composizione chimica tra i due fitocomplessi, anche se queste ultime hanno mostrato valori di capacità antiossidante più performanti.

Anche nel caso delle pere, l'attività degli estratti UAE è risultata essere maggiore di quella delle acque aromatiche provenienti dalle stesse matrici, ma in linea con quella degli estratti di feccia di distillazione.

Per quanto riguarda l'estratto di mele, invece, l'estrazione della feccia di distillazione in EtOH 50% ha mostrato un'attività antiossidante leggermente maggiore rispetto all'estratto UAE, comunque lontana dall'indicatore stabilito per il valore soglia del progetto.

Tabella 1B. Attività antiossidante espressa come concentrazione ($\mu\text{g/ml}$ di estratto di residui post distillazione) capace di inibire il 50% delle forme radicaliche presenti in soluzione (IC_{50}). I dati con valore più basso vanno quindi letti come i più performanti. I valori si riferiscono al dato medio di 3 differenti esperimenti.

Campioni	DPPH IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	mmol trolox/g
VINACCE ROSSE DISTILLATO	/	/
VINACCE ROSSE ACQUA AROMATICA	14,29 \pm 0,97	0,25
VINACCE ROSSE FECCIA EtOH 50%	12,57 \pm 0,95	0,28
VINACCE BIANCHE DISTILLATO	/	/
VINACCE BIANCHE ACQUA AROMATICA	14,96 \pm 0,71	0,24
VINACCE BIANCHE FECCIA EtOH 50%	13,02 \pm 0,62	0,27
RASPI DISTILLATO	/	/
RASPI ACQUA AROMATICA	14,37 \pm 0,98	0,25
RASPI FECCIA EtOH 50%	13,54 \pm 0,65	0,26
VINACCIOLI DISTILLATO	/	/
VINACCIOLI ACQUA AROMATICA	10,26 \pm 0,70	0,35
VINACCIOLI FECCIA EtOH 50%	8,19 \pm 0,56	0,44
MELE DISTILLATO	/	/
MELE ACQUA AROMATICA	99,86 \pm 6,79	0,04
MELE FECCIA EtOH 50%	24,99 \pm 1,19	0,14
PERE DISTILLATO	/	/
PERE ACQUA AROMATICA	21,77 \pm 1,64	0,16
PERE FECCIA EtOH 50%	10,25 \pm 0,70	0,35
FOGLIE VITE var Lambrusco DISTILLATO	/	/
FOGLIE VITE var Lambrusco ACQUA AROMATICA	17,84 \pm 1,34	0,20
FOGLIE VITE var Lambrusco FECCIA EtOH 50%	7,97 \pm 0,38	0,45
TROLOX	3,58 \pm 0,20	1,00

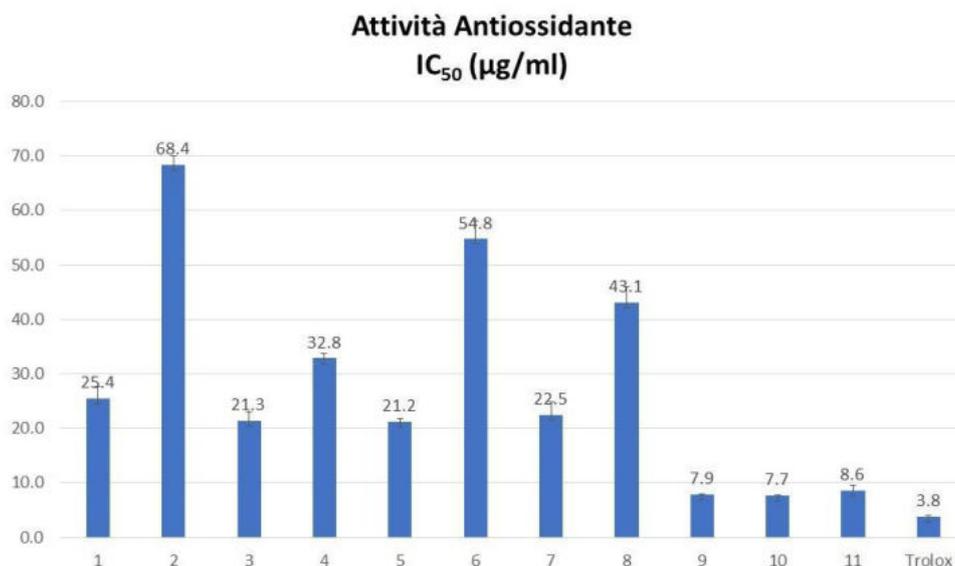


Figura 1. Attività antiossidante ricavata per via spettrofotometrica degli estratti di foglie ottenuti rispetto alle variabili evidenziate dal DOE (vedi Tabella 2, Prova 3.1.2.2. Prove di valutazione della componente fenolica e terpenica). I risultati sono espressi come concentrazione (µg/ml di estratto) capace di inibire il 50% delle forme radicaliche presenti in soluzione (IC₅₀). I dati con valore più basso vanno quindi letti come i più performanti. I valori si riferiscono al dato medio di 3 differenti esperimenti.

Attività antiossidante legumi

Per stimare l'attività antiossidante degli scarti di lavorazione presi in esame, sono stati determinati i valori di IC₅₀ tramite saggi spettrofotometrici, del DPPH (Figura 2 e 3), valutando, nel particolare la loro capacità *radical scavenger*. I valori ottenuti sono stati successivamente comparati con il valore di IC₅₀ di un antiossidante di sintesi preso come controllo positivo (Trolox) per valutare la capacità antiossidante in termini di mmol trolox/g, eventualmente confrontati con i dati di letteratura.

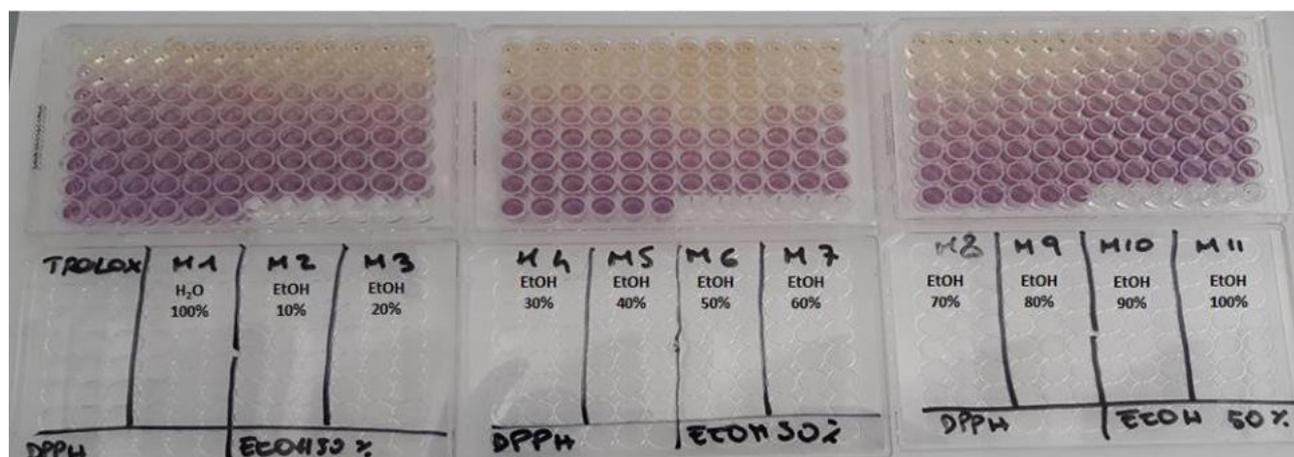


Figura 2. Foto della valutazione dall'attività antiossidante con DPPH in microplate attraverso metodo spettrofotometrico.

Paragonando i risultati ottenuti dai campioni testati con quello del controllo positivo, tutti gli estratti risultano avere un'attività antiossidante meno marcata. Quello che ha mostrato la miglior bioattività risulta essere l'estratto al 50% del mix di fagioli (IC₅₀ pari a 0.24 ± 0,11 mg/ml e TAEC pari a 0.015 mg/mg di estratto secco). Questo dato va di pari passo con quello ottenuto nella quantificazione dei polifenoli totali dove, proprio questa matrice ha dimostrato il miglior compromesso tra polifenoli totali e flavonoidi, anche

se il contenuto più alto di polifenoli era relativo all'estratto in etanolo al 60%. Possiamo dunque ipotizzare una relazione diretta tra il quantitativo di polifenoli totali della matrice ed il suo potere antiossidante.

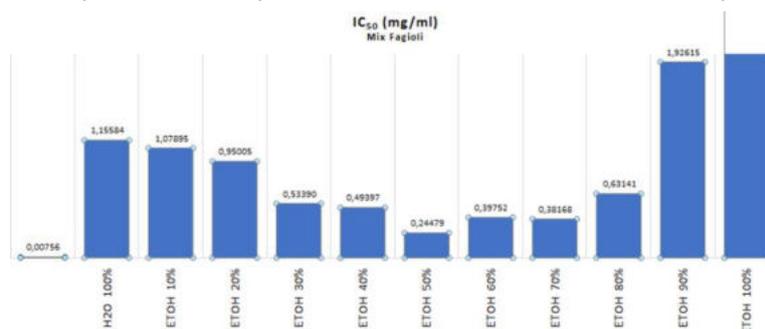


Figura 3. Valutazione dall'attività antiossidante con DPPH degli estratti idroalcolici derivati dalla matrice mix di fagioli, espressa in IC₅₀ (mg/ml).

Confrontando questi risultati con quelli di Rocha et al., (Rocha-Guzmán, Nuria Elizabeth, Herzog Annete, González-Laredo, Rubén Francisco, Ibarra-Pérez, Francisco Javier, Zambrano-Galván, Graciela, Gallegos-Infante, José Alberto. Antioxidant and antimutagenic activity of phenolic compounds in three different colour groups of common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L). Food Chemistry 103(2):521-527) si nota che l'attività antiossidante è direttamente proporzionale al quantitativo di polifenoli presenti nelle matrici del fagiolo comune, e la scelta del solvente utilizzato è molto importante: per gli autori le estrazioni con acetone al 70% e metanolo al 50% hanno consentito di ottenere valori di attività antiossidante più significativi (vedi anche prova 3.3.2.1). Il valore di IC₅₀ del controllo positivo (Trolox) è di 0.007 mg/ml quindi circa due ordini di grandezza in meno rispetto a quella dell'estratto più attivo (0.24 mg/ml). L'estratto con etanolo al 100% non ha raggiunto una inibizione tale da poter calcolare un valore di IC₅₀.

Per quanto concerne gli estratti di fagioli cannellini (Figura 4) non è possibile trovare una correlazione diretta tra contenuto di polifenoli e attività antiossidante. Solo per l'estratto ottenuto dal solvente al 10% di etanolo si ottiene un'interessante attività antiossidante correlabile al contenuto elevato di polifenoli e flavonoidi; per gli altri estratti non si evidenzia questo tipo di correlazione e l'attività potrebbe essere dovuta ad altri componenti antiossidanti. Anche l'estratto al 70% di etanolo ha un buon IC₅₀ non correlabile direttamente al contenuto di flavonoidi e polifenoli.

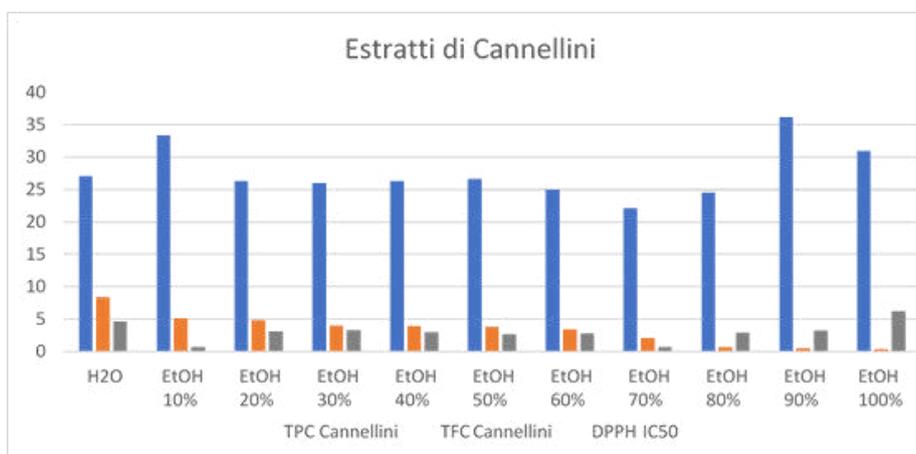


Figura 3. Paragone tra il contenuto di fenoli (TPC), flavonoidi (TFC) ed attività antiossidante con DPPH degli estratti idroalcolici derivati dalla matrice fagioli cannellini.

Gli estratti di fagiolini hanno mostrato una correlazione tra contenuto di polifenoli e attività antiossidante (Figura 4) anche se non sembra che questa correlazione dipenda anche dalla miscela solvente estrattiva utilizzata. In generale è evidente che l'estrazione con il quantitativo di polifenoli maggiore è anche quella con l'IC₅₀ inferiore, quindi con l'attività antiossidante maggiore.

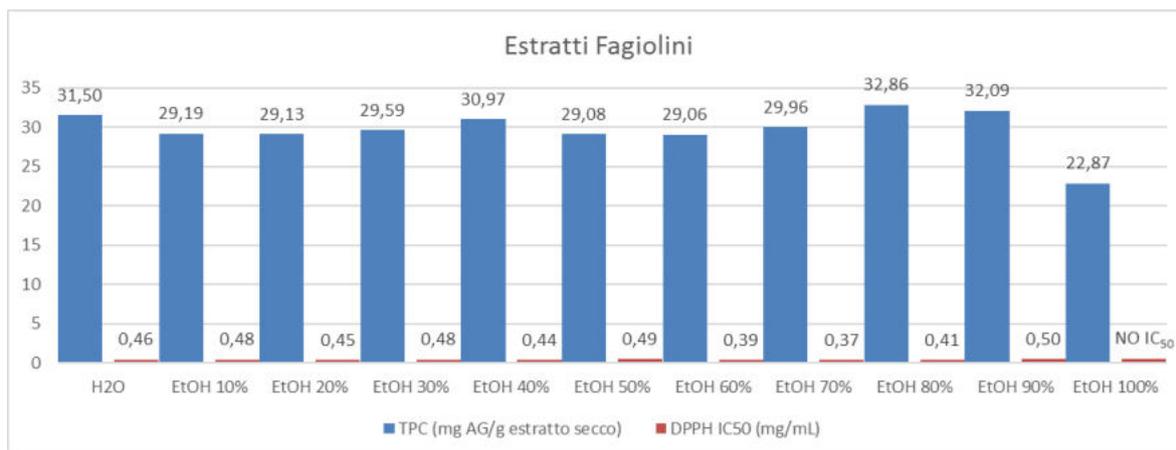


Figura 4. Paragone tra contenuto di fenoli (TPC) ed attività antiossidante (DPPH) degli estratti idroalcolici derivati dalla matrice fagiolini.

Attività antiossidante (DPPH, HP-TLC bioautografico)

L'analisi HP-TLC bioautografica ha confermato da un punto di vista qualitativo la valutazione emersa per l'attività antiossidante quantificata per via spettrofotometrica (IC₅₀). Le bande più chiare 2, 4, 6 della figura 2 (A) relative agli estratti da scarti vitivinicoli trattate con il radicale DPPH corrispondono alle molecole con maggiore attività. Per confronto con le relative lastre non trattate con DPPH (1, 3, 5) appare evidente come le bande comprese tra Rf 0 ed Rf 0.6 corrispondano ai differenti polifenoli (vedi anche Figura 1, Prova 3.1.2.2. Prove di valutazione della componente fenolica e terpenica) ed alle bande più chiare separate – e quindi più attive – degli estratti.

Analogamente, Le bande più chiare 2, 4 della figura 2 (B) relative agli estratti di scarti da mele e pere trattate con il radicale DPPH corrispondono alle molecole con maggiore attività. Per confronto con le relative lastre non trattate con DPPH (1, 3) appare nuovamente evidente come le bande comprese tra Rf 0 ed Rf 0.6 corrispondano ai differenti polifenoli (vedi anche Figura 2, Prova 3.1.2.2. Prove di valutazione della componente fenolica e terpenica) ed alle bande più chiare separate – e quindi più attive – degli estratti.

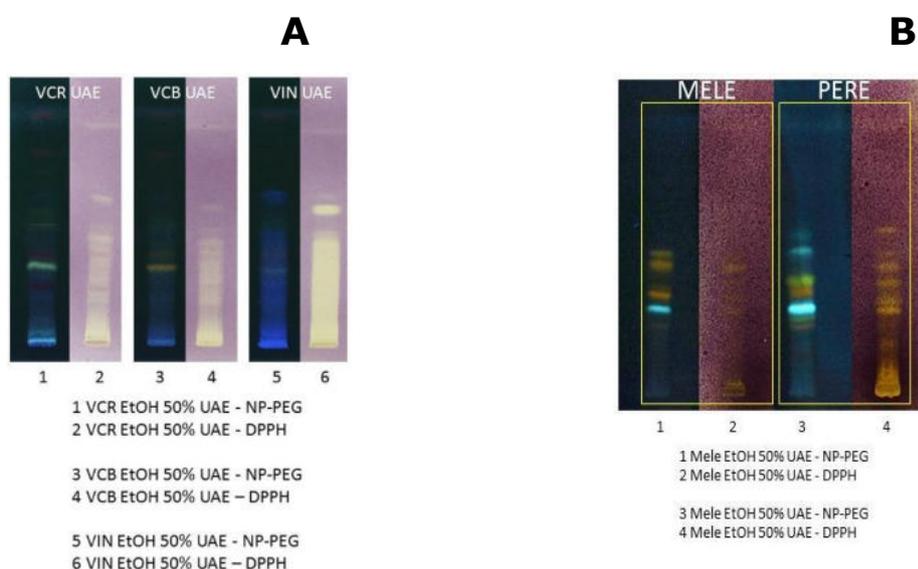


Figura 2. HP-TLC bioautografica per la valutazione dell'attività antiossidante. Per quanto riguarda gli scarti vitivinicoli (A), le bande di riferimento trattate con il radicale DPPH sono 2, 4, 6; le bande corrispondenti 1, 3, 5, si riferiscono agli stessi estratti non trattati per il confronto fingerprinting-attività biologica. Per quanto riguarda gli scarti di mele e pere (B), le bande di riferimento trattate con il radicale DPPH sono 2, 4; le bande corrispondenti 1, 3, si riferiscono agli stessi estratti non trattati per il confronto fingerprinting-attività biologica.

CONCLUSIONI

I campioni di estratti di vinaccioli (VIN) hanno espresso i risultati di maggior rilievo, sia per quanto riguarda l'estratto UAE che i sottoprodotti della distillazione (feccia ed acque aromatiche).

I distillati non sono stati testati perché si è preferito utilizzare il poco campione prodotto per le prove di attività fitoiatrica (in relazione alle restrizioni operative imposte dalla pandemia Covid-19 non è stato possibile estrarre sufficiente materiale).

L'attività rilevante degli estratti degli scarti della filiera vitivinicola ed oleifera era certamente attesa, ma questa valutazione ha messo in risalto anche dati interessanti provenienti dagli estratti UAE eseguiti con EtOH 50% su scarti di mele e pere.

Per queste matrici di scarto, si è osservata una corrispondenza tra il contenuto di polifenoli e l'attività antiossidante espressa nel saggio spettrofotometrico, infatti a maggior quantità di polifenoli totali corrisponde un IC₅₀ minore, e quindi una attività maggiore.

L'attività degli estratti UAE di mele, pere e sanse, infine, è risultata essere maggiore di quella delle acque aromatiche provenienti dalle stesse matrici, ma in linea con quella degli estratti di feccia di distillazione, forse a causa delle similitudini di composizione chimica tra i due fitocomplessi.

Per quanto riguarda gli estratti di scarti da potature di uve lambrusco (foglie), la valutazione di attività antiossidante ha confermato la qualità dell'impostazione estrattiva determinata tramite DOE indicando nuovamente gli estratti 9, 10, 11, come quelli più performanti. L'analisi HP-TLC bioautografica ha invece confermato da un punto di vista qualitativo la valutazione emersa per l'attività antiossidante quantificata per via spettrofotometrica (IC₅₀ e mmol trolox/g).

Le matrici di scarto leguminose non hanno mostrato un'attività antiossidante degna di nota, infatti nessun estratto ha raggiunto un IC₅₀ inferiore a 100 µg/ml. Da riportare che sia per gli scarti mix di fagioli che fagiolini, l'attività antiossidante, anche se bassa, è correlata con quantità di polifenoli (bassa anch'essa).

Rispetto all'indicatore di risultato per questa sotto-azione, la prova ha individuato l'estratto UAE di vinaccioli (50% EtOH:H₂O) quello che soddisfa il dato quantitativo di attività antiossidante, in quanto il valore in mmol trolox/g di 0,55 supera quello determinato dall'indicatore di risultato.

• **ATTIVITÀ 3.3.2. DETERMINAZIONE DELLA RISPOSTA OSSIDATIVA E VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA DI ENZIMI AD ATTIVITÀ PRO- ED ANTI-OSSIDANTE.**

Molti composti polifenolici legati alle fibre vegetali hanno mostrato, soprattutto durante il metabolismo intestinale (attività fermentativa) effetti pro- o anti-ossidanti. Numerosi studi *in vitro* e *in vivo* sono in accordo con questo. I composti polifenolici sono soggetti ad una determinata biodisponibilità durante il processo digestivo, poiché più spesso subiscono deglicosilazione e trasformazioni chimiche ad opera dei batteri intestinali. I metaboliti sono facilmente assorbiti dal colon e successivamente subiscono ulteriori trasformazioni metaboliche, come ad esempio coniugazione con glutatione, oppure acido glucuronico o con un gruppo solfato, che possono anche ridurre la bioattività di questi composti. Il metabolismo batterico di questi composti è importante poiché consente ai numerosi addotti glicosilati di essere idrolizzati ad essere più facilmente assorbiti o essere substrati per ulteriori trasformazioni chimiche. Anche una volta presenti nel flusso sistemico possono subire altre modificazioni metaboliche, ma solitamente continuano a circolare nel sistema enteroepatico finché subiscono eliminazione con la bile o le urine.

Inoltre, sebbene molte molecole polifenoliche sono antiossidanti naturali, è stato evidenziato come polifenoli possono avere attività pro-ossidante in presenza di ioni di metalli di transizione (ad es. Cu, Fe). In condizioni di elevata concentrazione di composti fenolici, elevato pH e in presenza di ioni metallici, si può avere induzione dell'attività pro-ossidante con generazione di radicali liberi. Proprio in presenza di Cu(II), il resveratrolo, presente nel mosto come nelle vinacce, è in grado di catalizzare la riduzione a Cu(I) e questo può indurre la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e causare danni al DNA, mutagenesi, oncogenesi e invecchiamento. Ovviamente, tale attività pro-ossidante non è solamente distruttiva per i sistemi biologici e può essere applicata con modalità terapeutiche per il co-trattamento di certe neoplasie tumorali ad esempio. Tuttavia, numerosi studi hanno evidenziato che l'attività antiossidante dei polifenoli viene esercitata attraverso la riduzione dei ROS, il contenimento della perossidazione lipidica, prevenzione dei danni al DNA e incremento dell'attività antiossidante degli enzimi espressi da tessuti, come ad esempio superossido dismutasi, glutatione perossidasi, catalasi.

- **Prova 3.3.2.1. Valutazioni in vitro mediante differenti saggi con valenza complementare alla determinazione complessiva della capacità antiossidante.**

A seguire della prova precedente, questa prova mira a confermare quanto già rilevato confrontando le attività con più approcci (DPPH spettrofotometrico, ABTS spettrofotometrico, bio-autografica, fotochemiluminescenza PCL) cercando di individuare almeno un estratto arricchito/biomolecola attiva utile ad una proiezione salutistica (nutraceutica, ingredientistica alimentare) con una attività antiossidante espressa in laboratorio come equivalenti di Trolox con valore non inferiore a 0.5 mmol Trolox/g di matrice estratta (indicatore di risultato per il comparto alimentare).

MATERIALI E METODI

DPPH, metodo spettrofotometrico – ABTS metodo spettrofotometrico: Valutazioni semi-quantitative e bio-autografiche di attività antiossidante (DPPH; ABTS assays) utilizzando strategie di cromatografia planare ad alta risoluzione (HP-TLC bio-autografica). Le misure di capacità antiossidante prese in considerazione riguardano diversi radicali sintetici, come ABTS e DPPH, e il metodo PCL (photochemiluminescence) basato sul radicale superossido. Su questi radicali viene testata l'azione di scavenging da parte degli antiossidanti estratti da vinacce rosse. Il parametro $IC_{50,ABTS}$ sta ad indicare la concentrazione di estratto in grado di inibire il 50% del radicale ABTS: maggiore è il potere (capacità) antiossidante, minore sarà IC_{50} poiché è sufficiente un piccolo quantitativo di estratto per inibire i radicali liberi. Tutte le determinazioni di capacità antiossidante utilizzano Trolox come antiossidante standard di riferimento. Ogni prova è stata effettuata su 3 repliche.

Fotochemiluminescenza (PCL): Il sistema PCL è stato progettato per la determinazione della capacità antiossidante totale di sostanze solubili in acqua (protocollo ACW) e in matrici lipidiche (protocollo ACL). Tuttavia i due metodi sono completamente interscambiabili e la loro applicazione dipende molto da eventuali effetti matrice e deve essere valutato di volta in volta quale protocollo meglio si adatta ad una certa matrice reale, indipendentemente dalla sua idrofilicità o idrofobicità complessiva. E' un metodo che sfrutta la fotochemiluminescenza ed è basato sull'ossidazione fotoindotta del luminol dovuta all'interazione con l'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$) generato per via fotochimica nel sistema di misurazione per mezzo di un reagente, accompagnata da un'intensa chemiluminescenza. In presenza di sostanze che agiscono come radical scavenger, l'intensità della chemiluminescenza è attenuata in funzione della loro concentrazione. In questo modo, le proprietà antiradicaliche della sostanza analizzata possono essere realmente quantificate. I risultati sono espressi come unità equivalenti di acido ascorbico per sostanze idrosolubili o unità equivalenti di Trolox per sostanze liposolubili. Ogni singola misura richiede da 1 a 3 minuti. Il segnale rilevato aumenta immediatamente dopo l'inizio della misura fino ad raggiungere un plateau dopo del tempo. La curva che si ottiene ha le caratteristiche di una curva di saturazione con differenti altezze al livello del plateau. La capacità antiossidante per un campione si manifesta in una caratteristica inibizione (riduzione dell'integrale) relativa al bianco.

Caratteristiche dello strumento risultano quindi essere:

- Alta sensibilità: concentrazioni nanomolari
- Tempi di analisi molto brevi: ≤ 3 minuti
- Buona riproducibilità: $CV < 2\%$

Gli estratti analizzati nella ricerca hanno condotto ad una risposta positiva in modalità ACL. La prova comporta l'utilizzo di quattro reagenti:

- Reagente 1: ACL-Diluent (solvente e fluido di diluizione) pronto per l'uso
- Reagente 2: Tampone di reazione, pronto per l'uso
- Reagente 3: Soluzione di PS-2 (fotosensibilizzatore)
- Reagente 4: Standard di calibrazione per la quantificazione di antiossidanti insolubili in acqua come equivalenti di TROLOX

La procedura sperimentale comporta inizialmente la misura di due bianchi. La deviazione non deve superare il 5%. Successivamente si procede con la calibrazione, utilizzando standard di Trolox a 0,5 1,0 2,0 e 2,5 nmol (corrispondenti a 5-25 μ l del reagente 4). Alla calibrazione segue la misura del campione che deve essere solubile in metanolo. Sono state effettuate varie diluizioni ai campioni trattati per poter rientrare nel range di linearità della curva di calibrazione e all'interno del range di rilevazione del PHOTOCHEM.

Per garantire l'affidabilità del risultato è necessario che le curve dei campioni siano comprese tra quelle di calibrazione, nel caso contrario occorre variare la diluizione. In un primo passaggio si determina l'integrale sotto la curva, che permette a sua volta di misurare la capacità antiossidante, la quale viene espressa in

nmol di Trolox equivalenti. Viene misurata la differenza tra l'area sottesa dalla curva del bianco ($\int B$) e l'area sotto la curva del campione ($\int S$):

$$\int B - \int S \quad (1)$$

Il valore di inibizione è il rapporto tra l'Eq. 1 e l'integrale del bianco:

$$I = \frac{\int B - \int S}{\int B}$$

Per garantire una maggior affidabilità dei risultati ogni campione è stato analizzato in doppio. Viene poi calcolata la media delle due misurazioni.

DPPH, HP-TLC bioautografico: È stata valutata sia mediante analisi bioautografica (DPPH-(HP)TLC-bioautographic assay) che mediante saggio spettrofotometrico (Spettrofotometro UV-Vis Helios) impiegando per entrambi i test il radicale DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil). I saggi sono stati sviluppati come riportato in Nostro et al. (2016). Tutti gli esperimenti sono stati effettuati in triplicato e i risultati ottenuti sono stati riportati come media \pm deviazione standard.

RISULTATI

DPPH, metodo spettrofotometrico

Per valutare le proprietà antiossidanti con test DPPH sono stati presi in considerazione gli estratti idroalcolici ottenuti con metodo UAE, in quanto caratterizzati dalla componente polifenolica più abbondante e normalmente presa a riferimento per esprimere attività antiossidante, ed i derivati dei processi di idrodissoluzione (**Tabelle 1A e 1B**).

È stata valutata l'attività antiossidante, per via analisi spettrofotometrica, degli estratti ottenuti con UAE in un range di concentrazione compreso tra 1 e 100 $\mu\text{g/ml}$. La maggior parte degli estratti non è stato coerente con il valore limite stabilito dal progetto, solo i campioni di estratti di vinaccioli e di foglie di vite hanno espresso i risultati di maggior rilievo, sia per quanto riguarda l'estratto UAE che i sottoprodotti della distillazione (feccia ed acque aromatiche).

In linea generale l'attività più rilevante è stata espressa dagli estratti degli scarti della filiera vitivinicola, risultati certamente attesi, tuttavia anche i risultati degli estratti UAE eseguiti con EtOH 50% di scarti di pere ed olive (salse) hanno mostrato un'attività interessante, essendo il loro valore di mmol trolox/g di poco inferiore a quello posto come indicatore del limite di significatività all'interno del progetto. Per queste matrici di scarto, si è osservata una corrispondenza tra il contenuto di polifenoli e l'attività antiossidante espressa nel saggio spettrofotometrico, infatti a maggior quantità di polifenoli totali corrisponde un IC_{50} minore, e quindi una attività maggiore.

I distillati non sono stati testati perché si è preferito utilizzare il poco campione prodotto per le prove di attività fitoiatrica. La capacità antiossidante delle acque aromatiche è risultata essere leggermente inferiore rispetto a quella degli estratti UAE.

I dati ottenuti dalle analisi degli estratti di feccia di distillazione delle matrici di scarto della filiera vitivinicola sono risultati in linea con gli estratti UAE delle stesse, forse a causa delle similitudini di composizione chimica tra i due fitocomplessi, anche se queste ultime hanno mostrato valori di capacità antiossidante più performanti.

Anche nel caso delle pere, l'attività degli estratti UAE è risultata essere maggiore di quella delle acque aromatiche provenienti dalle stesse matrici, ma in linea con quella degli estratti di feccia di distillazione.

Per quanto riguarda l'estratto di mele, invece, l'estrazione della feccia di distillazione in EtOH 50% ha mostrato un'attività antiossidante leggermente maggiore rispetto all'estratto UAE, comunque lontana dall'indicatore stabilito per il valore soglia del progetto.

Tabella 1A. Attività antiossidante espressa come concentrazione ($\mu\text{g/ml}$ di estratto) capace di inibire il 50% delle forme radicaliche presenti in soluzione (IC_{50}) e mmol trolox/g. I valori si riferiscono al dato medio di 3 differenti esperimenti.

Campioni	DPPH IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)			Mmol trolox/g
VINACCE ROSSE EtOH 50%	11,09	±	0,78	0,32
VINACCE BIANCHE EtOH 50%	20,45	±	1,25	0,18
RASPI EtOH 50%	13,36	±	0,58	0,27
VINACCIOLI EtOH 50%	6,51	±	0,10	0,55
FOGLIE VITE var Lambrusco H ₂ O 100%	21,56	±	2,19	0,17
FOGLIE VITE var Lambrusco EtOH 50%	8,07	±	0,46	0,44
FOGLIE VITE var Lambrusco EtOH 100%	49,78	±	5,92	0,07
MELE H ₂ O 100%		>100		/
MELE EtOH 50%	50,11	±	1,96	0,07
MELE EtOH 100%		>100		/
PERE H ₂ O 100%	32,37	±	0,98	0,11
PERE EtOH 50%	11,97	±	0,89	0,30
PERE EtOH 100%	98,81	±	2,91	0,04
SANSE H ₂ O 100%	36,16	±	1,09	0,10
SANSE EtOH 50%	10,23	±	0,57	0,35
SANSE EtOH 100%	27,54	±	0,21	0,13
MIX FAGIOLI H ₂ O 100%		>100		/
MIX FAGIOLI EtOH 50%		>100		/
MIX FAGIOLI EtOH 100%		>100		/
CANNELLINI H ₂ O 100%		>100		/
CANNELLINI EtOH 50%		>100		/
CANNELLINI EtOH 100%		>100		/
FAGIOLINI H ₂ O 100%		>100		/
FAGIOLINI EtOH 50%		>100		/
FAGIOLINI EtOH 100%		>100		/

Tabella 1B. Attività antiossidante espressa come concentrazione ($\mu\text{g/ml}$ di estratto di residui post distillazione) capace di inibire il 50% delle forme radicaliche presenti in soluzione (IC_{50}). I dati con valore più basso vanno quindi letti come i più performanti. I valori si riferiscono al dato medio di 3 differenti esperimenti.

Campioni	DPPH IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	mmol trolox/g
VINACCE ROSSE DISTILLATO	/	/
VINACCE ROSSE ACQUA AROMATICA	14,29 \pm 0,97	0,25
VINACCE ROSSE FECCIA EtOH 50%	12,57 \pm 0,95	0,28
VINACCE BIANCHE DISTILLATO	/	/
VINACCE BIANCHE ACQUA AROMATICA	14,96 \pm 0,71	0,24
VINACCE BIANCHE FECCIA EtOH 50%	13,02 \pm 0,62	0,27
RASPI DISTILLATO	/	/
RASPI ACQUA AROMATICA	14,37 \pm 0,98	0,25
RASPI FECCIA EtOH 50%	13,54 \pm 0,65	0,26
VINACCIOLI DISTILLATO	/	/
VINACCIOLI ACQUA AROMATICA	10,26 \pm 0,70	0,35
VINACCIOLI FECCIA EtOH 50%	8,19 \pm 0,56	0,44
MELE DISTILLATO	/	/
MELE ACQUA AROMATICA	99,86 \pm 6,79	0,04
MELE FECCIA EtOH 50%	24,99 \pm 1,19	0,14
PERE DISTILLATO	/	/
PERE ACQUA AROMATICA	21,77 \pm 1,64	0,16
PERE FECCIA EtOH 50%	10,25 \pm 0,70	0,35
FOGLIE VITE var Lambrusco DISTILLATO	/	/
FOGLIE VITE var Lambrusco ACQUA AROMATICA	17,84 \pm 1,34	0,20
FOGLIE VITE var Lambrusco FECCIA EtOH 50%	7,97 \pm 0,38	0,45

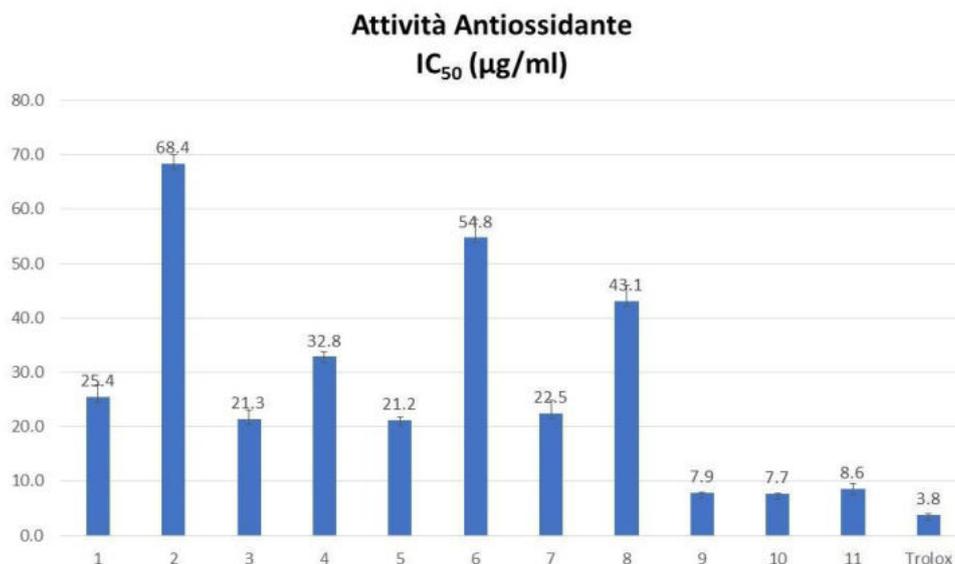


Figura 1. Attività antiossidante ricavata per via spettrofotometrica degli estratti di foglie ottenuti rispetto alle variabili evidenziate dal DOE (vedi Tabella 2, Prova 3.1.2.2. Prove di valutazione della componente fenolica e terpenica). I risultati sono espressi come concentrazione (µg/ml di estratto) capace di inibire il 50% delle forme radicaliche presenti in soluzione (IC₅₀). I dati con valore più basso vanno quindi letti come i più performanti. I valori si riferiscono al dato medio di 3 differenti esperimenti.

Attività antiossidante legumi

Per stimare l'attività antiossidante degli scarti di lavorazione presi in esame, sono stati determinati i valori di IC₅₀ tramite saggi spettrofotometrici, del DPPH (Figura 2 e 3), valutando, nel particolare la loro capacità *radical scavenger*. I valori ottenuti sono stati successivamente comparati con il valore di IC₅₀ di un antiossidante di sintesi preso come controllo positivo (Trolox) ed eventualmente con i dati dalla letteratura specialistica.

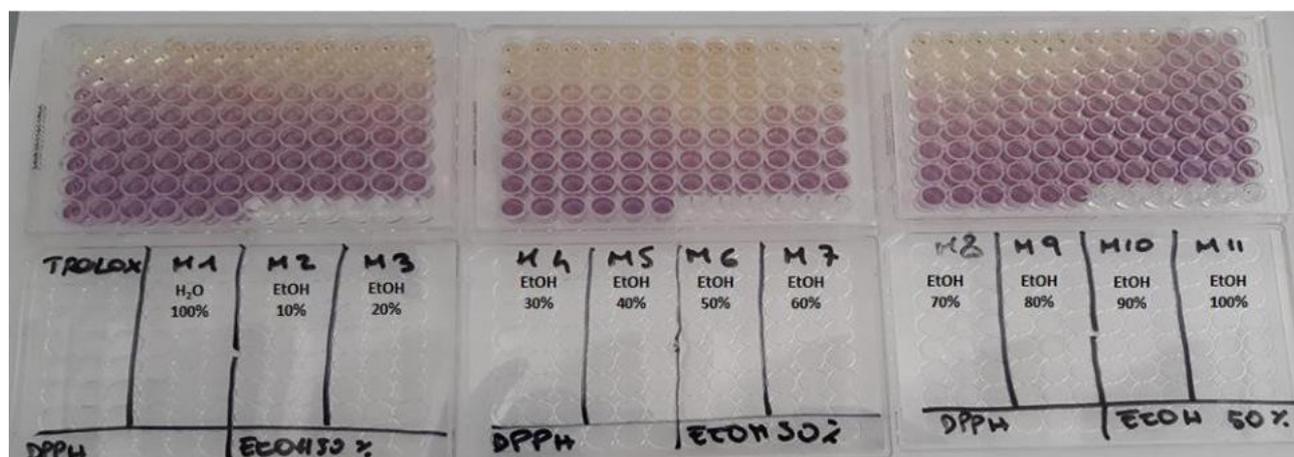


Figura 2. Foto della valutazione dall'attività antiossidante con DPPH in microplate attraverso metodo spettrofotometrico.

Paragonando i risultati ottenuti dai campioni testati con quello del controllo positivo, tutti gli estratti risultano avere un'attività antiossidante meno marcata. Quello che ha mostrato la miglior bioattività risulta essere l'estratto al 50% del mix di fagioli (DPPH pari a $0.24 \pm 0,11$ mg/ml). Questo dato va di pari passo con quello ottenuto nella quantificazione dei polifenoli totali dove, proprio questa matrice ha dimostrato il miglior compromesso tra polifenoli totali e flavonoidi, anche se il contenuto più alto di polifenoli era relativo all'estratto in etanolo al 60%. Possiamo dunque ipotizzare una relazione diretta tra il quantitativo di polifenoli totali della matrice ed il suo potere antiossidante.

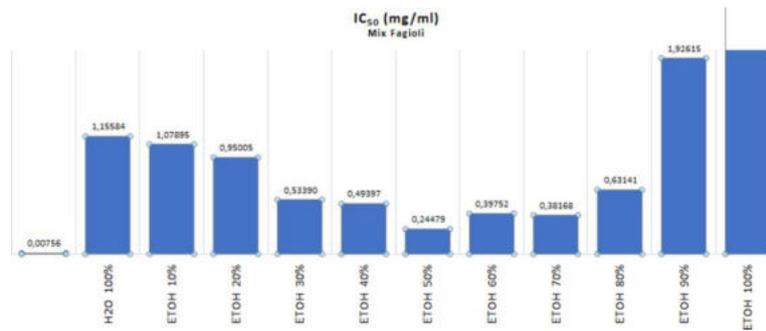


Figura 3. Valutazione dall'attività antiossidante con DPPH degli estratti idroalcolici derivati dalla matrice mix di fagioli, espressa in IC₅₀ (mg/ml).

Confrontando questi risultati con quelli di Rocha et al., (Rocha-Guzmán, Nuria Elizabeth, Herzog Annete, González-Laredo, Rubén Francisco, Ibarra-Pérez, Francisco Javier, Zambrano-Galván, Graciela, Gallegos-Infante, José Alberto. Antioxidant and antimutagenic activity of phenolic compounds in three different colour groups of common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L). Food Chemistry 103(2):521-527) si nota che l'attività antiossidante è direttamente proporzionale al quantitativo di polifenoli presenti nelle matrici del fagiolo comune, e la scelta del solvente utilizzato è molto importante: per gli autori le estrazioni con acetone al 70% e metanolo al 50% hanno consentito di ottenere valori di attività antiossidante più significativi. Il valore di IC₅₀ del controllo positivo (Trolox) è di 0.007 mg/ml quindi circa due ordini di grandezza in meno rispetto a quella dell'estratto più attivo (0.24 mg/ml). L'estratto con etanolo al 100% non ha raggiunto una inibizione tale da poter calcolare un valore di IC₅₀.

Per quanto concerne gli estratti di fagioli cannellini (Figura 4) non emerge una correlazione diretta tra contenuto di polifenoli e attività antiossidante. Solo per l'estratto ottenuto dal solvente al 10% di etanolo si ottiene un'interessante attività antiossidante correlabile al contenuto elevato di polifenoli e flavonoidi; per gli altri estratti non si evidenzia questo tipo di correlazione e l'attività potrebbe essere dovuta ad altri componenti antiossidanti. Anche l'estratto al 70% di etanolo ha un buon IC₅₀ non correlabile direttamente al contenuto di flavonoidi e polifenoli.

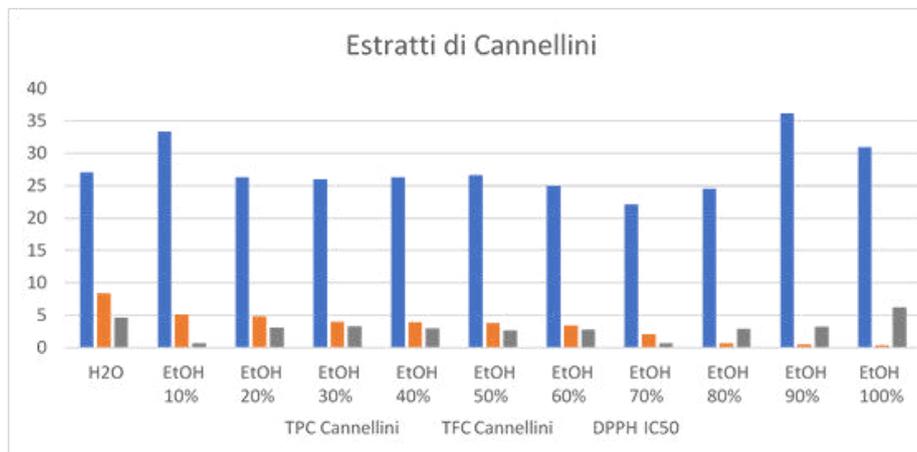


Figura 3. Paragone tra il contenuto di fenoli (TPC), flavonoidi (TFC) ed attività antiossidante con DPPH degli estratti idroalcolici derivati dalla matrice fagioli cannellini.

Gli estratti di fagiolini hanno mostrato una correlazione tra contenuto di polifenoli e attività antiossidante (Figura 4) anche se non sembra che questa correlazione dipenda anche dalla miscela solvente estrattiva utilizzata. In generale è evidente che l'estrazione con il quantitativo di polifenoli maggiore è anche quella con l'IC₅₀ inferiore, quindi con l'attività antiossidante maggiore.

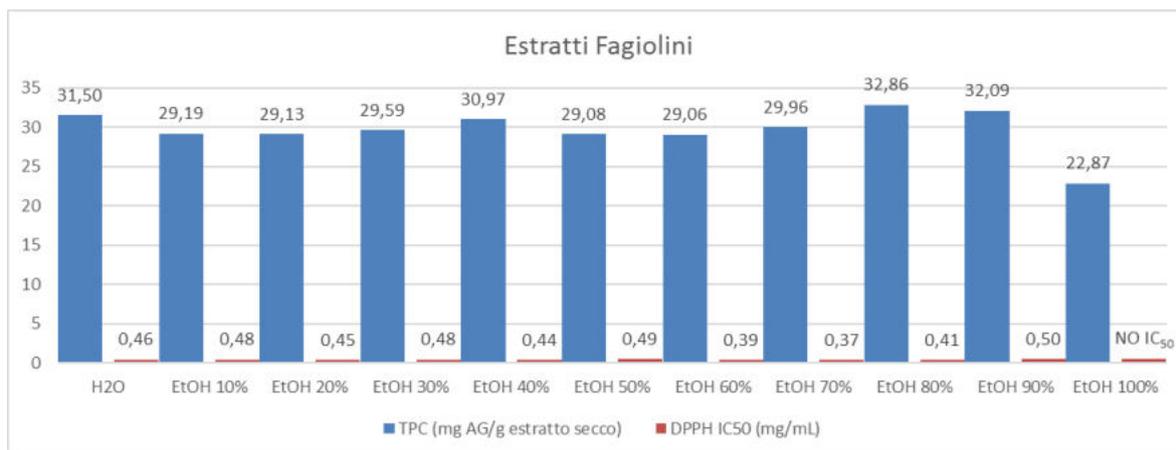


Figura 4. Paragone tra contenuto di fenoli (TPC) ed attività antiossidante (DPPH) degli estratti idroalcolici derivati dalla matrice fagiolini.

Attività antiossidante (DPPH, HP-TLC bioautografico)

L'analisi HP-TLC bioautografica ha confermato da un punto di vista qualitativo la valutazione emersa per l'attività antiossidante quantificata per via spettrofotometrica (IC₅₀). Le bande più chiare 2, 4, 6 della figura 2 (A) relative agli estratti da scarti vitivinicoli trattate con il radicale DPPH corrispondono alle molecole con maggiore attività. Per confronto con le relative lastre non trattate con DPPH (1, 3, 5) appare evidente come le bande comprese tra R_f 0 ed R_f 0.6 corrispondano ai differenti polifenoli (vedi anche Figura 1, Prova 3.1.2.2. Prove di valutazione della componente fenolica e terpenica) ed alle bande più chiare separate – e quindi più attive – degli estratti.

Analogamente, Le bande più chiare 2, 4 della figura 2 (B) relative agli estratti di scarti da mele e pere trattate con il radicale DPPH corrispondono alle molecole con maggiore attività. Per confronto con le relative lastre non trattate con DPPH (1, 3) appare nuovamente evidente come le bande comprese tra R_f 0 ed R_f 0.6 corrispondano ai differenti polifenoli (vedi anche Figura 2, Prova 3.1.2.2. Prove di valutazione della componente fenolica e terpenica) ed alle bande più chiare separate – e quindi più attive – degli estratti.

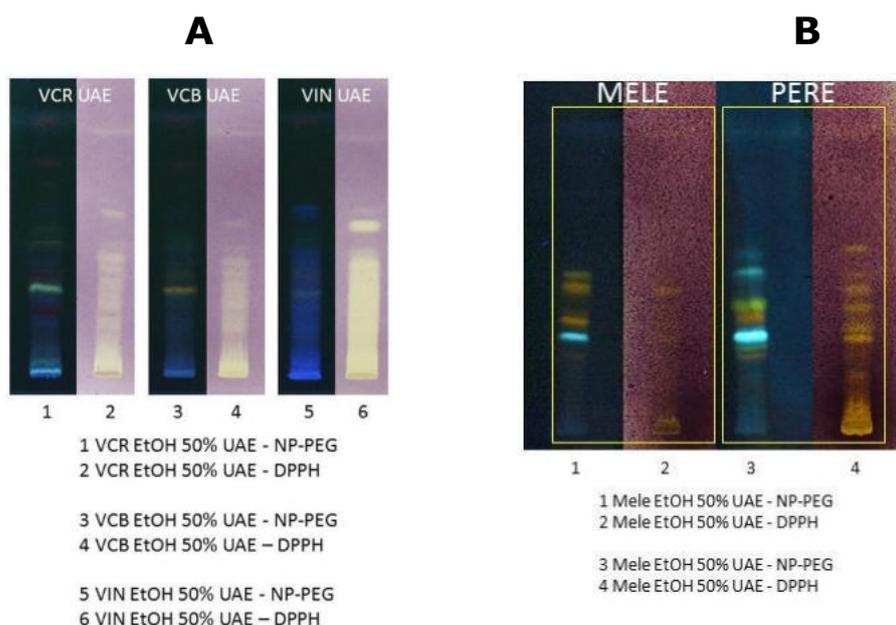


Figura 2. HP-TLC bioautografica per la valutazione dell'attività antiossidante. Per quanto riguarda gli scarti vitivinicoli (**A**), le bande di riferimento trattate con il radicale DPPH sono 2, 4, 6; le bande corrispondenti 1, 3, 5, si riferiscono agli stessi estratti non trattati per il confronto fingerprinting-attività biologica. Per quanto riguarda gli scarti di mele e pere (**B**), le bande di riferimento trattate con il radicale DPPH sono 2, 4; le bande corrispondenti 1, 3, si riferiscono agli stessi estratti non trattati per il confronto fingerprinting-attività biologica.

SOLVENTE	ABTS	DPPH	PCL	IC _{50,ABTS}
	$\mu\text{mol}_{\text{eq}}/\text{mg}_{\text{DE}}$	$\mu\text{mol}_{\text{eq}}/\text{mg}_{\text{DE}}$	$\mu\text{mol}_{\text{eq}}/\text{mg}_{\text{DE}}$	$\mu\text{g}_{\text{eq}}/\text{mL}$
H ₂ O	0,361 ± 0,004	0,397 ± 0,006	0,150 ± 0,003	583 ± 3
H ₂ O/Etanolo	0,410 ± 0,006	0,543 ± 0,004	0,600 ± 0,010	332 ± 3
H ₂ O/Acetone	0,580 ± 0,002	0,842 ± 0,006	0,600 ± 0,010	68 ± 1
Etilacetato	0,391 ± 0,006	0,305 ± 0,001	0,198 ± 0,009	348 ± 3

Tabella 2. Saggi ABTS, DPPH, PCL (fotochemioluminescenza). IC_{50,ABTS} sta ad indicare la concentrazione di estratto in grado di inibire il 50% del radicale ABTS: maggiore è il potere (capacità) antiossidante, minore sarà IC₅₀

In tabella 2 sono riportati i valori riassuntivi e comparativi di attività antiossidante degli estratti di vinaccioli, noti già per essere attività in linea con l'indicatore di risultato: sebbene forniscano risultati leggermente diversi in termini assoluti (situazione nota in letteratura), gli andamenti rispetto ai diversi solventi sono i medesimi e individuano il solvente H₂O/Acetone come quello in grado di fornire il maggior potere antiossidante, di seguito H₂O/Etanolo ed Etilacetato forniscono risultati simili con ABTS e IC₅₀, mentre con DPPH sono H₂O ed Etilacetato a dare i risultati più simili. Con PCL H₂O/Etanolo e H₂O/Acetone danno lo stesso risultato. In generale H₂O è il solvente che fornisce l'estratto a minor capacità antiossidante.

CONCLUSIONI

Come concluso nelle prove precedenti, gli estratti di vinaccioli (VIN) hanno espresso i risultati di maggior rilievo, sia per quanto riguarda l'estratto UAE che i sottoprodotti della distillazione (feccia ed acque

aromatiche). Gli estratti di vinaccioli esaminati nuovamente con diversi approcci dei saggi DPPH, ABTS e PCL (fotochemiluminescenza) con una miscela di solventi acqua-etanolo ed acqua acetone (50%) [la miscela acqua-acetone è stato un ulteriore approccio] si sono caratterizzati di una capacità antiossidante in linea con gli indicatori di risultato per la parte alimentare del progetto. Entrambe le tipologie di estratti con test ABTS e DPPH hanno evidenziato capacità antiossidante comparabile sebbene l'estratto acetone fosse sensibilmente superiore. Il test della fotochemiluminescenza (PCL), in particolare, mostra una capacità antiossidante identica e coerente con l'indicatore atteso sia per l'estratto etanolo al 50% sia per l'estratto acetone al 50%. Va però sottolineato che per la maggiore biocompatibilità di un prodotto ottenuto con solvente idroalcolico piuttosto che con solvente idroacetone, l'estratto con etanolo-acqua al 50% risulta oltremodo più adeguato ad un impiego in un contesto alimentare. I risultati ottenuti, pur con approcci differenti, sono totalmente in linea con i risultati emersi dalle prove precedenti (*Valutazioni semi-quantitative e bio-autografiche di attività antiossidante*) confermando ulteriormente il raggiungimento dell'indicatore di risultato per questa sotto-azione (3.3).

• **ATTIVITÀ 3.3.3. INDIVIDUAZIONE DI MOLECOLE UTILI ALL'INGREDIENTISTICA ALIMENTARE**

Gli obiettivi specifici riguardano l'individuazione di molecole utili all'ingredientistica alimentare per aumentare la shelf life dei prodotti sulla base delle concentrazioni biostatiche e biocide individuate.

Gli aspetti conclusivi rispetto a questo obiettivo saranno estrapolati tenendo conto anche dell'attività antiossidante.

Obiettivo principale dell'attività è quello di concorrere all'individuazione di almeno un estratto arricchito/biomolecola attiva con una attività antiossidante espressa in laboratorio come equivalenti di trolox con valore non inferiore a 0.5 mmol trolox/g di matrice estratta utile all'ingredientistica alimentare e nutraceutica. In questo senso, l'estratto idroalcolico UAE di vinaccioli corrisponde al risultato previsto dall'indicatore come emerso dalle azioni precedenti.

Questa attività si svilupperà rispetto all'esecuzione della seguente prova:

• **Prova 3.3.3.1. Saggi shelf-life rispetto alla capacità biostatica e biocida**

MATERIALI E METODI

Dal momento che le Attività 3.3.3. dovevano necessariamente passare attraverso l'individuazione delle matrici più promettenti dal punto di vista dell'attività antiossidante e delle migliori metodiche estrattive per gruppi di molecole che potessero avere utili implicazioni come ingredienti e additivi alimentari, si sono voluti studiare diversi solventi in merito alle loro capacità di estrazione da vinacce rosse. Queste informazioni sono state ottenute misurando parametri importanti come la quantità totale di polifenoli, la frazione di flavonoidi, la capacità antiossidante attraverso differenti metodologie.

Le misure di capacità antiossidante prese in considerazione riguardano diversi radicali sintetici, come ABTS e DPPH, e il metodo PCL (photochemiluminescence) basato sul radicale superossido. Su questi radicali viene testata l'azione di *scavenging* da parte degli antiossidanti estratti da vinacce rosse. Il parametro $IC_{50,ABTS}$ sta ad indicare la concentrazione di estratto in grado di inibire il 50% del radicale ABTS: maggiore è il potere (capacità) antiossidante, minore sarà IC_{50} poiché è sufficiente un piccolo quantitativo di estratto per inibire i radicali liberi. Tutte le determinazioni di capacità antiossidante utilizzano Trolox come antiossidante standard di riferimento.

I solventi presi in esame sono: acqua pura, etanolo ed acetone in miscela con l'acqua, acetato di etile. Le due miscele H₂O/etanolo e H₂O/acetone sono entrambe in rapporto 20/80: è già noto da letteratura come il 20% di acqua sia in grado di migliorare le proprietà estrattive di un solvente alcolico.

DPPH, metodo spettrofotometrico – ABTS metodo spettrofotometrico: Valutazioni semi-quantitative e bio-autografiche di attività antiossidante (DPPH; ABTS assays) utilizzando strategie di cromatografia planare ad alta risoluzione (HP-TLC bio-autografica). Le misure di capacità antiossidante prese in considerazione riguardano diversi radicali sintetici, come ABTS e DPPH, e il metodo PCL (photochemiluminescence) basato sul radicale superossido. Su questi radicali viene testata l'azione di *scavenging* da parte degli antiossidanti estratti da vinacce rosse. Il parametro $IC_{50,ABTS}$ sta ad indicare la concentrazione di estratto in grado di inibire il 50% del radicale ABTS: maggiore è il potere (capacità) antiossidante, minore sarà IC_{50} poiché è sufficiente un piccolo quantitativo di estratto per inibire i radicali liberi. Tutte le determinazioni di capacità antiossidante utilizzano Trolox come antiossidante standard di riferimento. Ogni prova è stata effettuata su 3 repliche.

Fotochemiluminescenza (PCL): Il sistema PCL è stato progettato per la determinazione della capacità antiossidante totale di sostanze solubili in acqua (protocollo ACW) e in matrici lipidiche (protocollo ACL). Tuttavia i due metodi sono completamente interscambiabili e la loro applicazione dipende molto da eventuali effetti matrice e deve essere valutato di volta in volta quale protocollo meglio si adatta ad una certa matrice reale, indipendentemente dalla sua idrofilicità o idrofobicità complessiva. E' un metodo che sfrutta la fotochemiluminescenza ed è basato sull'ossidazione fotoindotta del luminol dovuta all'interazione con l'anione superossido (O₂⁻) generato per via fotochimica nel sistema di misurazione per mezzo di un reagente, accompagnata da un'intensa chemiluminescenza. In presenza di sostanze che agiscono come radical scavenger, l'intensità della chemiluminescenza è attenuata in funzione della loro concentrazione. In questo modo, le proprietà antiradicaliche della sostanza analizzata possono essere realmente quantificate. I risultati sono espressi come unità equivalenti di acido ascorbico per sostanze idrosolubili o unità equivalenti di Trolox per sostanze liposolubili. Ogni singola misura richiede da 1 a 3 minuti. Il segnale rilevato aumenta immediatamente dopo l'inizio della misura fino ad raggiungere un plateau dopo del tempo. La curva che si ottiene ha le caratteristiche di una curva di saturazione con differenti altezze al livello del plateau. La capacità antiossidante per un campione si manifesta in una caratteristica inibizione (riduzione dell'integrale) relativa al bianco.

Caratteristiche dello strumento risultano quindi essere:

- Alta sensibilità: concentrazioni nanomolari
- Tempi di analisi molto brevi: ≤ 3 minuti
- Buona riproducibilità: CV < 2%

Gli estratti analizzati nella ricerca hanno condotto ad una risposta positiva in modalità ACL. La prova comporta l'utilizzo di quattro reagenti:

- Reagente 1: ACL-Diluent (solvente e fluido di diluizione) pronto per l'uso
- Reagente 2: Tampone di reazione, pronto per l'uso
- Reagente 3: Soluzione di PS-2 (fotosensibilizzatore)
- Reagente 4: Standard di calibrazione per la quantificazione di antiossidanti insolubili in acqua come equivalenti di TROLOX

La procedura sperimentale comporta inizialmente la misura di due bianchi. La deviazione non deve superare il 5%. Successivamente si procede con la calibrazione, utilizzando standard di Trolox a 0,5 1,0 2,0 e 2,5 nmol (corrispondenti a 5-25µl del reagente 4). Alla calibrazione segue la misura del campione che deve essere solubile in metanolo. Sono state effettuate varie diluizioni ai campioni trattati per poter rientrare nel range di linearità della curva di calibrazione e all'interno del range di rilevazione del PHOTOCHEM.

Per garantire l'affidabilità del risultato è necessario che le curve dei campioni siano comprese tra quelle di calibrazione, nel caso contrario occorre variare la diluizione. In un primo passaggio si determina l'integrale sotto la curva, che permette a sua volta di misurare la capacità antiossidante, la quale viene espressa in nmol di Trolox equivalenti. Viene misurata la differenza tra l'area sottesa dalla curva del bianco ($\int B$) e l'area sotto la curva del campione ($\int S$):

$$\int B - \int S \quad (1)$$

Il valore di inibizione è il rapporto tra l'Eq. 1 e l'integrale del bianco:

$$I = \frac{\int B - \int S}{\int B}$$

Per garantire una maggior affidabilità dei risultati ogni campione è stato analizzato in doppio. Viene poi calcolata la media delle due misurazioni.

Determinazione della shelf life: Colture di *Penicillium verrucosum* (ATCC), *P. comune* (ATCC), *P. digitatum* (ATCC) sono state allestite secondo quanto riportato per le colture fungine utilizzate nello svolgimento dell'azione 3.2.1, prova 3.2.1.1. La shelf life è stata determinata in funzione della capacità antiproliferativa dell'estratto di vinaccioli verso funghi contaminanti alimentari.

RISULTATI

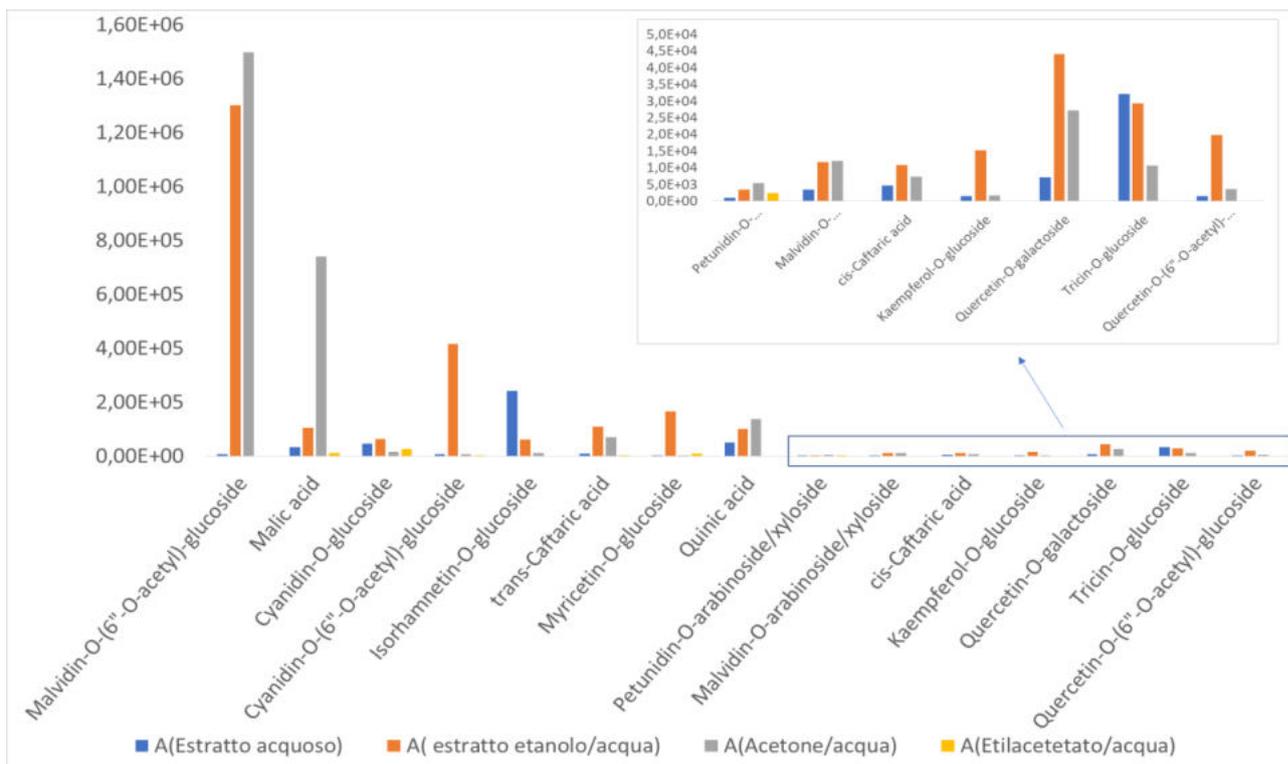
In tabella 1 sono riportati i valori di polifenoli totali (TPC) e flavonoidi totali (TFC) come µg equivalenti di catechina per mg di estratto secco (estratto liofilizzato di vinaccioli), equivalenti a mmol trolox/g. La tabella 1 riporta anche i poteri antiossidanti degli estratti: sebbene forniscano risultati leggermente diversi in termini assoluti, come spesso emerge da analoghi report di letteratura, gli andamenti rispetto ai diversi solventi sono i medesimi e individuano il solvente H₂O/Acetone come quello in grado di fornire il maggior potere antiossidante, di seguito H₂O/Etanol ed Etilacetato forniscono risultati simili con ABTS e IC₅₀,

mentre con DPPH sono H₂O ed Etilacetato a dare i risultati più simili. Con PCL H₂O/Etanolo e H₂O/Acetone danno lo stesso risultato. In generale H₂O è il solvente che fornisce l'estratto a minor capacità antiossidante.

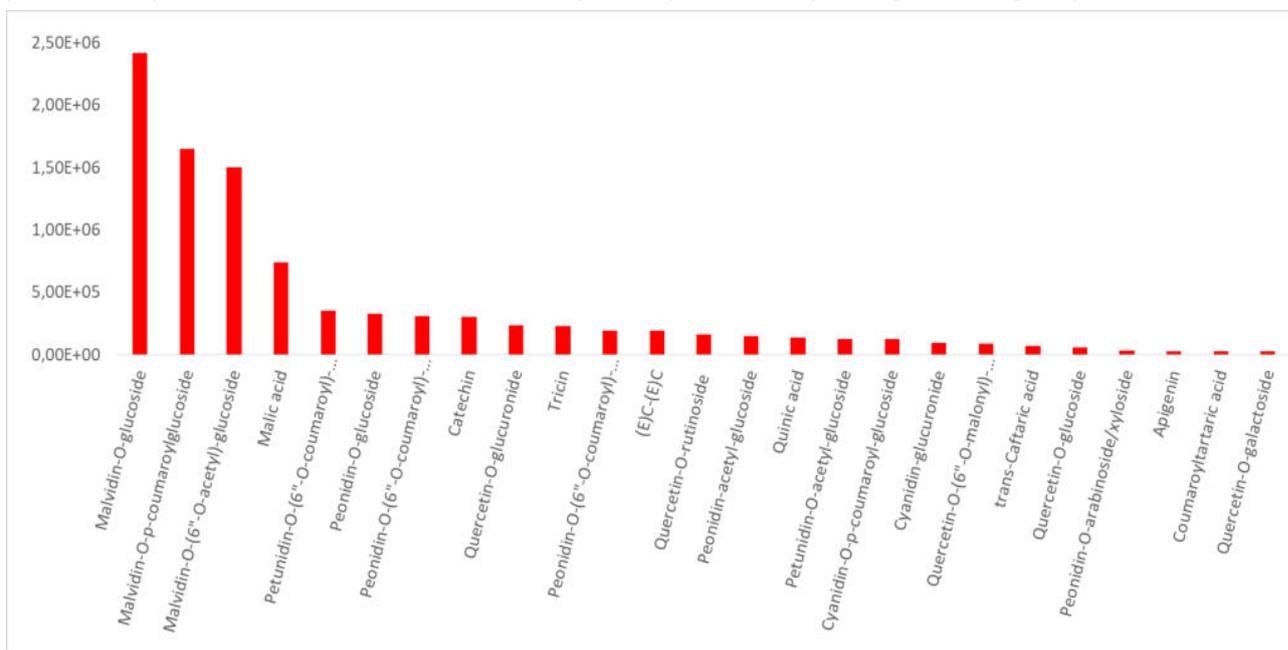
SOLVENTE	TPC	TFC	ABTS	DPPH	PCL	IC _{50,ABTS}
	μg _{eq} /mg _{DE}	μg _{eq} /mg _{DE}	μmol _{eq} /mg _{DE}	μmol _{eq} /mg _{DE}	μmol _{eq} /mg _{DE}	μg _{eq} /mL
H₂O	86,4 ± 0,5	45,3 ± 0,9	0,361 ± 0,004	0,397 ± 0,006	0,150 ± 0,003	583 ± 3
H₂O/Etanolo	156 ± 2	45,9 ± 1,7	0,410 ± 0,006	0,543 ± 0,004	0,600 ± 0,010	332 ± 3
H₂O/Acetone	275 ± 20	192 ± 25	0,580 ± 0,002	0,842 ± 0,006	0,600 ± 0,010	68 ± 1
Etilacetato	134,6 ± 2,1	66,8 ± 2,8	0,391 ± 0,006	0,305 ± 0,001	0,198 ± 0,009	348 ± 3

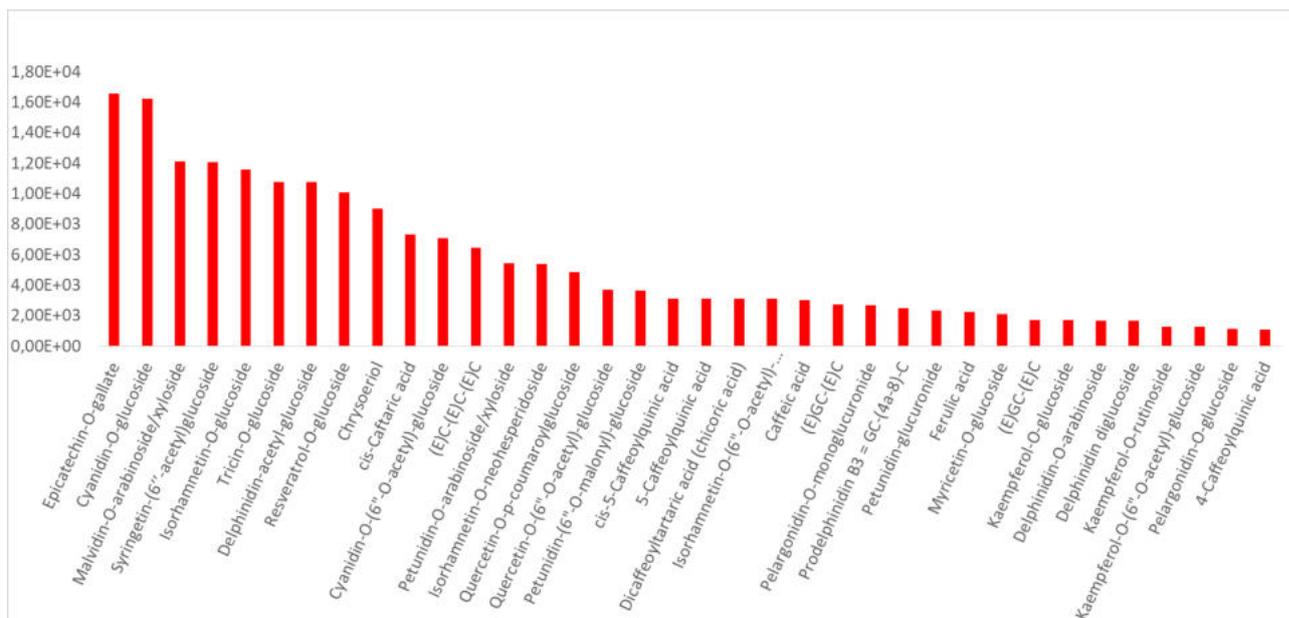
Tabella 1. Polifenoli totali (TPC) e flavonoidi totali (TFC) come μg equivalenti di catechina per mg di estratto secco (estratto liofilizzato) – equivalenti a mmol trolox/g - e le attività antiossidanti rispetto ai saggi ABTS, DPPH, PCL (fotochemioluminescenza). IC_{50,ABTS} sta ad indicare la concentrazione di estratto in grado di inibire il 50% del radicale ABTS: maggiore è il potere (capacità) antiossidante, minore sarà IC₅₀

Gli estratti esaminati caratterizzati da una miscela di solventi acqua-etanolo ed acqua acetone (50%) hanno dimostrato una capacità antiossidante in linea con gli indicatori di risultato per la parte alimentare del progetto. Entrambe le tipologie di estratti con test ABTS e DPPH hanno evidenziato capacità antiossidante comparabile sebbene l'estratto acetone fosse sensibilmente superiore. Il test della fotochemioluminescenza (PCL), tuttavia, mostra una capacità antiossidante identica e coerente con l'indicatore atteso. Il fatto che il contenuto in polifenoli totali sia più elevato nell'estratto acetone evidenzia il fatto che nell'estratto idroalcolico vi siano anche altre molecole che concorrono all'attività antiossidante non estratte con la miscela acqua-acetone, dal momento che entrambi hanno poi attività antiossidante comparabile (DPPH, ABTS test) o identica (PCL). Va però sottolineato che per la maggiore biocompatibilità di un prodotto ottenuto con solvente idroalcolico piuttosto che con solvente idroacetone, l'estratto con etanolo-acqua al 50% risulta oltremodo più adeguato ad un impiego in un contesto alimentare. I risultati ottenuti, pur con approcci differenti, sono in linea con i risultati emersi dalle prove precedenti (*Valutazioni in vitro mediante differenti saggi con valenza complementare alla determinazione complessiva della capacità antiossidante*).



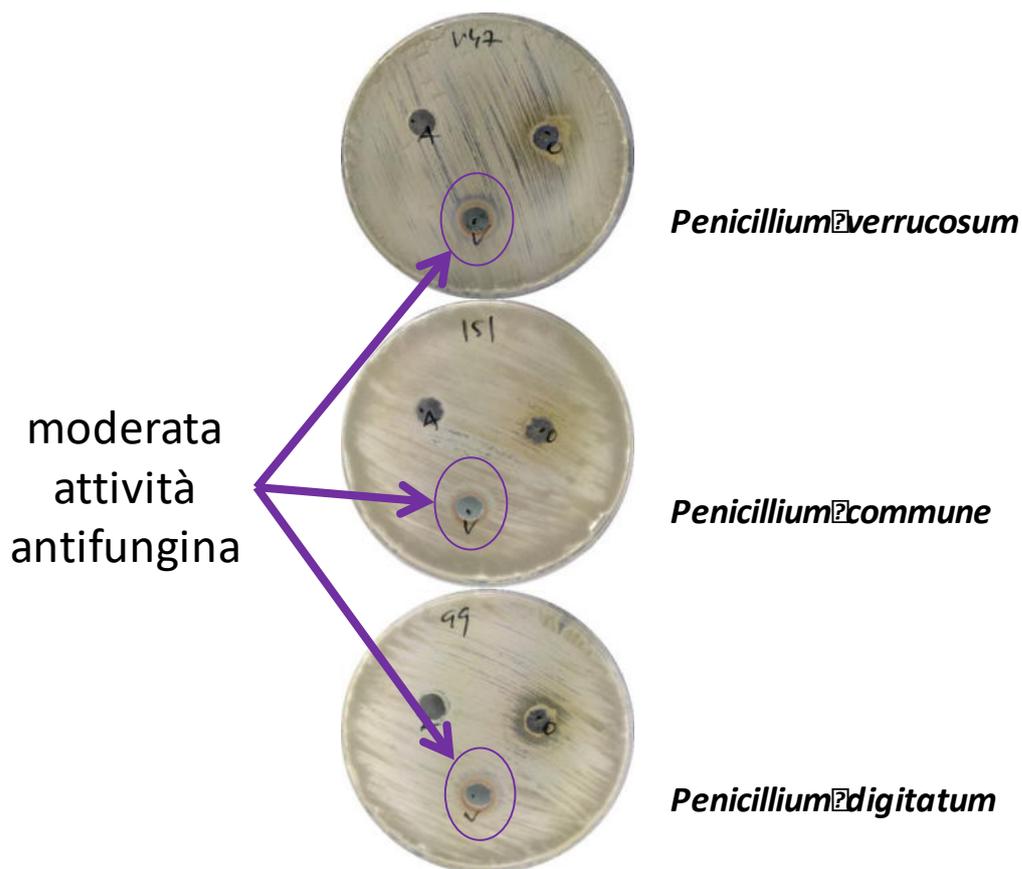
Questo grafico mostra i più comuni polifenoli identificati nei diversi estratti. Si nota come sia il solvente idroalcolico o quello acqua/acetone a fornire i migliori risultati quantitativi per questi composti comuni. Tuttavia, analizzando gli estratti in dettaglio si possono individuare numerosi composti polifenolici presenti in quantità considerevoli così come in piccoli quantitativi (vedi figure di seguito).





Si è quindi pensato, alla luce dei risultati, che l'estratto acquoso potesse essere di interesse per l'applicazione delle molecole estratte all'ingredientistica alimentare. In particolare, un aspetto interessante di questo è costituito dalla possibilità che molecole polifenoliche possano incrementare la conservabilità di prodotti alimentari (la cosiddetta shelf-life) grazie ad esempio a loro proprietà antiproliferative su comuni funghi alimentari.

Si sono quindi fatti test di antiproliferazione di funghi del genere *Penicillium* evidenziando una modesta ma significativa attività antifungina in riferimento all'indicatore di risultato per il comparto alimentare ("almeno un estratto arricchito/biomolecola attiva con una attività antiossidante espressa in laboratorio come equivalenti di trolox con valore non inferiore a 0.5 mmol trolox/g di matrice estratta utile all'ingredientistica alimentare e nutraceutica").



CONCLUSIONI

Si sono ottenuti risultati interessanti in termini di estrazione selettiva di classi di polifenoli a diversa capacità antiossidante. Una miscela acqua/etanolo ha la stessa capacità estrattiva di acqua pura verso flavonoidi, con la differenza che, mentre questi sono circa il 52% dei polifenoli totali estratti solo con acqua, essi rappresentano una frazione significativamente più piccola (circa 29%) dei polifenoli totali quando si utilizza la miscela acqua/etanolo. Tuttavia, sebbene la quantità assoluta estratta è simile, la capacità antiossidante è notevolmente maggiore per l'estratto idroalcolico, come supportato anche dai numerosi dati di letteratura. Quando si considera un altro solvente (etilacetato), si ottiene lo stesso rapporto tra flavonoli e polifenoli totali (ca 50%), sebbene con un ridotto incremento in termini assoluti, mentre il potere antiossidante aumenta sensibilmente. Infine, quando la miscela estraente viene sostituita con acqua/acetone, si osserva un aumento assoluto sia di polifenoli totali che di flavonoidi, questi inoltre arrivano ad essere circa il 70% dei polifenoli totali, e la capacità antiossidante subisce un incremento notevole.

In conclusione, gli estratti di vinaccioli con miscela di solventi acqua-etanolo ed acqua acetone (50%) hanno dimostrato una capacità antiossidante in linea con gli indicatori di risultato per la parte alimentare del progetto. Entrambe le tipologie di estratti con test ABTS e DPPH hanno evidenziato capacità antiossidante comparabile sebbene l'estratto acetone fosse sensibilmente superiore. Il test della fotochemiluminescenza (PCL), tuttavia, mostra una capacità antiossidante identica e coerente con l'indicatore atteso. Il fatto che il contenuto in polifenoli totali sia più elevato nell'estratto acetone evidenzia il fatto che nell'estratto idroalcolico vi siano anche altre molecole che concorrono all'attività antiossidante non estratte con la miscela acqua-acetone, dal momento che entrambi hanno poi attività antiossidante comparabile (DPPH, ABTS test) o identica (PCL). Va però sottolineato che per la maggiore biocompatibilità di un prodotto ottenuto con solvente idroalcolico piuttosto che con solvente idroacetone, l'estratto con etanolo-acqua al 50% risulta oltremodo più adeguato ad un impiego in un contesto alimentare.

In conclusione, l'estratto idroalcolico (EtOH 50%) di vinaccioli soddisfa l'indicatore di risultato atteso per questa sotto-azione.

ATTIVITÀ 3.3.4. ATTIVITÀ IN LABORATORIO PER LA VALUTAZIONE DI BIOACCESSIBILITÀ E BIODISPONIBILITÀ DI COMPONENTI FUNZIONALI BIOATTIVI.

Tale attività ha come obiettivo specifico la determinazione della quantità di fitocomposti accessibili e disponibili all'assorbimento intestinale e in grado di esplicare attività antiproliferativa.

Prova 3.3.4.1. Simulazione in laboratorio del processo digestivo

Nonostante questa prova era prevista prevalentemente durante il secondo e terzo anno di progetto, sono già state approntate le attività per essere sviluppate al termine del primo anno, in sensibile anticipo sui tempi. Le attività relative a questa prova sono dunque da considerarsi attualmente in svolgimento. Di seguito vengono pertanto presentati i Materiali e Metodi ottimizzati sugli estratti sin qui ottenuti:

La bioaccessibilità di fitocomposti bioattivi (frazione di molecole attive liberate dalla matrice alimentare e assorbibile dalla parete intestinale) viene valutata attraverso la simulazione *in vitro* del processo digestivo permettendo di determinare, attraverso quantificazioni strumentali con tecnica HPLC-MS, la frazione di composti liberati durante le principali fasi digestive:

- i) fase salivare
- ii) fase gastrica
- iii) fase duodenale
- iv) fase colonica (azione fermentativa ~~ad opera della microflora batterica~~).

Questa prova è stata approntata per poter svolgere una replica per ogni prodotto.

MATERIALI E METODI

Soluzioni elettrolitiche di partenza per la preparazione dei fluidi gastro-intestinali simulate: KCl 89.6 g/L; KSCN 20g/L; NaH₂PO₄ 88.8 g/L; NaHCO₃ 84.7 g/L; NaCl 175.3 g/L; Na₂SO₄ 57 g/L; CO(NH₂)₂ 25 g/L.

Le tipologie di fluidi simulati sono:

- Fluido salivare (SSF) - 10 mL di KCl; 10 mL di KSCN; 10 mL di NaH₂PO₄; 10 mL di Na₂SO₄; 1.7 mL di NaCl; 20 mL di NaHCO₃; 8 mL di CO(NH₂)₂; 290 mg di α -amilasi.
- Fluido gastrico (SGF) - 25 mL di HCl 0.1 N; 5 g di pepsina.
- Fluido intestinale (SIF) - 200 mL di acqua; 25 mL of pancreatina (8 mg/mL); 25 mL di sali biliari (50 mg/mL);

Il pH viene modificato con NaHCO₃ 0.5 N ad un valore di 6.8.

Tutte le soluzioni di enzimi sono preparate fresche il giorno prima dell'uso e pre-incubate a 37 C prima dell'uso, e conservate a 4 C fino a 3 giorni.

L'attività enzimatica viene controllata tramite assay di riferimento riportati in letteratura:

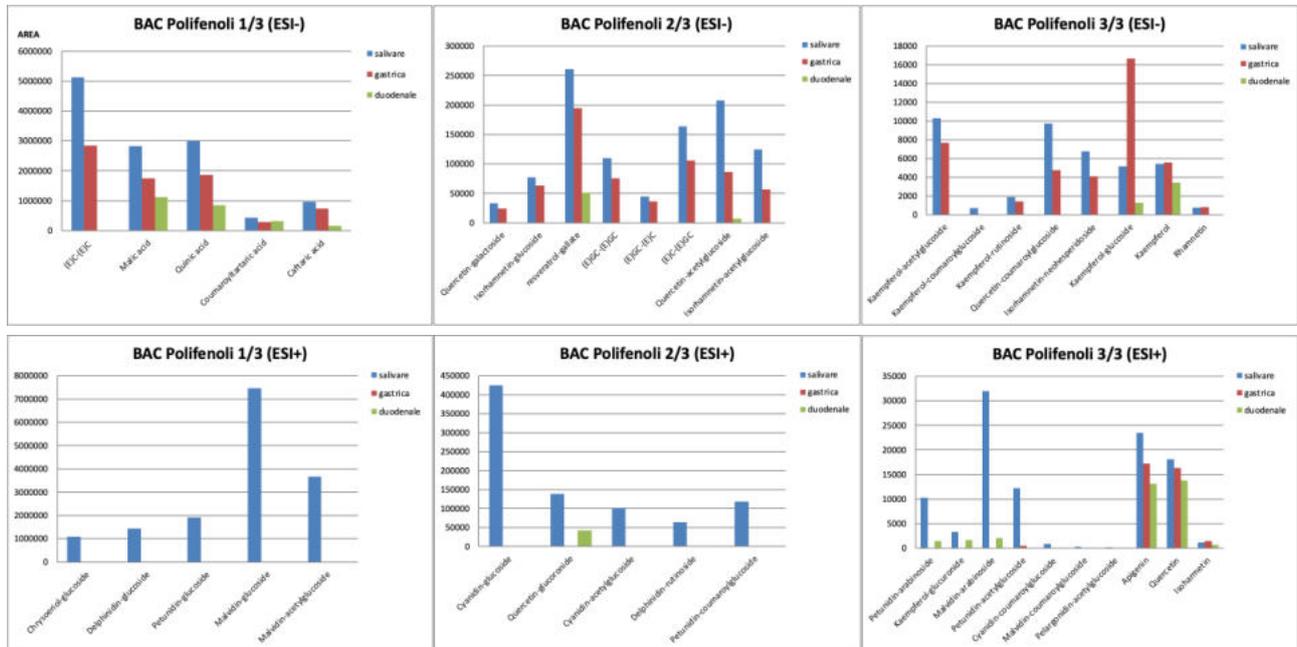
L'assay per l' α -amilasi è basato sul metodo della *stop reaction* monitorata per via spettrofotometrica utilizzando l'amido di patata come substrato. L'attività della pepsina viene valutata con lo stesso metodo utilizzando emoglobina come substrato; l'attività della pancreatina viene stimata sia per la componente di tripsina, sia per quella di chimotripsina tramite metodo spettrofotometrico utilizzando p-toluene-sulfonil-L-arginina metil estere and N-benzoil-L-tirosina ethyl estere come substrati, rispettivamente.

La valutazione della fermentazione ad opera del microbiota intestinale (fase colonica) è stata svolta monitorando parametri indiretti anziché misura della popolazione batterica. Tali parametri sono prodotti della fermentazione dei carboidrati e della proteolisi, come ad esempio acidi grassi a catena corta (acido propionico e acido butirrico), acido acetico, acido lattico e ammonio e sono considerati essere indice di benessere della popolazione microbica intestinale.

RISULTATI

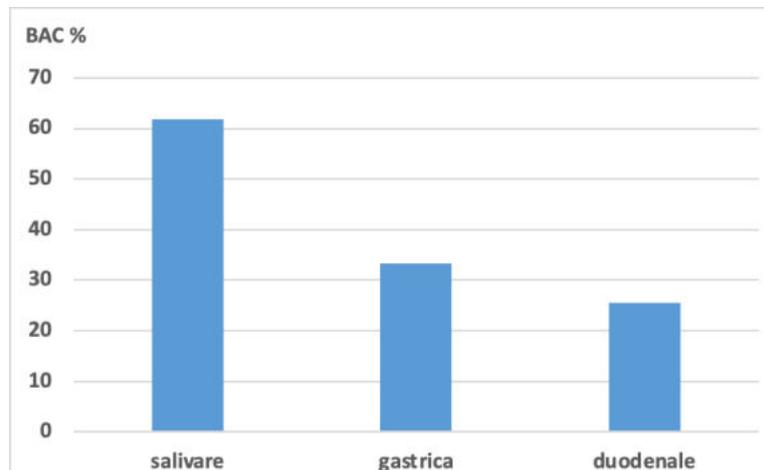
L'ottimizzazione delle metodiche da attuare in relazione ai differenti estratti ottenuti rappresenta già di per sé un primo e sostanziale output della prova. In relazione a questo si prevede di iniziare l'acquisizione dei risultati già a partire dei primi mesi del secondo anno di progetto.

Sono state condotte prove di bioaccessibilità dei composti polifenolici da vinacce rosse, prendendo in considerazione circa 40 composti, metà dei quali identificati tramite LC-MS/MS con ionizzazione ESI positiva (ESI+) e l'altra metà con ionizzazione ESI negativa (ESI-).



Si è osservato per la quasi totalità dei polifenoli che questi vengono rilasciati maggiormente già nella prima fase salivare, molto probabilmente dovuto al fatto che le matrici sono state liofilizzate, ed è noto da letteratura come la liofilizzazione sia capace di incrementare l'idrofilità della matrice. Per la maggior parte dei composti analizzati in ESI+ questi vengono solo rilasciati durante la fase salivare con possibile loro completa degradazione a partire dalla fase gastrica. Per alcuni derivati glucuronidici e arabinosidici della quercetina, kaempferolo, petunidina e malvidina, avviene un modesto rilascio durante la fase duodenale. Il comportamento più interessante è quello degli agliconi (kaempferolo, apigenina, quercetina e isoramnetina) che vengono rilasciati in tutte e tre le fasi senza subire una importante degradazione.

Si è voluto sperimentalmente capire se oltre ai composti identificati, ve ne potessero essere altri rilasciati nelle diverse fasi che potessero presentare bioaccessibilità differenti da quelle osservate. Quindi si è pensato di misurare la capacità antiossidante durante le fasi digestive. Si è osservato che l'andamento ricorda solo in parte quello dei polifenoli sopra riportati e che la fase gastrica e quella duodenale rilasciano e conservano circa il 33% e il 25%, rispettivamente, del potere antiossidante dei composti contenuti nelle vinacce.



Il quantitativo residuo di composti ad attività antiossidante è quindi importante e consente di affermare che all'ultimo tratto dell'intestino (colon) arrivano quantitativi interessanti di molecole in grado di esercitare un'azione antiossidante locale, molto importante per la prevenzione di malattie cronico-degenerative a carico del colon.

Per quanto riguarda la categoria degli acidi benzoici, questi, ma in particolare l'acido gallico, hanno mostrato un incremento nella fase colonica dopo 32 ore dall'inizio del processo digestivo, che significa dopo circa 28 ore di fermentazione colonica. Questi acidi vengono poi rapidamente metabolizzati e spariscono quasi completamente dopo circa 48 ore di fermentazione colonica. Per quanto riguarda la classe degli acidi propionici (tipici del catabolismo della matrice vegetale durante questa fase), questi raggiungono livelli stabili dopo 24 ore di fermentazione colonica e rimangono invariati fino a 48 ore: in particolare la concentrazione maggiore è quella dell'acido fenilpropionico, ma sono presenti livelli apprezzabili anche di derivati idrossilati (mono- e diidrossi-fenilpropionico). Lo stesso tipo di comportamento è stato evidenziato per l'acido fenilacetico e derivati idrossilati.

CONCLUSIONI

Le prove di bioaccessibilità hanno mostrato che le comuni molecole polifenoliche, oggetto anche di altre prove, sono altamente bioaccessibili partendo da matrici liofilizzate come vinaccioli, tuttavia questi composti vengono altrettanto rapidamente degradati durante le fasi digestive gastrica e duodenale.

L'osservazione della capacità antiossidante dei fluidi simulati durante queste fasi mostra che l'ultima fase, quella duodenale conserva circa un quarto del potere antiossidante della matrice di partenza, anche se non sappiamo con precisione a quali molecole questo possa essere imputato.

L'impiego alimentare (integratore o ingredientistico) dei vinaccioli ha dimostrato come la frazione di fibre non digeribili, a cui sono covalentemente legati anche numerosi composti polifenolici, è in grado di produrre un significativo metabolismo a livello intestinale con modulazione del biota presente nel colon. Si può prevedere che una alimentazione continua, piuttosto che a somministrazione singola, sia in grado di produrre risultati migliori di quelli osservati.

• Prova 3.3.4.2. Biodisponibilità di fitocomposti bioattivi, prove in laboratorio

La biodisponibilità di componenti bioattive negli estratti di vinacce rosse viene valutata attraverso lo studio dell'attività antiossidante di composti funzionali su cellule Caco-2, una linea cellulare di carcinoma colon-intestinale. Questa linea cellulare è da tempo utilizzata e riconosciuta come riferimento per la costruzione di modelli in vitro della barriera intestinale umana e in grado di mimare l'epitelio intestinale e il modo in cui questo assorbe farmaci o prodotti della digestione. La linea cellulare Caco-2 possiede le stesse proprietà biologiche e strutturali dei microvilli della parete intestinale a seguito della loro crescita. Inoltre durante tale fase le cellule Caco-2 subiscono confluenza, proliferazione e differenziamento, e quest'ultimo avviene in modo spontaneo mostrando, al termine del processo, le caratteristiche di enterociti maturi.

MATERIALI E METODI

Le cellule Caco-2 vengono fatte crescere come un monostrato su un filtro a membrana che separa due camere: quella apicale che contiene l'estratto da testare contenente i composti in grado di essere assorbiti, e la camera ricevente che simula la parte basolaterale degli enterociti dove si andrà a verificare l'avvenuto passaggio delle molecole. Durante l'assorbimento i composti antiossidanti interagiscono con le cellule Caco-2 e possono esercitare attività antiossidante in diversi modi: eliminazione di radicali liberi o di specie reattive (come perossidi) in grado di generare radicali liberi nelle cellule; riduzione del danno ossidativo attraverso l'induzione delle cellule al rilascio di enzimi antiossidanti; regolazione positiva dell'espressione di mRNA per enzimi come ossigenasi, ossidoriduttasi in grado di proteggere le cellule.

RISULTATI

L'attività antiossidante viene espressa con l'aumento dei livelli intracellulari di glutatione e glutatione perossidasi, la riduzione dello stress ossidativo grazie alla modulazione dell'enzima superossido dismutasi

e alla riduzione di marker tipici della perossidazione come ad esempio la malondialdeide (MDA). Si osserva anche che in condizioni non citotossiche la presenza di antiossidanti produce arresto del ciclo cellulare o apoptosi cellulare

CONCLUSIONI

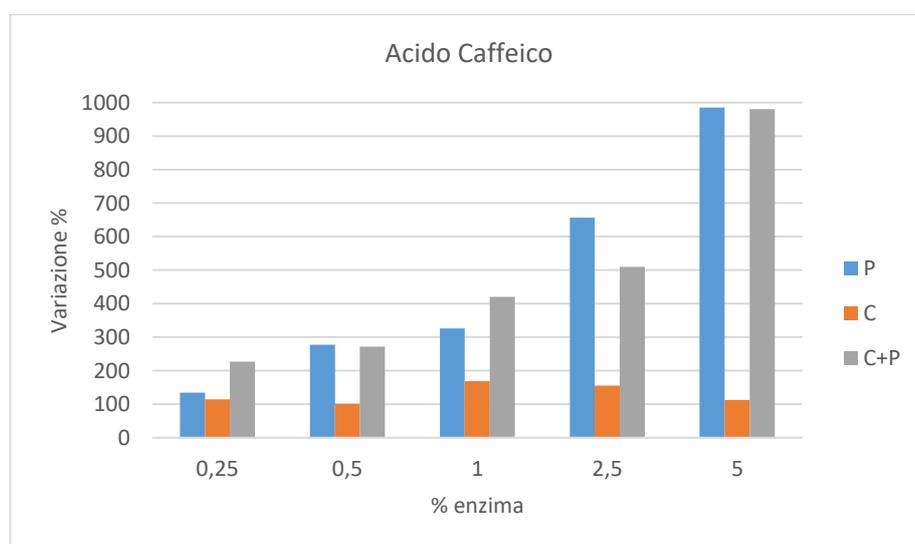
Nell'attività antiossidante osservata e nei suoi effetti biologici giocano un ruolo predominante metaboliti a peso molecolare non elevato generati dalla digestione o dall'assorbimento epiteliale e derivanti dai polifenoli presenti nell'estratto di vinacce: si tratta di acidi fenolici già presenti nell'estratto o di derivati metabolici di molecole più complesse (esteri degli acidi fenolici ad esempio). Importante resta comunque l'effetto antiossidante locale, con riduzione dello stress ossidativo sulla membrana epiteliale intestinale, con positive ripercussioni sull'abbassamento del rischio di sviluppo di patologie cronic-degenerative intestinali e sul benessere di tutto l'apparato intestinale e del microbiota in esso presente.

• Prova 3.3.4.3. Valutazione di sistemi di incapsulamento

La progettazione di sistemi di incapsulamento o di formulazione per usi cosmetici o alimentari in grado di includere molecole antiossidanti ha lo scopo di veicolare al meglio queste molecole oppure che queste siano maggiormente stabili, così da poter assolvere anche a funzioni di conservazione del prodotto o di altri principi attivi. Le prove svolte hanno preso in considerazione idrogel con formulazioni diverse (volte a migliorare l'interazione con gli strati di epidermide) poiché tecnicamente sono maggiormente in grado di incrementare la migrazione (flusso) delle sostanze rispetto ad una semplice soluzione acquosa, o altro processo di incapsulamento. L'acido caffeico è stato preso come molecola test di riferimento in continuità con il fatto che l'acido caffeico è stato utilizzato come riferimento per altre prove data la struttura polifenolica coerente con evidenze che possano essere di indirizzo per altri composti analoghi come quelli individuati.

Le molecole estratte dalle vinacce potrebbero sia avere una bioattività locale rilevante grazie al loro potere antiossidante, sia essere importanti conservanti per altri principi attivi. La prova ha preso in considerazione proprio acido caffeico dal momento che questo composto era già stato oggetto di altre prove (trattamento enzimatico dei vinaccioli): nel corso del primo e del secondo anno si è osservato che trattando enzimaticamente le vinacce rosse con entrambi gli enzimi cellulasi e pectinasi si assisteva alla degradazione di esteri dell'acido caffeico, con conseguente aumento in soluzione dell'acido caffeico (barre grigie). Questo effetto è apparso confrontabile con quello ottenuto con il solo enzima pectinasi, lasciando intendere che la degradazione fosse effettivamente conseguenza di enzimi ausiliari (esterasi) presenti insieme all'enzima principale.

Già quantitativi intermedi di enzima pari all'1% in peso sono stati capaci di incrementare la concentrazione di acido caffeico di oltre il 300%.



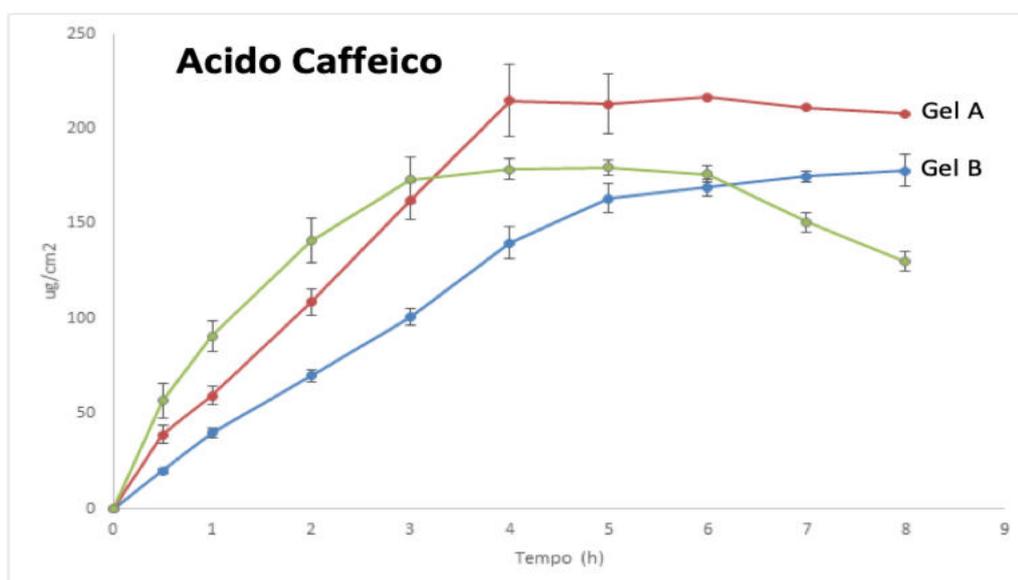
Si sono volute eseguire prove di stabilità dell'acido caffeico all'interno di strutture macromolecolari per usi alimentari e cosmetici, come ad esempio gel a base acquosa (idrogel).

MATERIALI E METODI

La prova consente di verificare se la struttura dell'idrogel sia in grado di migliorare la veicolazione di molecole bioattive ottenute dal trattamento delle matrici di vinacce rosse, oppure di migliorare la stabilità delle stesse rendendole conservanti ottimali per altri principi attivi.

RISULTATI

Gli studi hanno mostrato che la stabilità di acido caffeico in due diverse formulazioni di idrogel non era però sufficiente e non significativamente diversa dalla stessa molecola in acqua. Nonostante ciò, si è osservato che come principio attivo, la diffusione di acido caffeico attraverso una membrana che simula i vari strati della pelle/tessuti/mucose viene migliorata dall'incorporamento della molecola negli idrogel rispetto alla sua diffusione da semplice acqua.



CONCLUSIONI

La progettazione di sistemi di incapsulamento o di formulazione per usi cosmetici o alimentari in grado di includere molecole antiossidanti ha lo scopo di veicolare al meglio queste molecole oppure che queste siano maggiormente stabili, così da poter assolvere anche a funzioni di conservazione del prodotto o di altri principi attivi.

Le prove svolte hanno evidenziato che idrogel con formulazioni diverse (volte a migliorare l'interazione con gli strati di epidermide/tessuti/mucose) sono in grado di incrementare la migrazione (flusso) di acido caffeico dal gel attraverso la pelle epidermide/tessuti/mucose rispetto ad una semplice soluzione acquosa.

Tuttavia la formulazione di acido caffeico nel gel non ha mostrato un miglioramento in termini di stabilità del composto, che subisce rapida degradazione fino a circa 30 giorni a tutte le temperature e in modo analogo a quanto subisce in soluzione acquosa.

Conclusioni triennio

Risultati interessanti sono stati ottenuti in termini di estrazione selettiva di classi di polifenoli a diversa capacità antiossidante. Le attività antiossidanti sviluppate di concerto alla qualificazione e quantificazione

dei polifenoli hanno confermato con più approcci il raggiungimento del risultato previsto dall'indicatore per questa sotto-azione. In particolare, l'estratto idroalcolico al 50% di vinaccioli è risultato compatibile con l'impiego in ambito ingredientistico e nutraceutico per l'importante capacità antiossidante raffrontata con i comuni antiossidanti di sintesi (trolox). Una miscela acqua/etanolo ha la stessa capacità estrattiva di acqua pura verso flavonoidi. Tuttavia, sebbene la quantità assoluta estratta è simile, la capacità antiossidante è notevolmente maggiore per l'estratto idroalcolico, come supportato anche dai numerosi dati di letteratura.

Le prove di bioaccessibilità hanno mostrato che le comuni molecole polifenoliche, oggetto anche di altre prove, sono altamente bioaccessibili partendo da matrici liofilizzate come le vinacce rosse, tuttavia questi composti vengono altrettanto rapidamente degradati durante le fasi digestive gastrica e duodenale. L'osservazione della capacità antiossidante dei fluidi simulati durante queste fasi mostra che l'ultima fase, quella duodenale conserva circa un quarto del potere antiossidante della matrice di partenza, anche se non sappiamo con precisione a quali molecole questo possa essere imputato. L'impiego alimentare (integratore o ingredientistico) dei vinaccioli ha dimostrato come la frazione di fibre non digeribili, a cui sono covalentemente legati anche numerosi composti polifenolici, è in grado di produrre un significativo metabolismo a livello intestinale con modulazione del biota presente nel colon. Si può prevedere che una alimentazione continua, piuttosto che a somministrazione singola, sia in grado di produrre risultati migliori di quelli osservati.

Nell'attività antiossidante osservata e nei suoi effetti biologici giocano un ruolo predominante metaboliti a peso molecolare non elevato generati dalla digestione o dall'assorbimento epiteliale e derivanti dai polifenoli presenti nell'estratto di vinacce: si tratta di acidi fenolici già presenti nell'estratto o di derivati metabolici di molecole più complesse (esteri degli acidi fenolici ad esempio). Importante resta comunque l'effetto antiossidante locale, con riduzione dello stress ossidativo sulla membrana epiteliale intestinale, con positive ripercussioni sull'abbassamento del rischio di sviluppo di patologie cronico-degenerative intestinali e sul benessere di tutto l'apparato intestinale e del microbiota in esso presente.

La progettazione di sistemi di incapsulamento o di formulazione per usi cosmetici o alimentari in grado di includere molecole antiossidanti ha lo scopo di veicolare al meglio queste molecole oppure che queste siano maggiormente stabili, così da poter assolvere anche a funzioni di conservazione del prodotto o di altri principi attivi. Le prove svolte hanno evidenziato che idrogel con formulazioni diverse (volte a migliorare l'interazione con gli strati di epidermide/tessuti/mucose) sono in grado di incrementare la migrazione (flusso) di acido caffeico dal gel attraverso la pelle epidermide/tessuti/mucose rispetto ad una semplice soluzione acquosa. Tuttavia la formulazione di acido caffeico nel gel non ha mostrato un miglioramento in termini di stabilità del composto, che subisce rapida degradazione fino a circa 30 giorni a tutte le temperature e in modo analogo a quanto subisce in soluzione acquosa.

In conclusione, con l'estratto idroalcolico di vinaccioli al 50% si è pienamente raggiunto l'indicatore di risultato previsto per questa sotto-azione.

SOTTO-AZIONE 3.4 - VALORIZZAZIONE ENERGETICA

Uar: UNIFE (Le azioni e relative prove corrispondenti a questa sotto-azione verranno svolte presso i laboratori di UNIFE)

Le biomasse residue da processi di estrazione sono una fonte di energia attrattiva per una serie di ragioni di tipo ambientale, economico, politico e sociale. Ci sono diverse tecniche che possono essere usate per ricavare energia dalle biomasse residue. Tra queste, quella più comunemente utilizzata è un processo di tipo termo-chimico (gassificazione, pirolisi, etc.). Una linea di sfruttamento più recente si è focalizzata sulla conversione biochimica della biomassa a biocombustibili. Sottoprodotti di origine vegetale possono infatti essere convertiti a zuccheri semplici mediante idrolisi enzimatica o biologica e successivamente fermentati per generare una varietà di carburanti. Tutte le attività saranno finalizzate alla messa a punto di un protocollo per la caratterizzazione completa e mirata dei residui di estrazione per la loro ottimale valorizzazione energetica (vedi indicatore per il comparto energetico).

Sotto-azione	
3.4. Valorizzazione energetica	
Attività	Prova
3.4.1. Valutazione delle proprietà delle biomasse residue dalle estrazioni operate nella sottoazione 3.1	3.4.1.1. Proximate analysis

3.4.2. Valutazione del possibile impiego delle biomasse residue per biocarburanti	3.4.2.1. Resistenza della biomassa alla degradazione biologica
--	---

Obiettivo specifico della sotto-azione è valutare le potenzialità energetiche delle biomasse di scarto, e mettere a punto di un protocollo da adottare a livello aziendale per la caratterizzazione completa e mirata dei residui di estrazione per la loro valorizzazione energetica.

Le biomasse residue da processi di estrazione sono una fonte di energia attrattiva per una serie di ragioni di tipo ambientale, economico, politico e sociale e contribuiscono in modo sostanziale alla circolarità dei processi produttivi.

▪ **ATTIVITÀ 3.4.1. VALUTAZIONE DELLE PROPRIETÀ DELLE BIOMASSE RESIDUE DALLE ESTRAZIONI OPERATE NELLA SOTTOAZIONE 3.1**

Per ottimizzare un possibile processo di combustione delle biomasse residue prodotte dall'attività del progetto si svolgerà uno studio completo delle proprietà delle biomasse residue dalle estrazioni operate nella sottoazione 3.1. Essenzialmente si tratta di effettuare la cosiddetta 'proximate analysis' che consiste nella determinazione del contenuto di umidità, ceneri, analisi elementale (carbonio, idrogeno, zolfo, azoto e ossigeno).

L'indicatore di risultato atteso per questa sotto azione è quello di mettere a punto un protocollo da adottare a livello aziendale per la caratterizzazione completa e mirata dei residui di estrazione per la loro valorizzazione energetica.

Queste attività si sono svolte prevalentemente durante il secondo e terzo anno attraverso lo svolgimento della seguente prova:

• ***Prova 3.4.1.1 Proximate analysis***

Tra i processi termochimici per lo sfruttamento energetico delle biomasse, la combustione diretta rappresenta quello più sfruttato. Per progettare un efficiente sistema di combustione è importante conoscere le principali caratteristiche della biomassa, tra cui il potere calorifico (CV) e il contenuto di umidità. Il potere calorifico totale (Gross Calorific Value - GCV) rappresenta l'entalpia totale del processo di combustione che tiene conto anche dell'entalpia di condensazione dell'acqua formata durante la combustione.

Il GCV espresso in joule per unità di massa delle vinacce dopo estrazione enzimatica è stato determinato attraverso un approccio di proximate analysis basato su equazioni empiriche che sfruttano come valori determinati sperimentalmente le percentuali di solidi totali (TS), di solidi volatili (VS), di solidi fissi (FS) e di ceneri (ash), determinati come di seguito descritto.

MATERIALI E METODI

La matrice derivante dall'estrazione enzimatica delle vinacce, asciugata all'aria è stata finemente macinata in un mulino a sfere (Retsch PM 10), poi setacciata, e campionata secondo il metodo della quartatura.

La percentuale di solidi totali (TS) è stata determinata secondo il metodo standard ASTM E1756-08. Un campione di 2 g è stato pesato su un crogiolo di vetro pyrex preventivamente seccato a 105 °C. Il crogiolo contenete il campione è stato posto in stufa a 105 °C per 6 ore, quindi riportato a temperatura ambiente in essiccatore e poi pesato. La percentuale di TS è stata determinata attraverso la seguente equazione:

$$TS = [(m3 - m1)/(m2 - m1)] \times 100$$

dove m1 è la massa del crogiolo, m2 la massa del crogiolo + campione prima del trattamento termico, m3 la massa del crogiolo + campione dopo trattamento a 105 °C per 6 ore.

La percentuale di solidi volatili (VS) è stata determinata ponendo il campione + crogiolo risultante dal trattamento di cui sopra, in un forno a muffola preriscaldato a 550 °C e con un flusso costante di azoto per rendere l'atmosfera inerte, per 2 ore. Il campione è stato poi posto in essiccatore durante il raffreddamento fino a temperatura ambiente, quindi pesato. La percentuale di VS è stata determinata attraverso la seguente equazione:

$$VS = [(m_4 - m_1)/(m_3 - m_1)] \times 100$$

dove m_4 è la massa del crogiolo + campione dopo trattamento a 105 °C per due ore seguito dal trattamento a 550 °C in atmosfera inerte per 6 ore.

La percentuale di solidi fissi (FS), cioè la parte di materia che risulta dopo la perdita della componente volatile può essere dedotta per calcolo:

$$FS = TS - VS$$

Le ceneri sono state invece determinate ponendo il crogiolo con il campione trattato a 550 °C in atmosfera inerte, nel forno a muffola alla stessa temperatura ma sostituendo il flusso di azoto con un flusso di aria. Dopo 18 ore di trattamento il campione è stato raffreddato in essiccatore e pesato. La percentuale di ceneri è stata calcolata come segue:

$$\text{ash} = [(m_5 - m_4)/(m_2 - m_1)] \times 100$$

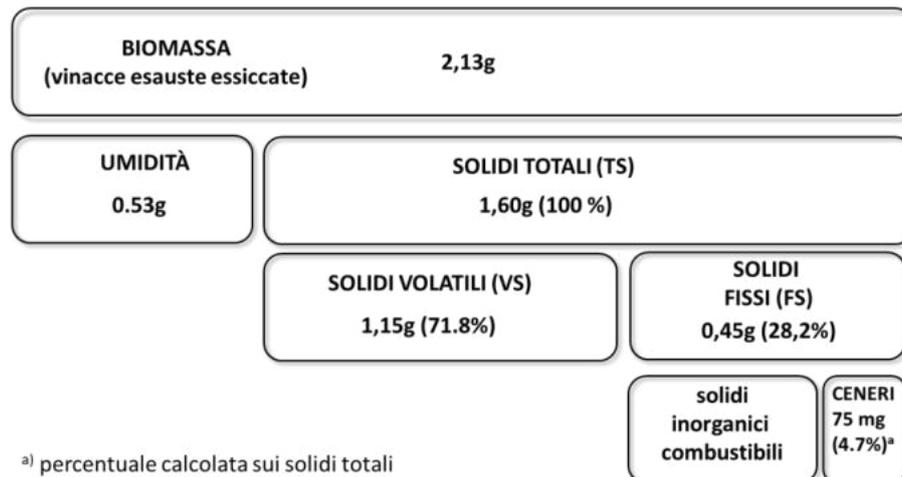
dove m_5 è la massa del crogiolo + campione dopo trattamento ossidativo a 550 °C.

Il valore calorifico totale (GCV) espresso in MJ/Kg è stato determinato attraverso la seguente equazione empirica¹:

$$\text{GCV (MJ/Kg)} = 0.21575 (VS) + 0.07492 (FS) - 0.08426 (\text{ash}).$$

RISULTATI

I risultati della prova sono riassunti nel seguente grafico:



Valore Calorifico Totale delle vinacce dopo estrazione enzimatica:

$$\text{GCV} = 0.21575 (71.8) + 0.07492 (28.2) - 0.08426 (4.7) = 18 \text{ MJ/Kg}$$

Questo valore di GCV è comparabile a quello di altre biomasse utilizzate per alimentare impianti per la produzione di energia. In particolare, come si può evincere dalla tabella di seguito, il GCV delle vinacce asciugate all'aria fino ad un valore di umidità prossimo al 10% è in linea con quello della paglia d'orzo e con le stoppie del mais e leggermente inferiore a quello dei tutoli di mais e del legname pellettizzato e risulta migliore rispetto a quello della paglia di riso anche in termini di ceneri residue (vedi tabella, rif. Bib. Di comparazione: A. R. Sahito, R. B. Mahar, Z. Siddiqui, K. M. Brohi, Estimating calorific values of lignocellulosic biomass from volatile and fixed solids, Int. J. Biomasses and Renewable, 2013, Vol 2, No 1, pp 1-6). Il risultato quindi suggerisce la possibilità di sfruttamento profittevole delle biomasse per la produzione di energia.

Tabella estratta dal riferimento [Sahito et al. (2013)]

Sample No	Name of Biomass	(% by mass, dry basis)			GCV _E (MJ/kg)
		VS	FS	ash	
1	Bagasse	75.43	24.57	4.87	16.89
2	Banana Plant Trash	62.69	37.31	17.76	14.24
3	Barley straw	70.97	29.03	7.41	16.95
4	Canola Straw	68.64	31.36	10.49	16.22
5	Coconut coir	62.79	37.21	3.84	16.36
6	Corn Cob	71.98	28.02	7.05	16.63
7	Corn Stover	77.72	22.28	6.73	17.69
8	Cotton Gin Waste	60.84	39.16	21.76	14.33
9	Cotton Stalks	63.54	36.46	10.49	16.05
10	Groundnut shell	82.64	17.36	1.70	18.38
11	Mango Wood	80.78	19.22	3.89	18.08
12	Millet Stalks	69.28	30.72	9.27	16.65
13	Neem wood	79.98	20.02	1.59	20.02
14	Rice Husk	61.39	38.61	21.62	15.02
15	Rice Straw	62.27	37.73	19.39	14.50
16	Saw Dust	69.02	30.98	6.83	16.58
17	Soybean Straw	73.53	26.47	8.33	16.23
18	Sugarcane trash	66.42	33.58	13.95	15.60
19	Sunflower Stover	65.01	34.99	9.38	15.69
20	Sunflower seed shell	73.97	26.03	3.53	17.08
21	Wheat Straw	64.12	35.88	15.30	15.06
22	Wood Chips	78.69	21.31	5.93	19.92

CONCLUSIONI

Essendo il Valore Calorifico Totale comparabile a quello di altre biomasse utilizzate per alimentare impianti per la produzione di energia, è possibile concludere che le biomasse (fecce di estrazione) delle matrici più performanti in termini di ricaduta di progetto possano essere a loro volta ugualmente utilizzate per la profittevole produzione di energia. Infine, la proximate analysis è risultata essere un metodo efficiente per la determinazione delle percentuali di massa di umidità, ceneri, sostanze volatili e carbonio fisso, utili a comprendere il possibile impiego delle biomasse per la produzione di energia, ottenute da una serie di test standardizzati applicate alle matrici di scarto oggetto del progetto. La proximate analysis qui riportata rappresenta quindi un semplice, versatile ed efficace protocollo da adottare a livello aziendale per la caratterizzazione completa e mirata dei residui di estrazione per la loro valorizzazione energetica che non richiede inoltre particolari competenze specifiche né tantomeno apparecchiature sofisticate e costose, poiché ci si basa su dati che derivano da pesate della matrice della matrice sottoposta a diversi passaggi di riscaldamento e riscaldamento ossidativo.

Già con il risultato di questa prova emerge come il protocollo metodico di proximate analysis corrisponda a quanto previsto dall'indicatore per questa sotto-azione.

• **ATTIVITÀ 3.4.2. VALUTAZIONE DEL POSSIBILE IMPIEGO DELLE BIOMASSE RESIDUE PER BIOCARBURANTI**

Parallelamente all'attività precedente, verrà condotta la valutazione del possibile impiego delle biomasse residue per la produzione di biocarburanti attraverso processi bio-fermentativi. A tal fine si dovrà tenere conto della complessità e dell'eterogeneità e contemporaneamente della variabilità dell'azione enzimatica al variare del substrato.

- **Prova 3.4.2.1. Resistenza della biomassa alla degradazione biologica**

I carboidrati delle biomasse vegetali rappresentano la materia prima per la produzione di biocarburanti liquidi bioetanolo in primis. Tuttavia, il materiale vegetale è eterogeneo e recalcitrante alla degradazione necessaria per liberare i monosaccaridi fermentabili. Si ricorre quindi a pretrattamenti fisici o chimici abbinati a idrolisi enzimatica. Questi passaggi aggiuntivi, gravano energeticamente ed economicamente sulla produzione di biocarburanti e rendono necessaria un'identificazione delle biomasse strutturalmente favorevoli, che richiedano cioè manipolazioni trascurabili e il cui sfruttamento risulti socialmente ed ecologicamente sostenibile.

Negli ultimi anni le vinacce, cioè il residuo della pigiatura delle uve che include bucce, polpa, semi, reaspi e succo residuo la vinaccia sono state proposte come materia prima per la produzione di combustibili liquidi [L. Law et al., 2013. Curr. Biotechnol. 2, 114–116] che potrebbe essere pianificata nello stesso sito di vinificazione evitando costi associati al trasporto della biomassa. Su una produzione mondiale annua di uva per la vinificazione di 67,1 Mt/anno è stato stimato che un 18-20% rimane come vinaccia di scarto (13,4 Mt, peso umido) [M. Spanghero et al., Anim. Feed Sci. Technol. 2009, 152, 243–255]. Questo materiale che attualmente ha un valore economico limitato e viene utilizzato nella mangimistica, per la produzione di grappa o come fertilizzante è stato sfruttato nella sottoazione 3.1 come matrice per l'estrazione di composti fenolici ed altre molecole di valore.

Come ogni biomassa proposta per lo sfruttamento energetico, è necessario acquisire precise informazioni sulla composizione che consentano una stima precisa della resa in biocarburanti per una puntuale analisi preventiva del rapporto costi-benefici. Per questo abbiamo preso in esame le vinacce provenienti da uve bianche e rosse, considerando la loro composizione prima e dopo i trattamenti estrattivi al fine di valutare anche un possibile sfruttamento a fini energetici in alternativa o in combinazione con gli sfruttamenti indicati nella sottoazione 3.1.

MATERIALI E METODI

I reattivi commerciali sono stati utilizzati senza ulteriori purificazioni. La cellulasi da *Aspergillus niger* (450 U cellulasi, 138 U, emicellulasi or 0.28 U pectinasi) è un prodotto Fluka. La liofilizzazione è stata condotta con un vuoto di circa 10^{-3} mmHg. I campioni seccati sono stati macinati in un mulino a sfere Retsch PM 10. Le letture di assorbimento sono state eseguite con uno spettrofotometro UV-visible Shimadzu 320. Il reagente DNSA è stato preparato aggiungendo 1 g di acido-3,4-dinitrosalicilico sciolto in 20 mL d'acqua ad una soluzione di 20 g di tartrato di sodio potassio sciolto in 50 mL e portando il tutto ad un volume finale di 100 mL.

Determinazione umidità: Un campione di 50 g di vinacce viene congelato per una notte a -20 °C e liofilizzato. Il residuo secco viene pesato e macinato in un mulino a sfere ed utilizzato per i passaggi successivi. Sono stati ottenuti 11.3 g dal campione di vinacce bianche (77.4% di umidità) e 15.1 g dal campione di vinacce rosse (69.8% umidità).

Estrazione acquosa: Per entrambe le tipologie di vinacce, 1 g di campione macinato viene posto in 10 mL di acqua bollente e lasciato per 1 ora in agitazione magnetica. Dopo essere stato raffreddato, il campione viene centrifugato (5.000 rpm x 10 minuti) e dopo decantazione del supernatante il trattamento viene ripetuto per altre due volte sul precipitato. I tre supernatanti riuniti (30 mL totali) per ogni tipo di vinaccia rappresentano l'estratto solubile (WSE) e il residuo rappresenta la frazione insolubile in acqua (WIF). Quest'ultima è stata seccata in stufa a 100 °C per 20 ore e pesata per determinare per calcolo la percentuale di WSE. Sono stati ottenuti 0.37 g dal campione di vinacce bianche e 0.79 g dal campione di vinacce rosse. Il che significa un WSE del 63% per le bianche $[(1-0,37) \times 100]$, un WSE del 21 % per le rosse $[(1-0,79) \times 100]$.

Caratterizzazione dell'estratto acquoso (WSE): L'estratto acquoso (WSE) dei campioni W e R è stato analizzato con il metodo colorimetrico dell'acido dinitrosalicilico (DNSA) miscelando 0,1 mL del campione con 0,1 mL di tampone citrato di sodio 50 mM a pH 5 e 0,6 mL di reattivo DNS. Per il controllo del bianco, è stata utilizzata acqua distillata al posto del campione. I campioni sono stati fatti bollire per 5 minuti e trasferiti in acqua fredda. Quindi sono stati aggiunti 4 mL di acqua distillata ed è stato letto l'assorbimento a 540 nm. Per ottenere le concentrazioni assolute, è stata costruita una curva di calibrazione con il glucosio come zucchero standard. È stata così misurata una concentrazione pari a 18 mg/mL nel WSE da vinacce

bianche e di 5 mg/mL in quello da vinacce rosse. Considerando che il volume dei campioni era di 30 mL l'86% $[(0.018 \text{ g/mL} \times 30 \text{ mL}) / (1 \text{ g} - 0.37 \text{ g}) \times 100]$ del WSE da vinacce bianche e il 71 % $[(0.005 \text{ g/mL} \times 30 \text{ mL}) / (1 \text{ g} - 0.79 \text{ g}) \times 100]$ di quello da vinacce rosse è rappresentato da zuccheri riducenti.

Caratterizzazione della frazione insolubile in acqua (WIF): Questa frazione è stata sottoposta ad idrolisi acida sospendendo 1 g di campione in 10 mL di H₂SO₄ 0.5 M e ponendo la sospensione in autoclave (121 °C) per un'ora. Dopo raffreddamento la soluzione è stata neutralizzata con HCl 0.2 M e centrifugata. Il residuo insolubile è stato seccato a 100 °C per 20 ore e pesato. La differenza ponderale permette di calcolare un'estrazione di 20 % della massa dalle vinacce rosse e 25% in quelle bianche. L'analisi col metodo del DNSA sugli estratti neutralizzati conferma anche in questo caso che circa l'80 % della massa estratta col trattamento acido è rappresentata da zuccheri riducenti.

Estrazione enzimatica del residuo solido pretrattato con acido solforico: Un campione di 0.1 g del residuo secco viene sospeso in 1 mL di acetato di sodio 50 mM a pH 5 in una provetta in vetro tarata. Alla sospensione vengono aggiunti 5 mg di cellulasi da *Aspergillus niger* e i campioni vengono lasciati in leggera agitazione a 30 °C per 24 ore. La sospensione viene quindi centrifugata (10.000 rpm, 10 min) e sul supernatante viene eseguita la quantificazione degli zuccheri riducenti. Il precipitato viene lavato con 1 mL d'acqua, centrifugato poi seccato a 100 °C per 20 ore e pesato.

RISULTATI

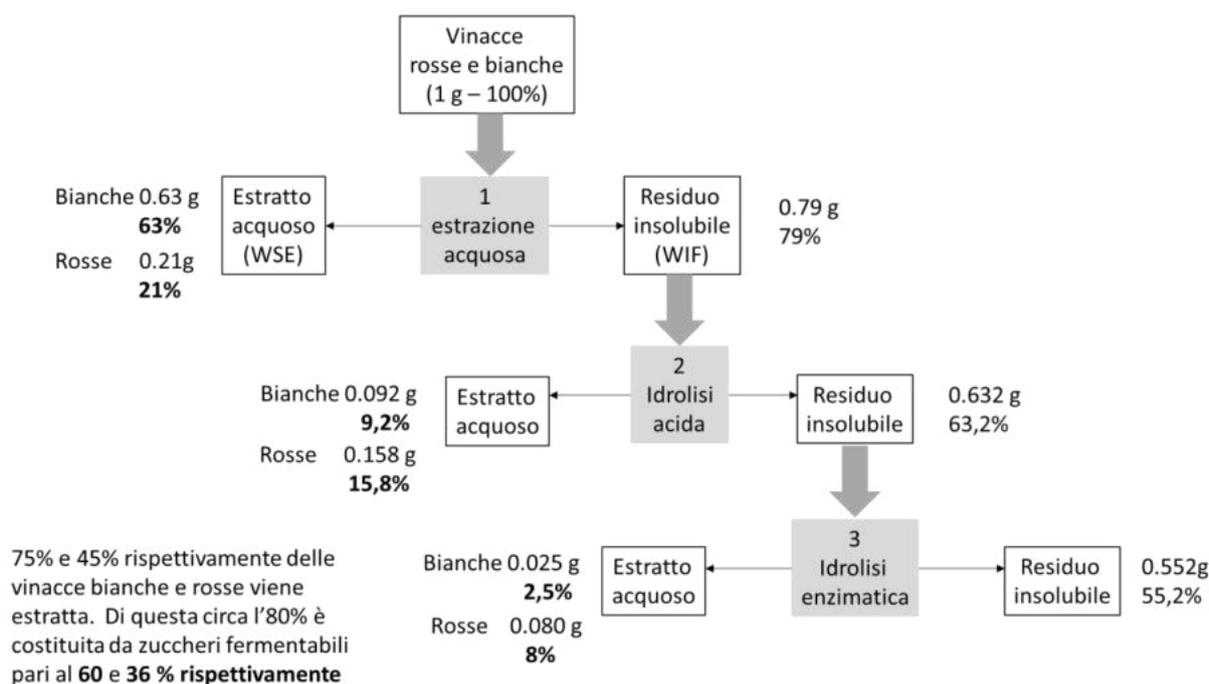
Le vinacce derivate da uve bianche e rosse sono state liofilizzate al fine di valutare la percentuale di umidità. Nei campioni presi in esame il peso secco dopo liofilizzazione è risultato il 22.6 % per le vinacce bianche (campione W) e del 30. 2% per quelle da uve rosse (campione R). Sui campioni liofilizzati è stata condotta un'estrazione a caldo con acqua. Dopo essiccazione e pesata del residuo insolubile è risultato che circa il 63% del peso secco delle vinacce bianche e il 21% di quelle rosse viene estratto dall'acqua. Questi estratti acquosi (WSE - Water Soluble Extract) sono stati analizzati con la metodica dell'acido dinitrosalicilico (DNSA) per quantificare l'ammontare in essi di zuccheri riducenti. La maggior parte della materia estratta è risultata essere proprio composta da monosaccaridi e oligosaccaridi, cioè la componente più idonea alla conversione diretta in etanolo per via fermentativa. Va notato che le vinacce bianche risultano decisamente più ricche di questa componente zuccherina estraibile con acqua. Queste differenze sono probabilmente imputabili al fatto che queste vinacce, a differenza di quelle rosse non hanno subito il periodo di macerazione a contatto col succo durante il quale probabilmente si verifica una parziale fermentazione degli zuccheri.

Il residuo solido dell'estrazione acquosa, che ben rappresenta la matrice derivata dalle estrazioni condotte nella sottoazione 3.1, dopo essiccazione è stato sottoposto ad idrolisi con una soluzione di acido solforico 0.5 M a 120 °C che ha portato ad un passaggio in soluzione del 25 % della massa per le vinacce bianche e del 20 % di quelle rosse (determinato dopo essiccazione e pesata del residuo insolubile). Anche in questo caso l'analisi con DNSA ha mostrato che la maggior parte della massa portata in soluzione è rappresentata da zuccheri riducenti (70-80%).

Il residuo solido della digestione acida è stato lavato con acqua infine trattato con cellulasi in soluzione tampone a pH 5 (acetato di sodio 50 mM) alla temperatura di 30 °C per 24 ore. Dopo il trattamento enzimatico si è provveduto a separare ed analizzare la frazione solubile e ad essiccare e pesare il residuo solido. Il risultato di queste analisi dimostra che un ulteriore 10% della massa derivante sia dalle vinacce bianche che da quelle rosse è passato in soluzione sotto forma di zuccheri solubili grazie all'azione degli enzimi cellulolitici.

Il processo può essere riassunto nel diagramma di flusso che segue dal quale si può ricavare la percentuale approssimativa di zuccheri fermentabili ottenibili dalle vinacce bianche e rosse vergini oppure dopo aver subito processi estrattivi analoghi a quelli descritti nella sottoazione 3.1.

Diagramma di flusso delle fasi di saccharificazione delle vinacce bianche e rosse



CONCLUSIONI

Se si considera una resa media della fermentazione del 91% [L. Favaro et al., *Biotechnol. Biofuels* 2013, 6, 168] si può dedurre che da 1 tonnellata di vinacce bianche si potrebbero produrre più di 500 L di etanolo e 300 L dalle vinacce rosse. Sono valori paragonabili a quelli che si ottengono da altri scarti della filiera agroalimentare come paglia di riso, orzo, frumento, bagasse di canna da zucchero, ecc. [K.R. Corbin et al., *Biores. Technol.* 2015, 193, 76-83] confermando ulteriormente quanto emerso con la proximate analysis ovvero che le biomasse utilizzate possono essere impiegate per la produzione di energia, in questo senso esprimibile in relazione alla considerazione delle biomasse di BIOFACE come fonte di biocombustibili (bio-etanolo).

Conclusioni triennio

Le biomasse residue da processi di estrazione sono una fonte di energia attrattiva per i benefici di ricaduta di tipo ambientale, economico, politico e sociale e contribuiscono in modo sostanziale alla circolarità dei processi produttivi, ora non più solo come risorsa di valorizzazione di prima generazione (*from cradle to grave*) ma anche di seconda generazione (*from cradle to cradle*), come dimostrato dalle diverse ricadute contemplate dal progetto BIOFACE.

Le matrici di scarto che sono risultate più promettenti per una produttiva valorizzazione energetica sono risultate le vinacce. Questo è però valido soltanto se si utilizzano le vinacce vergini, mentre quelle che hanno subito i processi estrattivi implementati nella sottoazione 3.1 risultano depauperate di una buona parte della massa fermentabile e possiedono una biomassa più recalcitrante che necessita di trattamenti chimici, termici ed enzimatici per la saccharificazione con un aggravio di spesa che ne sconsiglia l'impiego come feedstock per la bioraffineria (produzione di biocombustibili).

Dal Valore Calorifico Totale emerso con la proximate analysis, unitamente ai risultati relativi alla resistenza alla degradazione biologica della biomassa, è possibile concludere che le biomasse (fecce di estrazione) delle matrici più performanti in termini di ricaduta di progetto possano essere a loro volta ugualmente utilizzate per la profittevole produzione di energia. A questo proposito, la proximate analysis è risultata essere un metodo efficiente per la determinazione delle percentuali di massa di umidità, ceneri, sostanze volatili e carbonio fisso, utili a comprendere il possibile impiego delle biomasse per la produzione di energia, ottenute da una serie di test standardizzati applicate alle matrici di scarto oggetto del progetto. La proximate analysis qui riportata rappresenta quindi un valido protocollo da adottare a livello aziendale per

la caratterizzazione completa e mirata dei residui di estrazione per la loro valorizzazione energetica e la sua messa a punto qui espressa si identifica con il raggiungimento dell'indicatore di risultato per le ricadute nel comparto energetico.

SOTTO-AZIONE 3.5 - VALUTAZIONE ECONOMICA

Uar: CRPV

OBIETTIVI

L'attività prevista nella presente azione progettuale riguarda la realizzazione di uno studio di fattibilità della produzione di macromolecole con finalità fitosanitarie, alimentari, energetiche a partire da sottoprodotti vegetali derivanti dall'industria agroalimentare.

MATERIALI E METODI

Per quanto riguarda l'analisi di contesto, le informazioni sono state raccolte presso le principali fonti di dati pubbliche, la bibliografia esistente e l'esperienza di alcuni osservatori privilegiati del sistema produttivo, aderenti al presente GOI.

Per quanto riguarda le valutazioni econometriche, in relazione alle risultanze ottenute in termini tecnici sugli aspetti legati all'estrazione di macromolecole, si è scelto di incentrare la valutazione economica principalmente sul sistema di estrazione con fluidi supercritici (SFE), in quanto è risultata essere la tecnica attualmente più idonea ad essere adottata in azienda, soprattutto per i minori costi di acquisto dell'impianto di estrazione, decisamente più contenuto rispetto agli impianti di estrazione ad ultrasuoni (UAE).

In particolare, lo studio di convenienza economica ha riguardato un impianto industriale con una capacità di 800 litri, una portata di anidride carbonica pari a 2.000 kg/h, assumendo una lavorazione in continuo di 24 ore al giorno per 300 giorni all'anno.

Al fine di valutare la convenienza dell'investimento, sono stati utilizzati i seguenti indicatori finanziari:

- il Valore Attuale Netto (VAN);
- il Saggio di Rendimento Interno (SRI);
- il Tempo di Ritorno del Capitale (TRC).

Nello specifico, il VAN misura in termini monetari l'incremento di valore dell'impresa in funzione dell'investimento, il quale risulta positivo per valori di VAN superiori allo zero.

L'SRI, invece, è quel saggio di sconto reale a cui si verifica l'uguaglianza tra costi e ricavi ($VAN = 0$). L'investimento risulta conveniente se l'SRI è superiore al tasso di rendimento minimo ritenuto accettabile dall'imprenditore, che in questo caso è stato considerato pari al 3%.

Infine, il TRC corrisponde al periodo di tempo entro il quale il totale dei ricavi supera le spese sostenute, generando quindi un valore positivo. Questo indice risulta utile a quantificare il rischio d'impresa, che risulterà tanto inferiore quanto inferiore sarà il numero di anni necessari per il recupero del capitale.

Infine, è stata implementata la SWOT Analysis, ovvero una metodologia nata dalle ricerche di marketing, utilizzata per analizzare il contesto competitivo e in particolare la strategia da adottare. L'obiettivo è quello di analizzare l'impatto dei maggiori fattori interni ed esterni che definiscono il posizionamento competitivo di un'impresa o business unit all'interno del proprio mercato, per elaborare una strategia competitiva. Nello specifico, vengono presi in esame:

- fattori interni: struttura organizzativa, progresso tecnologico, cultura organizzativa, livello di competenza, base di clienti, network con i partner;
- fattori esterni: livello tecnologico all'interno del settore, forza dei concorrenti, fattori ambientali;

I fattori interni vengono declinati in punti di forza (Strengths), ovvero risorse, competenze o fattori produttivi che consentono all'impresa di realizzare le strategie che supportano la mission, e punti di debolezza (Weaknesses) e cioè elementi che interferiscono con la realizzazione della strategia (mancanza di risorse, competenze o fattori produttivi).

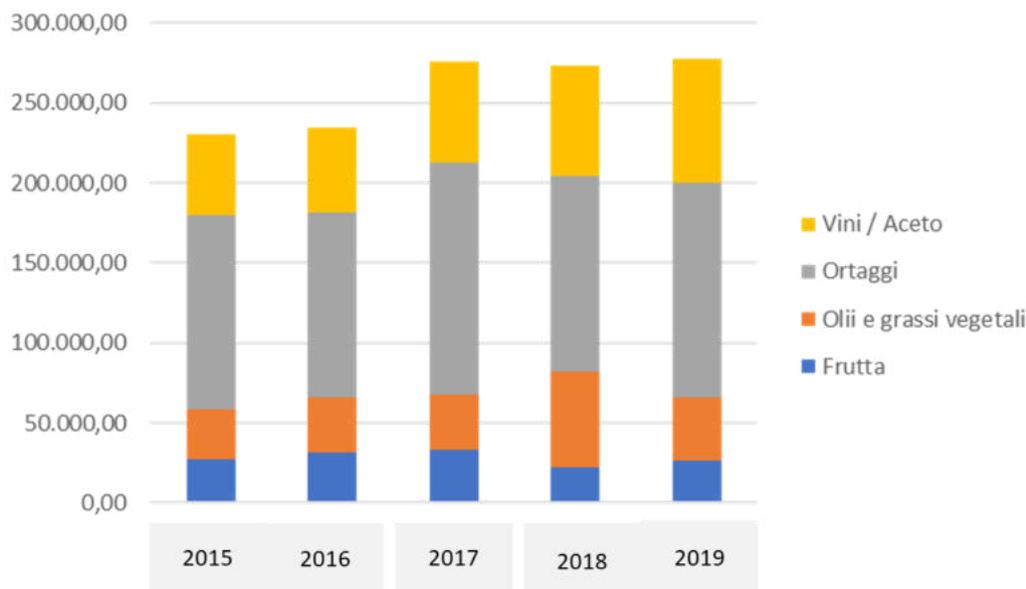
Dal punto di vista esterno, invece, vengono considerate le opportunità e le minacce derivanti dal contesto in cui si opera, per cui vengono valutate le aree dell'ambiente esterno che influenzano positivamente e negativamente l'attività in questione.

RISULTATI

In riferimento all'analisi del contesto, al fine di inquadrare la dimensione del mercato, sono stati stimati i volumi di scarti vegetali disponibili ai fini estrattivi all'interno del territorio nazionale.

Nello specifico, nel grafico 1 sono state riportate le stime degli scarti disponibili in relazione alla produzione industriale italiana.

Grafico 1: stima dei volumi di scarto disponibili nell'industria alimentare (ton).



Elaborazioni CRPV su dati ISTAT

In generale, in Italia il quantitativo di scarti di origine vegetale provenienti dall'industria alimentare viene stimato per un volume compreso tra le 220.000 e le 270.000 tonnellate all'anno.

Considerando che un impianto industriale di estrazione, lavorando a pieno regime (24 h, 300 giorni all'anno), è in grado di lavorare 40.000 tonnellate annue di scarti vegetali, si evince che, qualora il mercato si espandesse, si potrebbero verificare delle problematiche in termini di approvvigionamento delle materie prime per l'estrazione.

Entrando nello specifico delle caratteristiche degli scarti disponibili, dal grafico si osserva come la maggior parte dei sottoprodotti è rappresentata da ortaggi che rappresentano circa il 50% dell'intero volume di scarti. La categoria "vini e aceto", molto interessante in relazione alla tipologia di estratti che si possono ottenere dagli scarti di lavorazione, rappresenta circa il 20-25% dell'intera stima di scarti disponibili. La restante quota appartiene agli scarti riferibili all'industria di lavorazione di frutta, olii e grassi.

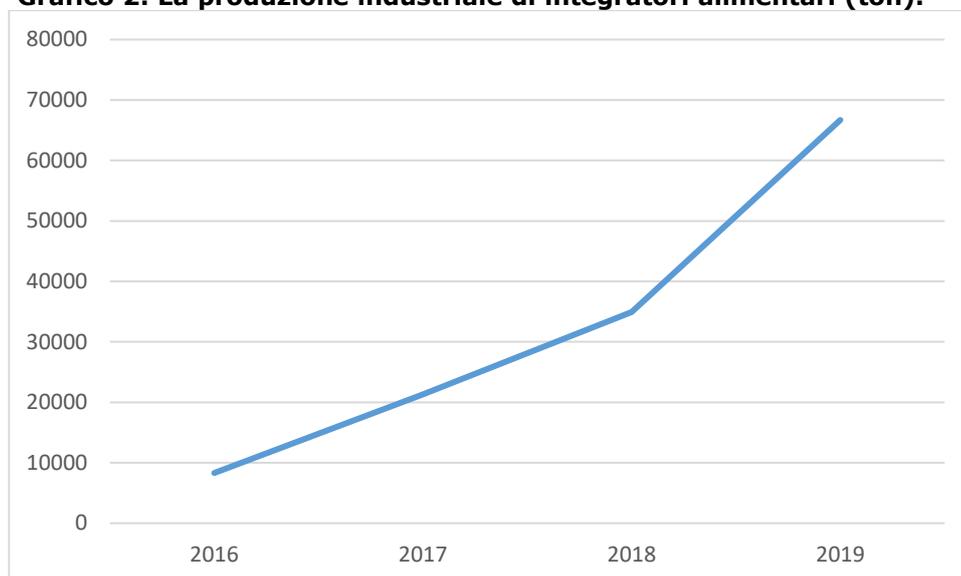
In base ai numeri disponibili in termini di rese di estrazione, si stima che i volumi di estratto ottenibili in base ai volumi di scarto annui calcolati per l'intero territorio nazionale si aggirano intorno alle 28 mila tonnellate.

Considerando un prezzo medio di vendita degli estratti di origine vegetale riscontrabile compreso tra i 10 ed i 30 euro, in relazione al contenuto, alla matrice di partenza ed alla destinazione d'uso, la dimensione del volume di affari connessa alla vendita di estratti di origine vegetale si aggira tra i 400 e gli 800 milioni di euro. Sebbene tale numero risulti abbastanza contenuto, è bene evidenziare che si tratta comunque di settore di riciclo per aziende il cui business principale è rappresentato dalla produzione di alimenti.

Per quanto riguarda i canali di commercializzazione degli estratti, vi è un grande interesse legato al settore della nutraceutica e degli integratori alimentari, che da sola vale 3,7 miliardi di euro (dati federalimentare), oltre all'interesse registrato nel comparto della cosmetica, che nel 2018 in Italia ha fatto registrare un valore di produzione pari a 11.200 milioni di euro.

Entrando nello specifico del settore di maggior interesse, ovvero la nutraceutica, in Italia la produzione industriale di integratori dietetici secondo ISTAT ha raggiunto nel 2019 il valore di circa 67 mila tonnellate, facendo registrare un forte incremento di produzione negli ultimi quattro anni, come è possibile osservare nel grafico 2.

Grafico 2: La produzione industriale di integratori alimentari (ton).



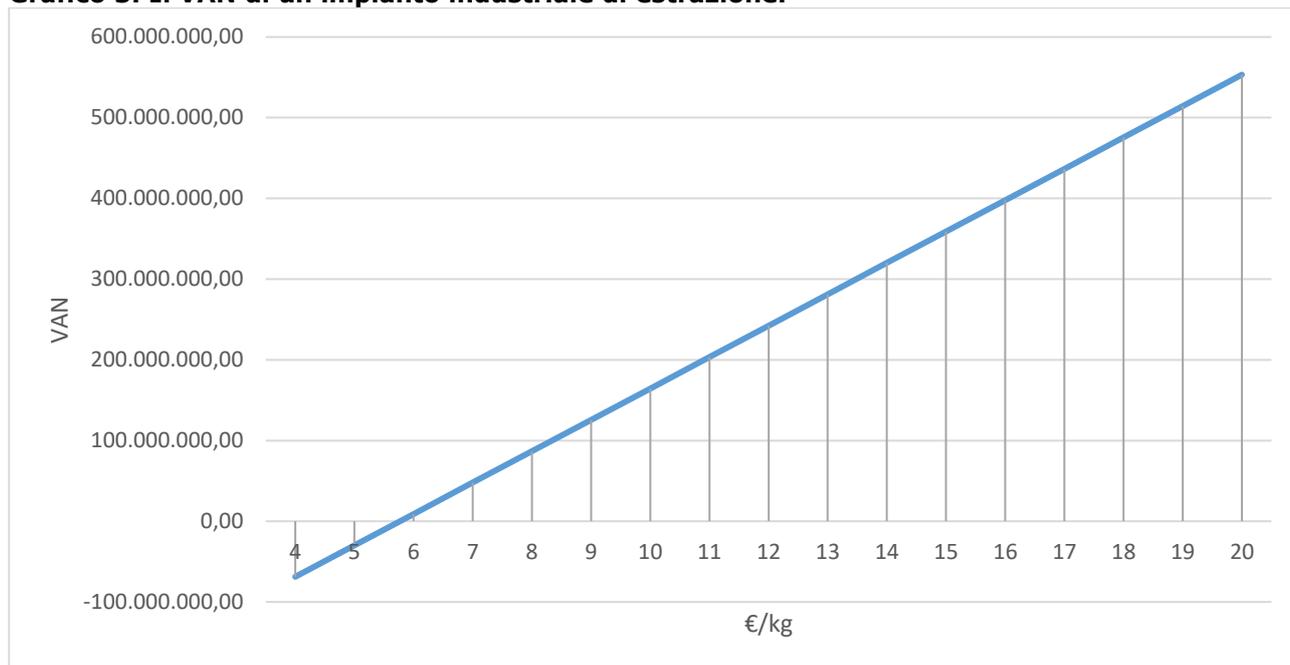
Dati ISTAT

Tale dato ci permette di valutare il settore della nutraceutica come un naturale canale di vendita di estratti vegetali, connessi all'utilizzo di scarti dell'industria alimentare.

Per quanto riguarda le valutazioni econometriche connesse all'implementazione di un impianto industriale di estrazione, così come descritto nella nota metodologica, è emerso che il VAN, ovvero il valore dell'impresa, indica dei valori positivi per prezzi di vendita degli estratti superiori a 6 euro per kg di estratto vegetale. Avendo stimato il prezzo di vendita degli estratti compreso tra i 10 e i 30 euro per chilogrammo, si può concludere che, qualora le condizioni operative ipotizzate nel calcolo effettuato si confermassero, l'implementazione di un sistema industriale di estrazione risulterebbe redditizio.

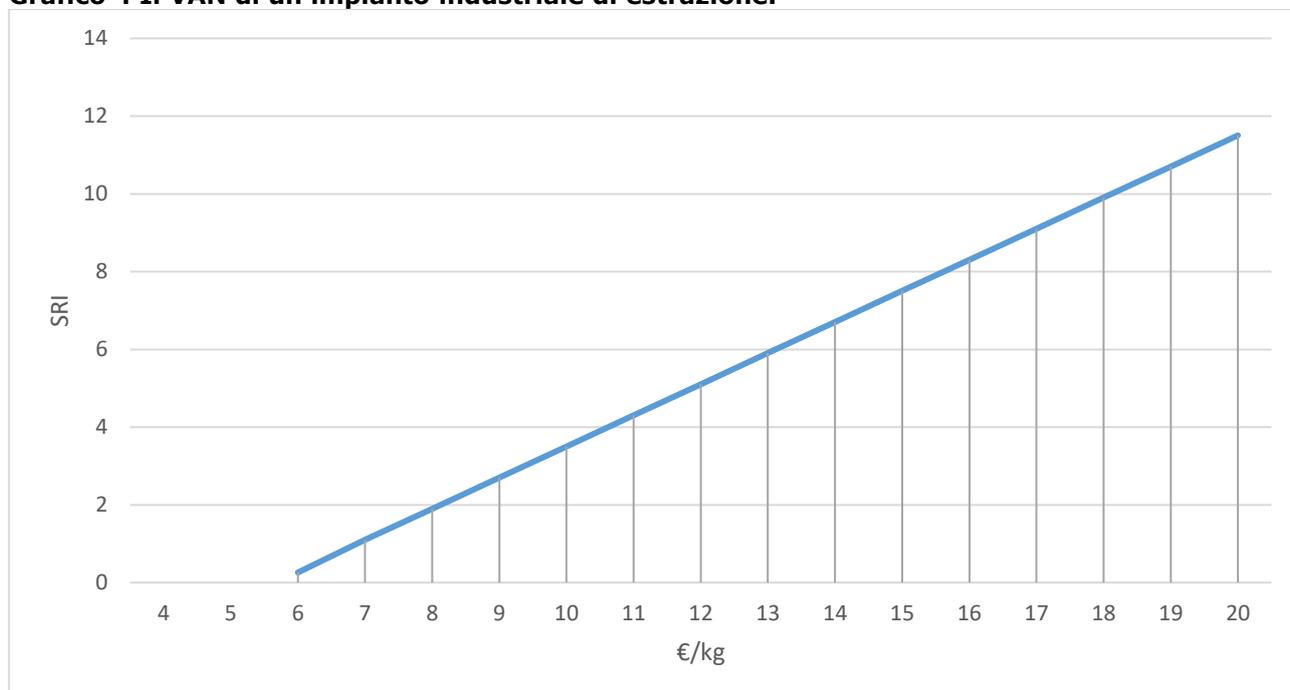
In particolare, osservando il grafico 3, si evince che il valore di un impianto in grado di lavorare ai regimi descritti, può totalizzare un reddito di 200 milioni di euro in 10 anni qualora il prezzo medio di vendita degli estratti fosse di 11 euro per chilogrammo.

Grafico 3: Il VAN di un impianto industriale di estrazione.



La performance economica positiva descritta dal VAN, viene confermata anche da un secondo indicatore, il Saggio di Rendimento Interno (SRI), il quale indica la convenienza all'investimento per tassi di rendimento superiori al 3%. Osservando il grafico 4, si nota che i prezzi di vendita dell'estratto sono superiori a 6 €, tale indice conferma la convenienza all'investimento.

Grafico 4 Il VAN di un impianto industriale di estrazione.



Infine, è stato valutato il Tempo di ritorno del capitale (TRC), cioè il periodo di tempo entro il quale il totale dei ricavi supera le spese sostenute, generando quindi un valore positivo, che è di 5 anni ipotizzando un prezzo medio di vendita di 6 euro per chilogrammo di estratto. Per prezzi di vendita di 7 euro per

chilogrammo e superiori, il TRC risulta di soli 2 anni. Questo in termini pratici si riassume sostenendo che, qualora il prezzo medio di vendita fosse uguale o superiore a 7 euro per chilogrammo di estratto, il capitale investito per l'acquisto dell'impianto, rientrerebbe in due anni.

Tutti i risultati esposti sono stati inquadrati nell'ambito della SWOT Analysis ed incasellati nella quattro categorie citate: punti forza, punti di debolezza, opportunità e minacce (Tabella 1).

Per quanto riguarda i punti di forza, in generale è necessario annoverare il valore del riutilizzo degli scarti, ovvero di materiale vegetale che sarebbe stato destinato ad essere smaltito sotto forma di rifiuto. Dunque un rifiuto che crea valore è senz'altro un punto di forza del sistema di recupero di scarti vegetali finalizzati all'estrazione di macromolecole di interesse.

Un altro punto di forza è legato al sistema di estrazione – l'estrazione con fluidi supercritici (SFE) – che risulta più economica dell'innovativa estrazione ad ultrasuoni e molto più "pulita" dell'estrazione con solventi. Infatti, l'estrazione SFE non lascia residui, è completamente atossica e viene realizzata con bassi input energetici. Un punto di forza decisamente determinante è quello connesso alla redditività, la quale è risultata decisamente interessante in relazione allo studio condotto su un impianto industriale e precedentemente esposto.

Tabella 1: SWOT Analysis

Punti di Forza	Punti di Debolezza
<ul style="list-style-type: none"> • Riutilizzo di scarti • Creazione di valore • Costi di produzione contenuti rispetto a UAE • Non lascia residui (rispetto a estrazione con solventi) • Modulabilità del sistema • Atossicità dei fluidi (CO₂) e bassi costi energetici • Redditività dell'impianto 	<ul style="list-style-type: none"> • Processo difficilmente integrabile nel sistema di produzione degli scarti • Elevato costo di impianto • La gestione dell'estrazione
Opportunità	Minacce
<ul style="list-style-type: none"> • Grandi dimensioni dei settori nutraceutica e cosmesi • Il contesto politico che sostiene i processi "green" • Nel caso di un sistema di riciclo collegato all'azienda alimentare, la concorrenza esterna è frenata dalla difficoltà di approvvigionamento 	<ul style="list-style-type: none"> • Difficoltà di approvvigionamento • Elevato numero di competitor • Flessione dei prezzi

I punti di debolezza del sistema, sono annoverati gli elevati costi di impianto, che potrebbero costituire un limite in relazione alla capacità di investimento, oltre ad una problematica esecutiva che potrebbe avere dei riflessi sulle difficoltà di approvvigionamento citate nelle minacce: il processo di estrazione è difficilmente integrabile all'interno di un sistema di produzione a fini alimentari. Questo significa che deve essere implementato e gestito fisicamente in un sito produttivo diverso da un'industria alimentare che produce gli scarti che alimentano l'estrattore.

Dato che dall'analisi delle stime effettuate sulle disponibilità di scarti alimentari provenienti dall'industria si evince una possibile difficoltà di approvvigionamento, il concetto di collegare un impianto di estrazione alle strutture che generano gli scarti, rappresenterebbe senz'altro un'opportunità per rendere il sistema più solido.

In questo contesto è bene evidenziare che un sistema di questo genere, che funziona utilizzando degli scarti e a basso input energetico, è altamente sostenuto dalle politiche di carattere ambientale proposte dall'Europa.

Dal punto di vista della convenienza economica, la produzione di estratti di origine vegetale si andrebbe ad inserire in due comparti di elevata dimensione, che sono quelli della nutraceutica e della cosmesi. Tuttavia, in particolare il mercato della nutraceutica che ha visto un recentissimo sviluppo delle produzioni, potrebbe essere soggetto ad un ridimensionamento dei prezzi, con riflessi negativi sul mercato degli estratti.

Conclusione del triennio

In generale, viste le stime relative ai volumi di scarti vegetali disponibili e vista l'evoluzione del comparto della nutraceutica, la possibilità di investire su impianti di estrazione anche di dimensioni inferiori rispetto a quelle ipotizzate nel presente studio, che possa godere di un sistema di approvvigionamento regionale e/o locale, basato su collaborazioni stabili, potrebbe rappresentare un buon compromesso tra redditività, valorizzazione degli scarti e difficoltà di approvvigionamento.

2.2 Personale

Partner	Azione	Attività	Persona	Mansione/Qualifica	Attività svolta nell'azione	ore	costo orario	Costo Totale
UNIFE	3	Test, analisi di laboratorio e gustative		Professore ordinario	Collaboratore scientifico azione	8	115,35	468,37
UNIFE	3	Test, analisi di laboratorio e gustative		Professore associato	Responsabile scientifico azione	28	105,88	969,93
UNIFE	3	Test, analisi di laboratorio e gustative		Professore associato	Responsabile scientifico azione	52	114,99	1985,53
UNIFE	3	Test, analisi di laboratorio e gustative		Professore associato	Responsabile scientifico azione	38	98,64	1197,84
UNIFE	3	Test, analisi di laboratorio e gustative		Ricercatore	Responsabile scientifico azione	10	73,70	371,14
UNIFE	3	Test, analisi di laboratorio e gustative		Professore ordinario	Collaboratore scientifico azione	21	136,09	935,17
UNIFE	3	Test, analisi di laboratorio e gustative		Assegnista	Tecnico di laboratorio			21804,53
UNIFE	3	Test, analisi di laboratorio e gustative		Assegnista	Tecnico di laboratorio			23786,76
UNIFE	3	Test, analisi di laboratorio e gustative		Assegnista	Tecnico di laboratorio			23786,76
ASTRA	3	Test, analisi di laboratorio e gustative		OTD	OTD	192	15,71	3016,32
ASTRA	3	Prove di campo		Impiegato tecnico di concetto	Tecnico di campo	112	20,72	2320,64
ASTRA	3	Prove di campo		Impiegato tecnico di concetto	Tecnico di campo	152	23,33	3546,16
ASTRA	3	Prove di campo		Impiegato tecnico di concetto	Tecnico di campo	104	23,32	2425,28
CRPV	3	Investimenti funzionali		Impiegato tecnico di concetto	Tecnico di progetto			2206,62
CRPV	3	Investimenti funzionali		Impiegato tecnico di concetto	Tecnico di progetto			666,96
CRPV	3	Investimenti funzionali		Impiegato tecnico di concetto	Tecnico di progetto			169,20
CRPV	3	Investimenti funzionali		Impiegato tecnico di concetto	Tecnico di progetto			3442,18
CRPV	3	Investimenti funzionali		Impiegato tecnico di concetto	Tecnico di progetto			123,88
							Totale	93223,27

2.3 Consulenze

Ragione sociale della società di consulenza	Importo contratto	Attività realizzate / ruolo nel progetto	Costo
	23.650,00	Prove di laboratorio e di campo	23.650,00
Totale:			23.650,00

Attività ancora da realizzare:

Nessuna.

AZIONE 4 – PIANO DI DIVULGAZIONE DI TRASFERIMENTO DEI RISULTATI E IMPLEMENTAZIONE DELLA RETE PEI

2.1 Attività e risultati

Azione
Azione 4 - DIVULGAZIONE
Unità aziendale responsabile (Uar)
CRPV
Descrizione attività

L'azione di diffusione dell'innovazione alle imprese agricole e ai diversi stakeholders è iniziata fin dai primi mesi di attivazione del progetto per condividere sin da subito l'approccio innovativo impiegato con il progetto e conseguentemente sensibilizzare i portatori di interessi verso questa nuova frontiera data dal riciclo e valorizzazione degli scarti agro-industriali.

L'attività svolta è stata indirizzata a rendere concreto il collegamento funzionale *multi actor* tra innovazione, trasferimento e applicazione, che rappresenta un obiettivo intrinseco del PSR e della Misura 16.1.

La fase di divulgazione ha pertanto perseguito l'obiettivo di diffondere le informazioni-innovazioni in corso di valutazione nel progetto, non solo ai membri del GO ma ad una più ampia gamma di *stakeholders* del settore agricolo oltre che agli addetti del settore del futuro (e.g., studenti universitari). Il CRPV ha messo a disposizione del GO un indirizzario che conta oltre migliaia di utenti, una mailing list di oltre 1000 indirizzi, un portale che conta circa 10.000 visitatori all'anno, oltre a considerare che già la sua base sociale contribuisce nel suo complesso a produrre circa il 60% della PLV vegetale. L'Università di Ferrara ha inoltre esteso ai propri studenti parte delle iniziative svolte.

Come preventivato nel Progetto, il Piano di Comunicazione è stato sviluppato dall'intenso operato del personale CRPV, al fine di sviluppare una "Comunicazione sostenibile", ossia organizzare iniziative utili a mostrare i risultati raggiunti dalle attività del progetto e sistemi di divulgazione logisticamente tali da limitare quanto più possibile gli spostamenti degli utenti. Questo ultimo aspetto è divenuto particolarmente cogente da inizio marzo 2020 a seguito dei decreti entrati in vigore a causa della pandemia da Covid-19 che ha contingentato gli spostamenti e vietato ogni forma di assembramento. A seguito di tale condizione è stato infatti necessario rivedere completamente il sistema di divulgazione, individuando nuovi strumenti e tecniche, fino a quel momento poco o nulla esplorate nel settore agricolo, per garantire comunque una ampia diffusione e visibilità delle innovazioni. Questo esercizio, che ha colto tutti impreparati data la eccezionalità degli eventi, ha determinato un aggravio del lavoro svolto dal personale di CRPV, che comunque ha completato lo sviluppo di tutte le iniziative previste in collaborazione con i partner del progetto. In particolare è stato necessario riorganizzare iniziative con formule online per evitare ogni rischio di assembramento nel rispetto dei decreti/normative vigenti.

In accordo con i partner del GO, il personale CRPV ha quindi organizzato e gestito diverse iniziative e azioni di diffusione che sono descritte in Tabella 4.1, alcune delle quali, come specificato, sono state svolte in remoto.

In totale, dall'attivazione del progetto (10 aprile 2017) alla sua conclusione (31 dicembre 2020) sono state realizzate: **6 visite guidate (di cui 3 svolte online), 9 incontri tecnici (di cui 4 svolti online), 7 articoli** (anziché 5 previsti), **1 Poster e 3 presentazioni a eventi fieristici, workshop nazionali e 1 audiovideo ([GOIBIOFACE Biomolecole dalla valorizzazione di sottoprodotti agroalimentari](#))**.

Tutte le iniziative svolte hanno rappresentato anche momenti di discussione e confronto sul tema oggetto dell'evento, permettendo così un utile scambio di esperienze e risposte a vantaggio di tutti i partecipanti e del GO stesso.

TABELLA 4.1 - - Descrizione delle iniziative di divulgazione svolte dal 10 aprile 2017 al 31 dicembre 2020

Visite guidate		Incontri tecnici		Pubblicazioni		Audiovideo
Data	Titolo (n. presenze)	Data	Titolo (n. presenze)	Data	Titolo	Titolo
15/04/19	BIOFACEIncVis150419FE (40)	15/04/19	BIOFACEIncVis150419FE (=)	01/07/19	NaturalProductCommunicationjuly2019	GOIBIOFACE Biomolecole dalla valorizzazione e di sottoprodotti agroalimentari
14/06/19	BIOFACEVisita140619FC (7)	15/01/20	BIOFACEIncontro150120RA (22)	20/02/20	ParliamoneconGianniSacchettiNatural1marzo2020	
21/10/19	BIOFACEVisita211019FC (13)	16/01/20	BIOFACEIncontro160120FC (18)	01/04/20	Sottoprodotti agroalimentariNatural1Aprile2020	
20/04/20	BIOFACEVisitaonlinevit200420	28/01/20	BIOFACEIncontro280120BO (20)	01/05/20	TesiBotaniche42020	
28/04/20	BIOFACEVisitaonlinevit280420	12/02/20	BIOFACEIncontro120220BO (24)	01/12/20	Valorizzazione scartifilieraagro-alimentarePHASEOLU SVULGARISNatural1 dic. 2020	
28/04/20	BIOFACEVisitaonlinefrut280420	30/03/20	BIOFACEIncontroonline300320FE (40)	01/01/21	Valorizzazione fitosanitaria degli scarti agroalimentariInformatoreAgrario12021	
				04/02/21	Valorizzazione scartifilieraagro-alimentarePHASEOLU SVULGARISNatural1 genn/febb 2021	

		01/04/20	BIOFACEI ncontroonline010420 FE (78)		PresentazioneProgetto - Convegno Green Jobs 16 nov. 2017 FE	
		03/04/20	BIOFACEI ncontro03 0420FE (93)		PosterRRNMestreMaggio2018	
		04/05/20	BIOFACEI ncontro04 0520MO (20)		Presentazione al FORUM S3 - FICO 08-10-2019 BO	
					Presentazione Università del volontariato - 20-11-2019 FE	
Tot = 6		Tot = 9		Tot = 7		Tot= 1

Tutta la documentazione relativa alle locandine prodotte e diffuse (di cui il link nella tabella 4.1) ed i fogli firma registrati in occasione delle diverse iniziative sopra riportate in tabella 4.1, nonché copia degli articoli sono disponibili presso il CRPV. E' comunque allegato alla presente relazione il pdf delle locandine e relative presenze alle visite e agli incontri tecnici (**Allegato1_IncontriVisitePresenze_BIOFACE_5015191.pdf**), mentre per le attività svolte online si allega solo la locandina dell'iniziativa (le relative presenze sono dimostrabili e disponibili c/o il CRPV).

Dettaglio dei 7 articoli prodotti:

1. Sacchetti G., Tacchini M., Guerrini A., Marchetti N., Bernardi T., Massi A., Bernacchia G., Civolani S., Franceschelli F., M.G. Tommasini. Valorizzazione fitosanitaria degli scarti agroalimentari. *Informatore agrario*, 1/2021.
2. Massimo Tacchini, Ilaria Burlini, Immacolata Maresca, Alessandro Grandini, Tatiana Bernardi, Alessandra Guerrini, Lindomar Lerin, and Gianni Sacchetti. Polyphenols from *Vitis vinifera* Lambrusco By-Products (Leaves from Pruning): Extraction Parameters Evaluation Through Design of Experiment. *Natural Product Communications*, July 2019, 1-7.
3. Sacchetti G., Tacchini M., Civolani S., Maresca I., Burlini I., Grandini A., Tommasini M.G., Guerrini A. Sottoprodotti agroalimentari ed economia circolare: una sinergia efficiente? L'esempio del progetto BIOFACE. *Natural 1*, aprile 2020, pagg. 20-32.
4. Lager F.* Le filiere salutistiche sostenibili: l'esempio dei sottoprodotti della filiera agroalimentare come fonte di biomolecole. *Notiziario della Società Botanica Italiana*, 1 (2017)
*L'articolo rielabora la tesi di laurea in Farmacia della dott.ssa Lager F. nell'ambito delle attività del progetto BIOFACE. Relatore prof. Gianni Sacchetti, correlatore dott. Massimo Tacchini
5. Spalluto M. Valorizzazione di scarti della filiera agro-alimentare di *Phaseolus vulgaris* (prima parte). *Natural 1*, dicembre 2020**
6. Spalluto M. Valorizzazione di scarti della filiera agro-alimentare di *Phaseolus vulgaris* (seconda parte). *Natural 1*, gennaio-febbraio 2021**
**gli articoli rielaborano la tesi di laurea in Chimica e Tecnologie Farmaceutiche svolta dal dott. Spalluto M. presso l'Università degli Studi di Ferrara nell'ambito delle attività del progetto BIOFACE; relatore prof.ssa Alessandra Guerrini, correlatore dott. Massimo Tacchini.
7. Sacchetti G. Parliamone con. La redazione di Natural 1 ha intervistato Gianni Sacchetti, tra i promotori del progetto BIOFACE - svolto dall'Università degli Studi di Ferrara - che si inquadra nel Programma di Sviluppo Rurale dell'Emilia Romagna 2014-2020. *Natural 1*, marzo 2020.

Dettaglio degli eventi nazionali partecipati:

- Presentazione del progetto e sue sfaccettature da parte del referente scientifico del progetto all'evento "Green Jobs lavorare nel mondo dell'economia sostenibile" tenutosi a Ferrara il 16 Novembre 2017;
- Presentazione di un poster sul circuito della Rete Rurale Nazionale-MIPAF in occasione del Workshop organizzato a Mestre (VE) il 22 maggio 2018 a cui ha presieduto il responsabile di progetto del CRPV.
- Presentazione del progetto al FORUM S3 svoltosi a FICO (Bologna) l'8 ottobre 2019 in occasione di una manifestazione organizzata in collaborazione con la Regione Emilia Romagna.
- Presentazione dei risultati emersi dal progetto in occasione di un incontro svoltosi presso l'Università del volontariato di Ferrara in data 20 novembre 2019.

Inoltre il CRPV ha messo a disposizione del GO il proprio **Portale Internet**, affinché le attività ed i risultati conseguiti nel presente Piano siano facilmente identificabili e fruibili dall'utenza. In particolare all'interno del portale CRPV è stata realizzata una pagina dedicata al Piano (<https://progetti.crpv.it/Project/Index/29>), composta da una testata e da un dettaglio dove sono stati caricati tutti i dati essenziali del progetto e gli aggiornamenti via via disponibili relativi alle attività condotte. Attraverso un contatto continuo con il Responsabile di Progetto, un referente CRPV ha provveduto infatti all'aggiornamento della pagina con notizie, informazioni e materiale divulgativo ottenuti durante lo sviluppo del Piano. Questo lavoro ha permesso, unitamente alla pubblicazione dei risultati, la consultazione dell'elenco dei Piani coordinati da CRPV, dal quale, selezionando un singolo Piano/progetto si accederà ad una nuova pagina simile a quella del Portale CRPV, con cui si possono vedere i dettagli delle attività. Questo strumento comunicativo e divulgativo consente altresì di poter visionare collegamenti e sinergie che il presente piano può avere anche con altri progetti e/o iniziative.

Come indicato nell'Azione 1, il personale CRPV si è fatto inoltre carico di predisporre in lingua italiana e inglese, le modulistiche richieste per la presentazione e aggiornamento del Piano al fine del collegamento alla **Rete PEI-Agri**.

Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate.

Gli obiettivi previsti sono stati raggiunti pur con la criticità incontrata nel 2020 causata dalla pandemia Covid-19 che ha determinato la necessità di individuare nuovi strumenti e processi per il raggiungimento degli obiettivi fissati dal piano.

Attività ancora da realizzare:

Nessuna.

2.2 Personale

Partner	Azione	Attività	Persona	Mansione/Qualifica	Attività svolta nell'azione	ore	costo orario	Costo Totale
CRPV	4	Divulgazione	I	Impiegato tecnico di concetto	Divulgazione			2738,40
CRPV	4	Divulgazione	I	Impiegato tecnico di concetto	Divulgazione			1370,14
CRPV	4	Divulgazione	I	Impiegato tecnico di concetto	Divulgazione			258,40
							Totale	4.366,94

2.3 Consulenze

Ragione sociale della società di consulenza	Importo contratto	Attività realizzate / ruolo nel progetto	Costo
	500,00	Realizzazione Video	500,00
		Totale:	500,00

2.4 Trasferte

Cognome Nome	Descrizione costo	Costo
	28/01/2020 - Incontro tecnico	76,6
	10/02/2020 - Campus Cloud	84
	TOTALE	160,6

2.1 Attività e risultati

Azione

Azione 5 – FORMAZIONE

Unità aziendale responsabile (Uar)

CRPV

Descrizione attività

Sono state svolte tutte le attività previste in questa azione ed in particolare 7 coaching come di seguito indicato.

Coaching n. 5015614 a Catalogo Verde

Titolo "VALORIZZAZIONE DI SOTTOPRODOTTI VEGETALI: POTENZIALITA' APPLICATIVE DI ESTRATTI VEGETALI PER IMPIEGO IN AMBITO AGRICOLO"

Data realizzazione: dal 20/10/2020 al 23/12/2020

Durata 6 ore

Le azioni di formazione svolte hanno ricevuto grande interesse e apprezzamento da parte dei partecipanti, sia per i temi trattati che per come sono stati organizzati e strutturati nelle presentazioni che inizialmente

hanno preso in oggetto i principi della bioeconomia applicata al settore agroindustriale e successivamente approfondimenti sui risultati emersi dal progetto incluse le ricadute operative per la loro applicazione.

Gli obiettivi del progetto in merito alla formazione sono stati pienamente raggiunti e con alto grado di gradimento da parte degli utenti finali.

Inserito nel sistema SIAG anche il materiale didattico impiegato e distribuito a ciascun partecipante.

Grado di raggiungimento degli obiettivi, scostamenti rispetto al piano di lavoro, criticità evidenziate.

Tutte le attività di formazioni previste sono state svolte.

Attività ancora da realizzare:

Nessuna.

Attività di formazione

Specifica (N. domanda coaching)	Specifica (N. domanda Avvio)	Unità Aziendale Responsabile	Costo
5015614	5205399	CRPV	372,00
5015614	5205436	CRPV	372,00
5015614	5205442	CRPV	372,00
5015614	5205447	CRPV	372,00
5015614	5205448	CRPV	372,00
5015614	5205449	CRPV	372,00
Totale			2232,00

3 Criticità incontrate durante la realizzazione dell'attività

Criticità tecnico-scientifiche	<p>La criticità tecnico scientifica rilevata è stata la scarsa standardizzazione qualitativa degli scarti da estrarre. In particolare nelle diverse annate, con preciso riferimento agli scarti vitivinicoli (raspi in particolare), si è osservato un diverso contenuto di polifenoli che avrebbe potuto influire sul raggiungimento degli indicatori di risultato specifici per la qualità degli estratti. Questo non si è verificato per l'estratto di vinaccioli la cui attività antiossidante è risultata in linea con l'indicatore di risultato atteso per il comparto alimentare ma si suggerisce la necessità di un rapido trattamento delle matrici post-lavorazione o sul valore di un sistema di stoccaggio efficace degli scarti prima della loro valorizzazione.</p> <p>La pandemia Covid-19 ha inoltre determinato importanti difficoltà nel poter produrre una maggior quantità di estratto utile alle ultime prove in campo, che seppur svolte avrebbero potenzialmente potuto fornire risultati più performanti se si fossero impiegati maggiori quantitativi di estratti.</p> <p>Sempre a causa della pandemia Covid-19 parte dell'azione di divulgazione è stata riorganizzata con azioni online, non potendo svolgere attività in presenza per evitare assembramenti. Inoltre si è provveduto alla redazione di un maggior numero di articoli rispetto ai previsti per ampliare ulteriormente la diffusione delle conoscenze acquisite.</p>
Criticità gestionali (ad es. difficoltà con i fornitori, nel reperimento delle risorse umane, ecc.)	Non si rilevano criticità nella gestione del piano.
Criticità finanziarie	Non si rilevano criticità finanziarie

4 Altre informazioni

Nessuna.

5 Considerazioni finali

Non si rilevano considerazioni particolari.

6 RELAZIONE TECNICA

ATTIVITÀ COMPLESSIVAMENTE EFFETTUATE, RISULTATI INNOVATIVI E PRODOTTI

Di seguito si riporta una sintesi delle attività svolte e soprattutto dei risultati ottenuti nell'azione 3 facendo chiaro riferimento agli indicatori di risultato attesi.

➤ Estrazione e caratterizzazione dei sottoprodotti agroalimentari (sotto-azione 3.1)

Questa sotto azione del progetto si è caratterizzata di 3 attività sviluppate per concorrere al raggiungimento ed identificazione di un processo estrattivo con resa complessiva di estratto grezzo non inferiore al 10% per l'estrazione con fluidi supercritici e non inferiore al 15% per l'estrazione con ultrasuoni e microonde; per l'idrodistillazione non inferiore a 10 ml/kg (1%) di materiale di partenza; gli estratti dovranno contenere non meno del 1% in biomolecole attive come determinato da strategie analitiche (indicatore di risultato per l'attività estrattiva).

Di seguito una sintesi delle attività e dei principali risultati ottenuti in termini di innovatività di processo e di prodotto.

Azione relativa al Pretrattamento enzimatico delle matrici di scarto (3.1.1)

Prove di pretrattamento enzimatico (3.1.1.1): Queste prove di carattere qualitativo hanno dimostrato che l'impiego degli enzimi delle classi cellulasi e pectinasi determinano importanti variazioni nella composizione degli estratti ottenuti per macerazione in ambiente acquoso tamponato (pH 4.5) e che queste variazioni interessano in maniera significativa composti polifenolici favorendo un aumento della loro concentrazione in soluzione. I risultati di questa prova sono stati poi resi espliciti dalla quantificazione delle frazioni polifenoliche nella prova 3.1.1.2, espressa come cinetica di reazione al pretrattamento enzimatico. Nella prova di valutazione componente fenolica e terpenica (3.1.1.2), infatti, le analisi cromatografiche (HPLC-MS) evidenziano un significativo aumento della concentrazione di alcuni polifenoli appartenenti alla classe dei flavonoidi (principalmente quercetina e cianidina) nei campioni trattati enzimaticamente. La massima resa in polifenoli solubilizzati dall'attività enzimatica si determina con una quantità di enzima inferiore al 5% e per un tempo di trattamento non superiore alle 6-10 ore.

I risultati dell'azione concorrono al raggiungimento dell'indicatore di risultato specifico per l'intera sotto-azione ma anche alla realizzazione dell'indicatore di progetto relativo alla messa a punto di un protocollo operativo di estrazione da adottare a livello aziendale per ogni sottoprodotto risultato utile all'ottenimento di estratti/biomolecole efficaci esportabile anche in altri contesti come quello fitosanitario e alimentare (sotto-azioni 3.2; 3.3)

Azione relativa all'Estrazione delle biomasse pretrattate (3.1.2)

Prove estrattive sulle matrici pretrattate (3.1.2.1): Le migliori rese estrattive totali ottenute con macerazione assistita da ultrasuoni (UAE) sono state conseguite dai campioni di scarto della lavorazione delle mele con solo solvente alcolico (etanolo 100%). I dati di resa ottenuti dalle altre matrici, invece, si dividono abbastanza equamente tra quelle che hanno mostrato una resa alta nelle estrazioni con EtOH:H₂O in proporzione 50:50 (vinacce rosse e bianche, raspi, vinaccioli, pere, sanse e fagiolini) e quelle che hanno ottenuto una resa alta nelle estrazioni fatte con 100% H₂O (foglie di vite, bucce di pomodoro, ceci, mix fagioli e fagioli cannellini). Quello che caratterizza tutte le estrazioni è comunque il ridotto uso di solvente organico a beneficio delle finalità del progetto e della presente sotto-azione rispetto all'utilizzo di metodiche a basso impatto ambientale.

Rispetto a quanto atteso dal progetto, tutte le rese totali ottenute dalle matrici di scarto, con l'esclusione delle sanse e vinaccioli, erano al di sopra del 15% con il metodo della macerazione assistita da ultrasuoni (UAE), raggiungendo quindi per questa metodica l'indicatore di risultato. Analogamente si è avuto per la metodica dell'estrazione assistita da microonde (MAE) ma il contenuto in polifenoli poi rilevato negli estratti era sensibilmente inferiore e quindi il modello estrattivo è da ritenersi meno performante pur raggiungendo l'indicatore di risultato. Per l'idrodistillazione e l'estrazione con fluidi supercritici, invece, le rese estrattive sono tutte mediamente ridotte. Per l'idrodistillazione, sebbene le quantità siano in linea per diverse matrici con l'indicatore di risultato, l'espressione composizionale in biomolecole attive è estremamente ridotta ed al di sotto del limite richiesto dall'indicatore (1%) in contrasto con le attese coerenti con uno scale up di produzione industriale. Tutte le estrazioni SFE, infine, hanno prodotto risultati

al di sotto dell'indicatore di risultato sia rispetto alla resa (10%) che rispetto al contenuto di biomolecole attive.

Prove di valutazione della componente fenolica e terpenica (3.1.2.2): Relativamente alle analisi spettrofotometriche finalizzate agli obiettivi specifici della prova i migliori risultati in termini di contenuto di polifenoli totali sono stati ottenuti dagli estratti di derivazione vitivinicola, seguiti nell'ordine da quelli della frutta (mele, pere), della filiera olivicola e delle leguminose, sempre ottenuti con solvente di estrazione EtOH:acqua al 50% che si è rivelato essere il migliore mezzo di processo. In tutti gli scarti analizzati erano presenti polifenoli della classe delle procianidine, note per l'attività antiossidante. In particolare è stata identificata epi/catechina, il suo dimero di tipo B ed altri diversi oligomeri. Altri polifenoli evidenziati erano rutina, miquelianina/iperoside, nictoflorina, astragalina, quercetina (flavonoidi) e acido caftarico. Per quanto riguarda i distillati, quello di raspi, benchè le rese fossero sotto il livello di significatività per il progetto, tra i composti terpenici più abbondanti erano alfa-cadinolo, gamma-cadinene, epizonarene e delta-cadinene, ma in quantità non proponibile per uno scale up industriale, dal momento che per ottenere pochi ml di olio essenziale, in cui peraltro le sostanze putativamente utili sono in tracce di quantità, occorrerebbe estrarre quintali di matrice. Nei distillati di mele e di pere, invece, la componente terpenica era qualitativamente più ricca e quantitativamente più abbondante, ma sempre non proponibile per uno scale up produttivo. L'importante differenza quantitativa di resa tra alcune matrici di annate differenti (quantità di polifenoli totali diminuita di circa 10 volte) suggerisce la necessità di un rapido trattamento delle matrici post-lavorazione o sul valore di un sistema di stoccaggio efficace degli scarti prima della loro rivalutazione.

Azione relativa alla Caratterizzazione chimica degli estratti per l'individuazione e quantificazione delle principali categorie chimiche attive (3.1.3)

Prove di analisi chimiche sugli estratti per diversificare la fonte delle categorie molecolari (3.1.3.1): Le analisi chimiche sono state finalizzate anche all'individuazione di altre molecole organiche di potenziale interesse come ad esempio il licopene (proprietà antiossidante) composti glicosilati, acidi grassi e steroli per trovare eventuali spunti di diversificazione delle biomasse come possibili fonti di altre molecole di interesse. Ancora una volta le biomasse da filiera vitivinicola, estratte con il processo che impiega CO₂ supercritica (SFE) che presenta requisiti di sostenibilità di processo eccellenti data l'assenza di solventi organici, ha mostrato una resa totale interessante non particolarmente lontana dall'indicatore del 10% di resa totale, con un contenuto interessante di acidi grassi, di cui il linoleico (utile nel trattamento delle colesterolemie) è il più abbondante. Per quel che riguarda la valorizzazione delle leguminose oltre a polifenoli e flavonoidi di cui si è già riportato, sono stati individuati anche β-glucani, molecole con un potenziale di mercato importante nello sviluppo di integratori alimentari con proprietà funzionali anti-ipercolesterolemiche ed immunomodulanti.

In conclusione, i risultati di questa sotto-azione hanno determinato:

- 1) la messa a punto e verifica dell'efficacia di un protocollo di pretrattamento enzimatico per la valorizzazione delle biomasse;
- 2) l'individuazione della macerazione assistita con ultrasuoni (UAE) come il processo estrattivo complessivamente più performante e che ha determinato il raggiungimento dell'indicatore di risultato per la maggior parte delle matrici;
- 3) la messa a punto della miscela di estrazione che, in associazione alla metodica estrattiva più performante (UAE), permette il minore impiego di solvente organico (etanolo) in linea con l'espressione di sostenibilità legata al ridotto impatto ambientale ricercata con il progetto, mantenendo un livello di composti polifenolici in linea con le attese.
- 4) l'individuazione di quelle matrici che soddisfano gli indicatori di risultato in termini di resa estrattiva e di contenuto minimo di polifenoli (Vinacce rosse, vinacce bianche, raspi, vinaccioli, pere, sanse, fagiolini).

Sono emerse alcune criticità (vedi sezione 3 del presente documento): 1) Va sottolineato il dato critico relativo alla standardizzazione: per una corretta e profittevole valorizzazione delle biomasse però è essenziale procedere con un rapido trattamento conservativo ed estrattivo per evitare problematiche di standardizzazione di quantità e qualità degli estratti; 2) la pandemia Covid-19 ha determinato importanti difficoltà nel poter ottenere quantità di estratti utili ed efficaci alle ultime prove in campo (vedi sotto-azione 3.2)

➤ **Valorizzazione fitosanitaria (sotto-azione 3.2)**

Questa sotto-azione si è articolata in 3 attività finalizzate ad individuare almeno un estratto arricchito/biomolecola attiva in laboratorio verso almeno un ceppo batterico o fungino con una concentrazione efficace non superiore a 20mg/ml ed almeno un estratto arricchito/biomolecola attiva come insetticida complessivo in semi campo verso almeno uno dei fitofagi con una efficacia non inferiore al 40%.

Di seguito una sintesi delle attività e dei principali risultati ottenuti in termini di innovatività di processo e di prodotto.

Attività di laboratorio relativa al controllo di fitopatogeni (batteri e funghi) e fitofagi fruttiferi e delle orticole utilizzando i prodotti della sotto-azione 3.1 (3.2.1)

Valutazioni di laboratorio di attività biostatiche e/o biocide (3.2.1.1): La prova relativa alle valutazioni di laboratorio (*in vitro*) di attività biostatiche e/o biocide degli estratti prodotti verso i ceppi fitopatogeni dei ceppi batterici e fungini non ha fatto emergere risultati compatibili con l'indicatore atteso (almeno un estratto arricchito/biomolecola attiva in laboratorio verso almeno un ceppo batterico o fungino con una concentrazione efficace non superiore a 20mg/ml). I valori ottenuti, benché molto lontani dall'obiettivo sono stati comunque riportati come elemento qualificante l'ampio range di concentrazione utilizzato e dunque del lavoro prodotto per cercare di ottenere un risultato compatibile con il raggiungimento dell'indicatore atteso. Il dato negativo può essere dovuto alla componente zuccherina che, caratterizzandosi come fattore di stimolo metabolico in quanto fonte energetica suppletiva rispetto a quanto presente di default nel terreno di coltura, potrebbe mascherare l'eventuale attività antimicrobica della frazione polifenolica. L'eliminazione della componente zuccherina dagli estratti, ipotizzata nella relazione a breve termine) non risulterebbe profittevole ai fini della sostenibilità di progetto poiché comporterebbe da un lato l'impoverimento significativo della frazione polifenolica e, dall'altro, la necessità comunque di una implementazione strumentale - e quindi un onere economicamente importante specie se a livello industriale - ed un non banale incremento della complessità dell'intero processo. In ogni caso, anche con l'impiego di estratti privati della frazione zuccherina, non si sono registrati miglioramenti tali da identificarsi con l'indicatore di risultato.

In relazione a queste evidenze, si è ritenuto coerente, ai fini della prosecuzione efficace del progetto, procedere comunque con le prove in semi campo concentrando però gli sforzi verso la valutazione di una possibile attività anti-fitofago o fitofago-repellente (prova 3.2.1.2: prove olfattometriche; prova 3.2.1.3. Prove in laboratorio di elettropenetragrafia).

Prove olfattometriche (3.2.1.2): Dai risultati ottenuti rispetto alle risposte comportamentali di *D. suzukii*, con particolare riferimento alle 2 differenti dosi di estratto utilizzato, si evince una significativa repellenza dell'insetto quando esposto alle dosi di 1% nel braccio insieme allo stimolo attrattivo. Nessuna repellenza sostanziale è stata invece mostrata a dosi inferiori (0,1%). Per quanto riguarda invece analoghe prove effettuate su *Cacopsylla pyri* degli estratti di raspi d'uva da filiera vitivinicola, si è riscontrata una significativa repellenza dell'insetto, in particolare quando esposto alla concentrazione dell'1% nel braccio insieme allo stimolo attrattivo.

Prove in laboratorio di elettropenetragrafia (3.2.1.3): Le prove di elettropenetragrafia svolte con diversi estratti forniti dall'industria vitivinicola, tra cui vari tipi di vinacce e raspi, distribuiti su piante di pero non hanno messo in evidenza sostanziali effetti *antifeeding* sulla Psilla del pero.

Dati comunque i risultati tendenzialmente confortanti rispetto alle prove olfattometriche, si è proceduto con le attività di semi campo sul contenimento di fitopatogeni e fitofagi (attività 3.2.2. Attività di semi campo per la valutazione sul contenimento di fitopatogeni e fitofagi).

Attività di semi campo per la valutazione sul contenimento di fitopatogeni e fitofagi (3.2.2)

Prove su fitopatogeni (3.2.2.1): La concentrazione dell'1% di estratti di raspi ha dimostrato una elevata mortalità diretta sugli adulti di *D. suzukii* in condizioni di semi campo (Torre di Potter), condizione che suggerisce di proseguire lo studio con prove direttamente in campo.

Prove su fitofagi (3.2.2.2): Analogamente alla prova precedente la concentrazione dell'1% di estratti di raspi ha dimostrato una elevata mortalità diretta sugli adulti di *D. suzukii* in condizioni di semi campo (Torre di Potter), condizione che suggerisce di proseguire lo studio con prove direttamente in campo.

Attività di campo relativa al controllo di fitopatogeni (batteri e funghi) e di fitofagi dei fruttiferi e delle orticole (3.2.3)

Prove di campo per valutare l'attività anticrittogamica e/o insetticida (3.2.3.1): L'estratto ha evidenziato un'alta efficacia (69%). Tuttavia la bassa infestazione (13 % dei frutti colpiti nel testimone) e le differenze di attacco rilevate nelle diverse repliche non hanno consentito di ottenere dati statisticamente significativi.

Nella prova 2 in presenza di un importante attacco di *Drosophila* (60% dei frutti colpiti nel testimone) l'estratto ha evidenziato una bassa efficacia (25%). La variabilità di campo non ha consentito di differenziare tra loro le diverse tesi.

La prova 3 con un attacco elevato del fitofago (85% dei frutti sintomatici nel non trattato) è risultata statisticamente significativa: lo standard di riferimento (spinosad) si è statisticamente differenziato dalle altre tesi mentre l'estratto ha evidenziato un'efficacia nulla con valori analoghi a quelli del testimone.

In conclusione, nonostante siano stati saggiati tutti gli estratti selezionati dalla sotto-azione 3.1 sui ceppi batterici e fungini previsti dal progetto, nessun risultato ha permesso di raggiungere l'indicatore di risultato per questo attività. Per questo motivo ci si è concentrati sulla valutazione di attività di estratti su fitofagi sia in laboratorio sia in semi campo. Queste hanno permesso di individuare come solamente l'estratto di raspi all'1% manifesti una potenziale attività nel contenimento del moscerino dei piccoli frutti mentre non ha evidenziato effetti degni di essere presi in considerazione in prove seguenti nel controllo di fitofagi (Psilla del pero, Tingide del pero, Cimice asiatica) e dei fitopatogeni. Gli altri estratti analizzati nei test preliminari non hanno mostrato attività degna di nota per lo sviluppo successivo. L'estratto di raspi alla concentrazione 1% (meno efficace quella allo 0,1%) che in semi campo (una condizione meno estrema rispetto al pieno campo) forniva una mortalità del 100% sugli individui di *Drosophila suzukii* dopo 48 ore dall'esposizione. Questo promettente risultato può essere il punto di partenza per la sperimentazione in pieno campo.

Per quanto attiene appunto alle sperimentazioni in campo, l'estratto di polifenoli da raspi ha evidenziato risultati altalenanti: promettenti nella prima esperienza del 2018 su cv. Van dove ha raggiunto un'alta efficacia (69%) superiore a quella dello standard di riferimento, bassa efficacia (25%) nella seconda prova e assenza di efficacia nella terza esperienza. L'impressione è che con il crescere dell'infestazione in campo l'efficacia dell'estratto tenda a calare in maniera significativa. Un ulteriore aspetto non trascurabile è la riscontrata scarsa standardizzazione dei sottoprodotti in termini di contenuto di biomolecole attive nelle diverse annate. Il formulato alla dose impiegata è risultato selettivo sulla cultura e non si sono riscontrati problemi di fitotossicità. Un altro aspetto importante da sottolineare è l'unicità di ogni estratto: indipendentemente dal tipo di matrice impiegata (in questo caso raspi di uva della cv Sangiovese) e dalla modalità di estrazione scelta l'estratto che ne deriva è per composizione unico e irripetibile. Vista la bassa resa la produzione dell'estratto ha richiesto tempi molto lunghi che non hanno consentito di ottenere un quantitativo sufficiente per consentire di provare l'estratto in campo al dosaggio (1%) che nelle prove di laboratorio aveva fornito i migliori risultati. In questo senso, le limitazioni dovute alla pandemia Covid-19 hanno influito molto negativamente sugli aspetti operativi, in particolare quelli legati alle estrazioni per poter ottenere una quantità di estratto sufficiente ad ulteriori prove.

Infine, nonostante gli esiti non completamente soddisfacenti di tutta la sotto-azione non avendo raggiunto gli indicatori di risultato, l'esperienza relativa al comparto fitosanitario ha comunque dato feedback operativi interessanti e significativi. *Drosophila suzukii*, infatti, è un fitofago chiave nella difesa fitosanitaria del ciliegio; essa attacca i frutti quando si ammorbidiscono (iniziano a virare di colore) ed è quindi necessario eseguire trattamenti mirati nella fase che precede la raccolta con tutte le problematiche che questo comporta (tempi di carenza, residualità, ecc.). Nell'ambito della difesa fitosanitaria avere a disposizione un prodotto efficace e privo di tempi di carenza da potersi utilizzare pochi giorni prima della raccolta sarebbe strategico e fondamentale per:

- 1- Tutelare la salute del consumatore: allontanando il più possibile dalla raccolta l'impiego di prodotti chimici.
- 2- Sostituire almeno un trattamento chimico, riducendo gli effetti negativi dell'impiego di prodotti talvolta poco selettivi e comunque inquinanti. In Emilia Romagna la superficie complessiva impiantata a ciliegio è di circa 2000 ettari: considerando che mediamente per ogni applicazione vengono distribuiti 0,5 Kg di prodotto fitosanitario, si stima l'utilizzo di circa 10 ql di prodotto chimico all'anno solo per controllare tale avversità. La sostituzione di un'applicazione con l'impiego dell'estratto porterebbe a un dimezzamento di tale quantitativo.
- 3- Ridurre il pericolo per gli operatori agricoli.
- 4- Consentire di effettuare interventi mirati anche a ridosso della raccolta o fra uno stacco e il successivo.

➤ **Valorizzazione alimentare (nutraceutica, ingredientistica) (sotto-azione 3.3)**

Identificazione e quantificazione puntuale di classi chimiche presenti negli estratti per un loro successivo e mirato indirizzo in ambito nutraceutico e ingredientistico alimentare (3.3.1)

Valutazioni semi-quantitative e bio-autografiche di attività antiossidante (3.3.1.1): I campioni di estratti di vinaccioli (VIN) hanno espresso i risultati di maggior rilievo, sia per quanto riguarda l'estratto UAE che i sottoprodotti della distillazione (feccia ed acque aromatiche) corrispondendo con un valore di 0,55 mmol/trolox a quello atteso dall'indicatore. In particolare, l'estratto UAE EtOH 50% di vinaccioli è stato l'unico a raggiungere un valore di mmol/trolox coerente con quello dell'indicatore di un'attività antiossidante degna di nota considerata dal progetto (0,5 mmol trolox/g). L'attività rilevante degli estratti degli scarti della filiera vitivinicola ed oleifera era certamente attesa, ma questa valutazione ha messo in risalto anche dati interessanti provenienti dagli estratti UAE eseguiti con EtOH 50% su scarti di mele e pere. Per queste matrici di scarto, si è osservata una corrispondenza tra il contenuto di polifenoli e l'attività antiossidante espressa nel saggio spettrofotometrico, infatti a maggior quantità di polifenoli totali corrisponde un IC₅₀ minore, e quindi una attività maggiore. L'attività degli estratti UAE di mele, pere e sanse, infine, è risultata essere maggiore di quella delle acque aromatiche provenienti dalle stesse matrici, ma in linea con quella degli estratti di feccia di distillazione, forse a causa delle similitudini di composizione chimica tra i due fitocomplessi. Per quanto riguarda gli estratti di scarti da potature di uve lambrusco (foglie), la valutazione di attività antiossidante ha confermato la qualità dell'impostazione estrattiva determinata tramite DOE indicando nuovamente gli estratti 9, 10, 11, come quelli più performanti. L'analisi HP-TLC bioautografica ha invece confermato da un punto di vista qualitativo la valutazione emersa per l'attività antiossidante quantificata per via spettrofotometrica (IC₅₀ e mmol trolox/g). Le matrici di scarto leguminose non hanno mostrato un'attività antiossidante degna di nota, infatti nessun estratto ha raggiunto un IC₅₀ inferiore a 100 µg/ml. Da riportare che sia per gli scarti mix di fagioli che fagiolini, l'attività antiossidante, anche se bassa, è correlata con quantità di polifenoli (bassa anch'essa).

Determinazione della risposta ossidativa e valutazione dell'espressione genica di enzimi ad attività pro- ed anti-ossidante (3.3.2)

Valutazioni *in vitro* mediante differenti saggi con valenza complementare alla determinazione complessiva della capacità antiossidante (3.3.2.1): a conferma delle prove precedenti, gli estratti di vinaccioli (VIN) hanno espresso i risultati di maggior rilievo, raggiungendo l'indicatore di risultato. Gli estratti di vinaccioli esaminati nuovamente con diversi approcci dei saggi DPPH, ABTS e PCL (fotochemioluminescenza) con una miscela di solventi acqua-etanolo ed acqua acetone (50%) [la miscela acqua-acetone è stao un ulteriore approccio] si sono caratterizzati di una capacità antiossidante in linea con gli indicatori di risultato per la parte alimentare del progetto. Entrambe le tipologie di estratti con test ABTS e DPPH hanno evidenziato capacità antiossidante comparabile sebbene l'estratto acetone fosse sensibilmente superiore. Il test della fotochemioluminescenza (PCL), in particolare, mostra una capacità antiossidante identica e coerente con l'indicatore atteso sia per l'estratto etanolico al 50% sia per l'estratto acetone al 50%. Va però sottolineato che per la maggiore biocompatibilità di un prodotto ottenuto con solvente idroalcolico piuttosto che con solvente idroacetone, l'estratto con etanolo-acqua al 50% risulta oltremodo più adeguato ad un impiego in un contesto alimentare. I risultati ottenuti, pur con approcci differenti, sono totalmente in linea con i risultati emersi dalle prove precedenti (*Valutazioni semi-quantitative e bio-autografiche di attività antiossidante*) confermando ulteriormente il raggiungimento dell'indicatore di risultato per questa sotto-azione (3.3).

Individuazione di molecole utili all'ingredientistica alimentare (3.3.3)

Saggi shelf-life rispetto alla capacità biostatica e biocida (3.3.3.1): Si sono ottenuti risultati interessanti in termini di estrazione selettiva di classi di polifenoli a diversa capacità antiossidante. Una miscela acqua/etanolo ha la stessa capacità estrattiva di acqua pura verso flavonoidi, con la differenza che, mentre questi sono circa il 52% dei polifenoli totali estratti solo con acqua, essi rappresentano una frazione significativamente più piccola (circa 29%) dei polifenoli totali quando si utilizza la miscela acqua/etanolo. Tuttavia, sebbene la quantità assoluta estratta è simile, la capacità antiossidante è notevolmente maggiore per l'estratto idroalcolico, come supportato anche dai numerosi dati di letteratura. Quando si considera un altro solvente (etilacetato), si ottiene lo stesso rapporto tra flavonoidi e polifenoli totali (ca 50%), sebbene con un ridotto incremento in termini assoluti, mentre il potere antiossidante aumenta sensibilmente. Infine, quando la miscela estraente viene sostituita con acqua/acetone, si osserva un aumento assoluto sia di polifenoli totali che di flavonoidi, questi inoltre arrivano ad essere circa il 70% dei polifenoli totali, e la capacità antiossidante subisce un incremento notevole. Gli estratti di vinaccioli con miscela di solventi acqua-etanolo ed acqua acetone (50%) hanno dimostrato una capacità antiossidante in linea con gli

indicatori di risultato per la parte alimentare del progetto. Entrambe le tipologie di estratti con test ABTS e DPPH hanno evidenziato capacità antiossidante comparabile sebbene l'estratto acetone fosse sensibilmente superiore. Il test della fotochemiluminescenza (PCL), tuttavia, mostra una capacità antiossidante identica e coerente con l'indicatore atteso. Il fatto che il contenuto in polifenoli totali sia più elevato nell'estratto acetone evidenzia il fatto che nell'estratto idroalcolico vi siano anche altre molecole che concorrono all'attività antiossidante non estratte con la miscela acqua-acetone, dal momento che entrambi anno poi attività antiossidante comparabile (DPPH, ABTS test) o identica (PCL). Va però sottolineato che per la maggiore biocompatibilità di un prodotto ottenuto con solvente idroalcolico piuttosto che con solvente idroacetone, l'estratto con etanolo-acqua al 50% risulta oltremodo più adeguato ad un impiego in un contesto alimentare.

Attività in laboratorio per la valutazione di bioaccessibilità e biodisponibilità di componenti funzionali bioattivi (3.3.4)

Simulazione in laboratorio del processo digestivo (3.3.4.1): Le prove di bioaccessibilità hanno mostrato che le comuni molecole polifenoliche, oggetto anche di altre prove, sono altamente bioaccessibili partendo da matrici liofilizzate come le vinacce rosse, tuttavia questi composti vengono altrettanto rapidamente degradati durante le fasi digestive gastrica e duodenale.

L'osservazione della capacità antiossidante dei fluidi simulati durante queste fasi mostra che l'ultima fase, quella duodenale conserva circa un quarto del potere antiossidante della matrice di partenza, anche se non sappiamo con precisione a quali molecole questo possa essere imputato.

L'impiego alimentare (integratore o ingredientistico) delle vinacce ha dimostrato come la frazione di fibre non digeribili, a cui sono covalentemente legati anche numerosi composti polifenolici, è in grado di produrre un significativo metabolismo a livello intestinale con modulazione del biota presente nel colon. Si può prevedere che una alimentazione continua, piuttosto che a somministrazione singola, sia in grado di produrre risultati migliori di quelli osservati.

Biodisponibilità di fitocomposti bioattivi, prove in laboratorio (3.3.4.2): Nell'attività antiossidante osservata e nei suoi effetti biologici giocano un ruolo predominante metaboliti a peso molecolare non elevato generati dalla digestione o dall'assorbimento epiteliale e derivanti dai polifenoli presenti nell'estratto di vinacce: si tratta di acidi fenolici già presenti nell'estratto o di derivati metabolici di molecole più complesse (esteri degli acidi fenolici ad esempio). Importante resta comunque l'effetto antiossidante locale, con riduzione dello stress ossidativo sulla membrana epiteliale intestinale, con positive ripercussioni sull'abbassamento del rischio di sviluppo di patologie cronico-degenerative intestinali e sul benessere di tutto l'apparato intestinale e del microbiota in esso presente.

Valutazione di sistemi di incapsulamento (3.3.4.3): La progettazione di sistemi di incapsulamento o di formulazione per usi cosmetici o alimentari in grado di includere molecole antiossidanti ha lo scopo di veicolare al meglio queste molecole oppure che queste siano maggiormente stabili, così da poter assolvere anche a funzioni di conservazione del prodotto o di altri principi attivi. Le prove svolte hanno evidenziato che idrogel con formulazioni diverse (volte a migliorare l'interazione con gli strati di epidermide/tessuti/mucose) sono in grado di incrementare la migrazione (flusso) di acido caffeico dal gel attraverso la pelle epidermide/tessuti/mucose rispetto ad una semplice soluzione acquosa. Tuttavia la formulazione di acido caffeico nel gel non ha mostrato un miglioramento in termini di stabilità del composto, che subisce rapida degradazione fino a circa 30 giorni a tutte le temperature e in modo analogo a quanto subisce in soluzione acquosa.

In conclusione, le attività di questa sotto-azione hanno permesso di individuare nell'estratto idroalcolico al 50% di vinaccioli condizioni di composizione e di attività antiossidante del tutto compatibili con l'impiego in ambito ingredientistico e nutraceutico per l'importante bioattività affrontata con i comuni antiossidanti di sintesi (trolox). Le qualità dell'estratto, anche in relazione alle prove di formulazione lasciano anche ipotizzare un efficace uso nel contesto della cosmesi naturale. Con l'estratto idroalcolico di vinaccioli al 50% si è quindi pienamente raggiunto l'indicatore di risultato previsto per questa sotto-azione.

➤ Valorizzazione energetica (sotto-azione 3.4)

Valutazione delle proprietà delle biomasse residue dalle estrazioni operate nella sottoazione 3.1 (3.4.1)

Proximate analysis (3.4.1.1): Essendo il Valore Calorifico Totale comparabile a quello di altre biomasse utilizzate per alimentare impianti per la produzione di energia, è possibile concludere che le biomasse (fecce di estrazione) delle matrici più performanti in termini di ricaduta di progetto possano essere a loro volta

ugualmente utilizzate per la profittevole produzione di energia. Infine, la proximate analysis è risultata essere un metodo efficiente per la determinazione delle percentuali di massa di umidità, ceneri, sostanze volatili e carbonio fisso, utili a comprendere il possibile impiego delle biomasse per la produzione di energia, ottenute da una serie di test standardizzati applicate alle matrici di scarto oggetto del progetto. La proximate analysis qui riportata rappresenta quindi un semplice, versatile ed efficace protocollo da adottare a livello aziendale per la caratterizzazione completa e mirata dei residui di estrazione per la loro valorizzazione energetica che non richiede inoltre particolari competenze specifiche né tantomeno apparecchiature sofisticate e costose, poiché ci si basa su dati che derivano da pesate della matrice della matrice sottoposta a diversi passaggi di riscaldamento e riscaldamento ossidativo.

Valutazione del possibile impiego delle biomasse residue per biocarburanti (3.4.2)

Resistenza della biomassa alla degradazione biologica (3.4.2.1): Se si considera una resa media della fermentazione del 91% [L. Favaro et al., *Biotechnol. Biofuels* 2013, 6, 168] si può dedurre che da 1 tonnellata di vinacce bianche si potrebbero produrre più di 500 L di etanolo e 300 L dalle vinacce rosse. Sono valori paragonabili a quelli che si ottengono da altri scarti della filiera agroalimentare come paglia di riso, orzo, frumento, bagasse di canna da zucchero, ecc. [K.R. Corbin et al., *Biores. Technol.* 2015, 193, 76-83] confermando ulteriormente quanto emerso con la proximate analysis ovvero che le biomasse utilizzate possono essere impiegate per la produzione di energia, in questo senso esprimibile in relazione alla considerazione delle biomasse di BIOFACE come fonte di biocombustibili (bio-etanolo).

In conclusione, quanto emerso da questa sotto-azione è che le matrici di scarto che sono risultate più promettenti per una produttiva valorizzazione energetica sono risultate le vinacce. Questo è però valido soltanto se si utilizzano le vinacce vergini, mentre quelle che hanno subito i processi estrattivi implementati nella sottoazione 3.1 risultano depauperate di una buona parte della massa fermentabile e possiedono una biomassa più recalcitrante che necessita di trattamenti chimici, termici ed enzimatici per la saccharificazione con un aggravio di spesa che ne sconsiglia l'impiego come feedstock per la bioraffineria (produzione di biocombustibili).

Dal Valore Calorifico Totale emerso con la proximate analysis, unitamente ai risultati relativi alla resistenza alla degradazione biologica della biomassa, è possibile concludere che le biomasse delle matrici più performanti in termini di ricaduta energetica possano essere a loro volta ugualmente utilizzate per la profittevole la produzione di energia. La proximate analysis qui riportata rappresenta quindi un valido protocollo da adottare a livello aziendale per la caratterizzazione completa e mirata dei residui di estrazione per la loro valorizzazione energetica e la sua messa a punto qui espressa si identifica con il raggiungimento dell'indicatore di risultato per le ricadute nel comparto energetico, identificandosi come indicatore di risultato raggiunto. Come da indicatore di risultato atteso, la proximate analysis è un protocollo semplice, efficiente e ottimizzato da adottare a livello aziendale per la caratterizzazione completa e mirata dei residui di estrazione per la loro valorizzazione energetica.

A commento conclusivo e sintetico dell'intero progetto, va sottolineato che i protocolli estrattivi, di valorizzazione fitosanitaria, alimentare ed energetica sono stati messi a punto per le matrici di scarto studiate e rappresentano un valido e ottimizzato modello di processo per ottenere a livello aziendale estratti/biomolecole efficaci ed esportabili anche in altri contesti oltre a quelli considerati in BIOFACE, come ad esempio quello della cosmesi naturale, evidenziato dalla sotto-azione 3.3. L'estrazione UAE rappresenta il più valido ed economico compromesso ai processi estrattivi con il minimo impiego di solventi organici oltre all'acqua e garantisce per molte matrici complessivamente una resa in linea con gli indicatori di risultato. Per tutti questi aspetti, il progetto BIOFACE raggiunge anche l'indicatore di risultato relativo al modello di processo.

➤ Valorizzazione economica (sotto-azione 3.5)

L'attività di valutazione economica ha riguardato inizialmente un'analisi di contesto, finalizzata ad indagare le principali caratteristiche del settore, in termini di disponibilità del prodotto, prezzi di vendita, canali distributivi e competitor del settore.

Successivamente è stato realizzato uno studio di fattibilità di carattere econometrico, allo scopo di descrivere le performance economiche di un eventuale impianto di estrazione.

In ultimo, tutte le risultanze ottenute, sono state riassunte in una swat analysis, allo scopo di effettuare una valutazione complessiva della convenienza connessa all'implementazione di una struttura di estrazione. In sintesi, considerando le stime sui volumi di scarti vegetali disponibili e vista l'evoluzione del comparto della nutraceutica, investimenti su impianti di estrazione anche di dimensioni modeste, che possano godere di un sistema di approvvigionamento regionale e/o locale, basato su collaborazioni stabili, potrebbe

rappresentare una valida opportunità. Vanno pur considerate le variabili redditività, valorizzazione degli scarti e difficoltà di approvvigionamento nella individuazione di un valido risultato.

RICADUTE IN AMBITO PRODUTTIVO, TERRITORIALE ED AMBIENTALE

Ricadute in ambito produttivo:

Le ricadute in ambito produttivo per il sistema regionale derivanti dal progetto contribuiscono a promuovere una nuova consapevolezza sociale della prevenzione dello spreco alimentare e del riutilizzo profittevole. Nello specifico del progetto BIOFACE, esse riguardano soprattutto la messa a punto di un protocollo operativo di estrazione dalle matrici di scarto, efficiente, sostenibile dal punto di vista ambientale e dal costo di avvio relativamente contenuto.

Un estrattore ad ultrasuoni di capienza media di 50 litri e che sarebbe in grado di lavorare mediamente 20 kg ad ogni ciclo di estrazione infatti ha un costo che può variare tra i 20000 ed i 30000 euro e la sua gestione annuale può richiedere in termini di consumo energetico e di solvente un costo variabile tra 500 e 1000 euro. A questo andrebbe accoppiato un liofilizzatore dal costo variabile dai 15000 ai 20000 euro con un costo di gestione annuale variabile tra i 400 e 600 euro. L'importo di un investimento iniziale si aggirerebbe dunque, per una piccola azienda, attorno ai 50000 euro. Le rese ottenute da alcune matrici nel progetto variavano per le più performanti dal 20% al 40%, quindi per taluni scarti il processo è altamente efficiente. L'estratto di vinaccioli, risultato più promettente per il comparto alimentare come emerso dal progetto, seppur tra gli scarti con una resa vicina al 10% - quindi non tra le più elevate - ma con un'eccellente proprietà antiossidante in linea con i prodotti di mercato efficaci, può fornire 1kg di estratto ogni 10kg di scarto. Tenendo conto di un estrattore industriale che può lavorare circa 20 kg di vinaccioli per estrazione, si possono ottenere 2kg di estratto utile ad ogni ciclo estrattivo. Tenendo poi conto che una confezione di prodotto nutraceutico incapsulato può contenere circa 15 g di estratto attivo, per ogni ciclo di estrazione della durata possono essere prodotte circa 130 confezioni utilizzando il modello di processo messo a punto con BIOFACE.

Come emerso dal progetto BIOFACE, il comparto produttivo che verrebbe penetrato dalle aziende che volessero implementare la loro filiera agroalimentare sarebbe innanzitutto quello dell'ingredienteistica e dell'integrazione alimentare che in media sta registrando a livello nazionale un trend di crescita del 4,5% annuo, tenendo conto del solo canale Farmacia (a cui però andrebbe aggiunto l'incremento nella grande distribuzione) ai vertici europei, con un fatturato che per il 2019 ha sfiorato i 5 miliardi di euro. A livello regionale Emilia Romagna, Lombardia e Lazio assorbono quasi il 30% del mercato nazionale. I dati Eurisko riportano che il consumo medio pro-capite di prodotti di integrazione alimentare in Italia è di circa 2,5 confezioni a persona con una spesa media di 41 euro. Il dato italiano è il più alto d'Europa a cui segue quello di Austria, Belgio e Germania. Si tratta quindi di un settore in forte e costante crescita, soprattutto a livello regionale e che trova quindi rispetto alle opportunità di produzione profittevole certamente un terreno fertile, innanzitutto nella nostra regione come dimostrato dai dati di mercato.

Dal progetto BIOFACE è inoltre emerso che lo stesso tipo di estratti può risultare utile anche per il comparto della cosmesi naturale. Da uno studio effettuato da Cosmetica Italia, l'Associazione Nazionale Imprese Cosmetiche, il comparto della cosmesi naturale costituisce in Italia il 10% del mercato cosmetico con un fatturato che si aggira attorno al miliardo di euro. Il trend però è in costante ascesa tanto che gli ultimi prodotti lanciati sul mercato, il 50% era caratterizzato da cosmesi naturale. Questi aspetti sottolineano come, in relazione ai risultati emersi con BIOFACE, vi siano ampi e sostenibili margini profittevoli nell'affiancamento di processi virtuosi di produzione alle tradizionali filiere agro-alimentari.

I risultati del progetto, quindi, rimarcano come l'estensione della filiera possa rivelarsi un fattore premiante per l'azienda in grado di sostenere innanzitutto le spese di avvio, perché consentirebbe di incrementarne la competitività e la penetrazione in nuovi settori di mercato come quello dell'integrazione e della cosmesi, ammortizzando in tempi relativamente brevi i relativamente modesti costi iniziali ed incrementando così le entrate. Certamente il fattore limitante per un'azienda è la possibilità di poter investire capitale iniziale per implementare la propria produzione con processi virtuosi come quello evidenziato da BIOFACE ma la governance della regione Emilia Romagna, lo Stato italiano e finanche taluni gruppi bancari mettono a disposizione delle aziende diverse facilities per l'innovazione e lo sviluppo, e l'incremento di competitività che deriverebbe da una diversificazione di mercato dei prodotti. Queste facilities sono poi ulteriormente favorevoli per le iniziative di sviluppo aziendale indirizzate alla circolarità delle produzioni, come quello strutturato nel progetto BIOFACE, limitando gli impatti a favore della sostenibilità nella sua accezione più ampia, incrementando la competitività.

Come emerge da un recente studio della Regione Emilia Romagna (Accelerare la transizione verso l'economia circolare in Emilia Romagna, ART-ER, marzo 2020) è oltremodo importante stimolare la promozione di una nuova consapevolezza sociale della prevenzione dello spreco alimentare e del riutilizzo profittevole. Stimolare la spesa privata in Ricerca e Sviluppo per innovare processi e prodotti e garantire la competitività futura delle imprese. Favorire l'investimento in attività di Ricerca e Sviluppo – la ricerca in eco innovazione rappresenta il fulcro della transizione a un'economia circolare sia nel mondo dei rifiuti/nuove risorse sia nel mondo dell'energia e dell'efficiamento produttivo, nel manifatturiero come nel settore dell'agro alimentare. Favorire lo sviluppo dell'ecosistema nazionale dell'imprenditoria innovativa – e l'ecosistema imprenditoriale italiano deve essere supportato nel tutelare l'ecosistema "naturale e territoriale" da cui deriva la propria ricchezza (basti pensare all'artigianato o all'agro-alimentare). Il protocollo gestionale delle risorse derivate dalla produzione di estratti per la valorizzazione energetica favorisce oltremodo lo sviluppo della produzione anche in questo senso, favorendo così anche la riduzione dei costi di gestione energetica dei nuovi processi. I risultati innovativi emersi dal progetto BIOFACE infine possono essere di incentivo allo sviluppo di nuove realtà imprenditoriali.

A completamento di quanto sopra descritto si cita che il partner del GOI Caviro sta intraprendendo questo percorso di investimenti in estrattori in grado di recuperare parte dei propri scarti agroindustriali, cogliendo utilità dai risultati emersi dal progetto BIOFACE e attività preliminari precedentemente svolte.

Ricadute in ambito territoriale:

Le ricadute del progetto BIOFACE sul territorio riguardano innanzitutto la promozione della consapevolezza che la riduzione dello spreco lungo la filiera agro-alimentare determina ricadute economiche, sull'occupazione, sulla salute dei cittadini. Quelle economiche si possono sintetizzare innanzitutto sul piano dell'incremento della competitività delle linee produttive. Le ricadute economiche si determinano in relazione all'adozione di processi virtuosi di produzione come quello emerso e dimostrato da BIOFACE, come peraltro sottolineato nella sezione dedicata alle ricadute produttive. Le ricadute sull'occupazione si determinano in ragione della necessità di personale specializzato opportunamente formato per la gestione delle nuove linee di produzione. Il tessuto aziendale regionale si caratterizza infatti anche di piccole realtà, spesso a gestione familiare, che possono aderire alle spinte di innovazione derivate dal progetto, anche per piccoli passi, creando sul territorio opportunità occupazionali. Le ricadute sulla salute dei consumatori e dei luoghi di lavoro si determinano a partire dall'adozione di pratiche a basso impatto ambientale come quelle sviluppate nel progetto BIOFACE, ottenendo prodotti con un più ridotto utilizzo di solventi organici ed attraverso l'impiego di prodotti fitosanitari più biocompatibili. In questo senso il progetto BIOFACE pur non raggiungendo gli obiettivi sperati dà comunque una linea di indirizzo importante per ulteriori sviluppi, in particolare verso la bio-repellenza. Impiegare di prodotti fitosanitari con un più ridotto impatto ambientale significa infine ottenere prodotti con un ridotto contenuto di residui agrochimici a beneficio della salubrità del prodotto e del consumatore.

Ricadute in ambito ambientale:

Le ricadute del progetto BIOFACE sono trasversali a quelle produttive, territoriali e sociali quindi è inevitabile il richiamo ad aspetti già sottolineati per questi settori. Tuttavia è utile sottolineare, senza riprendere concetti con ricadute ambientali dirette ed indirette già sottolineati nelle precedenti sezioni, che il progetto BIOFACE fa emergere la possibilità di adottare azioni di rilievo dal punto di vista della riduzione dell'impatto antropico sull'ambiente e quindi sul miglioramento qualitativo di suolo ed acqua, soprattutto attraverso la messa a punto di un processo estrattivo eco-compatibile. L'adozione di processi virtuosi come quello proposto da BIOFACE determina un impatto positivo sulla qualità di suolo ed acqua anche attraverso la promozione di linee di indirizzo per più efficaci sviluppi verso la produzione di bio-repellenti, riducendo la produzione ed accumulo di agro-farmaci a beneficio della qualità dei suoli e delle falde acquifere. È quindi evidente che le ricadute positive sull'ambiente ricadono inevitabilmente sulla salubrità dei prodotti e sulla salute dei cittadini. Le ricadute sull'ambiente derivanti dall'adozione di pratiche di processo come quelle ottimizzate in BIOFACE riguardano anche l'importanza di preservare la biodiversità e la ricchezza naturalistica della regione, ricchezza peraltro attrattiva turisticamente, promuovendone la conservazione e lo sfruttamento sostenibile. Le ricadute del progetto BIOFACE riguardano anche la qualità dell'aria: l'adozione infatti di protocolli di gestione energetica degli scarti di lavorazione come quello messo a punto per la dettagliata caratterizzazione delle biomasse residue permette un loro più mirato sfruttamento energetico con la possibilità di ridurre l'emissione di inquinanti ambientali come i gas serra.

Relativamente alla risposta alle sfide previste come prioritarie dal bando e nella specifica Focus Area 5C, è possibile concludere che, in quadro complessivo di osservazione, il progetto BIOFACE vi abbia risposto, sebbene non nel pieno degli obiettivi previsti.

In merito al comparto fitosanitario, era prevista l'applicazione di tecnologie e strategie in grado di individuare estratti ricavati da sottoprodotti della lavorazione agro-alimentare e agricola da impiegare come strumento per la difesa da fitopatogeni e da insetti dannosi (fitofagi) di difficile contenimento che hanno come bersaglio colture di rilevante interesse e diffusione regionale (aspetto agronomico/fitosanitario). Nell'ambito della difesa fitosanitaria avere infatti a disposizione un prodotto efficace e privo di tempi di carenza da potersi utilizzare pochi giorni prima della raccolta sarebbe strategico e fondamentale innanzitutto per tutelare la salute del consumatore, allontanando il più possibile dalla raccolta l'impiego di prodotti chimici come già evidenziato nelle ricadute nell'ambito sociale, ambientale e territoriale. Altra importante ricaduta è costituita dalla riduzione del pericolo per gli operatori agricoli che si troverebbero ad utilizzare un prodotto con alte qualifiche di biocompatibilità per l'uomo, consentendo inoltre interventi mirati anche a ridosso della raccolta o fra uno stacco e il successivo, dal momento che i prodotti anche se accumulati non costituirebbero un pericolo per il consumatore. Anche solo riuscire a sostituire almeno un trattamento chimico tra quelli complessivamente previsti ridurrebbe gli effetti negativi dell'impiego di prodotti talvolta poco selettivi e comunque inquinanti. Con il progetto BIOFACE si è cercato di individuare tra le matrici di scarto quella che potesse garantire una resa di estratto ed un'efficacia fitosanitaria in grado di determinare tutte queste ricadute. Tutti gli estratti ottenuti non hanno evidenziato *in vitro* l'attività biocida/biostatica sperata, tuttavia prove di repellenza in laboratorio ed in campo hanno dato risultati incoraggianti, in particolare verso *Drosophila suzukii*. Le matrici di scarto che hanno fornito l'estratto che ha manifestato tale attività repellente erano le vinacce rosse, sulle quali è stato ottimizzato un processo di estrazione ad alta efficienza e sostenibilità ambientale (UAE, con basso contenuto di solvente organico, al 50%) in grado di permettere una resa del 25%, ovvero da 1 solo kg di vinacce rosse è possibile ottenere 250 g di prodotto. Nel progetto BIOFACE, dopo le prove incoraggianti di laboratorio si è appunto passati in campo dove, su piante di ciliegio prese come riferimento, le prime prove hanno confermato il dato incoraggiante di repellenza sul fitopatogeno *Drosophila suzukii*. In Emilia Romagna la superficie complessiva impiantata a ciliegio è di circa 2000 ettari: considerando che mediamente per ogni applicazione vengono distribuiti 0,5 Kg di prodotto fitosanitario, si stima l'utilizzo di circa 10 ql di prodotto chimico all'anno solo per controllare tale avversità. La sostituzione di un'applicazione con l'impiego dell'estratto porterebbe a un dimezzamento di tale quantitativo. Partendo da questi aspetti quantitativi e pratici, ovvero dalla quantità totale di agrochimici/anno per trattare le superfici a ciliegio, con il processo estrattivo messo a punto in BIOFACE sulle vinacce rosse, 10ql di estratto possono essere ottenuti processando 40ql di matrice vitivinicola di scarto, ampiamente alla portata di possibili fornitori, come lo è stato Caviro per il progetto. Ipotizzando di poter lavorare con un estrattore UAE di piccola/media portata, ovvero da 50 litri complessivi ed in grado di processare 20 kg di vinacce rosse di scarto ad ogni procedimento estrattivo, occorrerebbero 200 processi di estrazione per ottenere i 10ql di prodotto che servirebbero al trattamento annuale di allevamenti di ciliegio per l'intera regione. Tale numero di processi verrebbe dimezzato se, in tutta la RER ci fossero anche solo 2 di tali piccoli/medi impianti. Dal momento che il dato si riferisce all'intera necessità quantitativa di trattamento/anno, non ancora applicabile in ragione dei ridotti benché incoraggianti risultati sulla repellenza e quindi l'agro-farmaco è ancora il prodotto di elezione, è evidente che se ci fosse la sostituzione anche di un'applicazione con l'impiego dell'estratto biocompatibile ciò porterebbe a una importante riduzione del quantitativo di agente fitosanitario di sintesi, con evidenti e già sottolineati benefici e ricadute. La stima sulla riduzione possibile emersa dalle valutazioni di ASTRA, partner di progetto per le prove in campo, potrebbe raggiungere anche il 50%. Come premesso, gli sforzi prodigati nel progetto BIOFACE non hanno però prodotto l'esito totalmente soddisfacente come previsto, innanzitutto per la scarsa standardizzazione delle matrici di scarto che, ad annate differenti hanno dato rese discordanti che dunque hanno inciso sulle rese di estrazione in modo significativo (rese anche 20 volte inferiori). Tale aspetto critico, sottolineato nella sezione 3 della presente relazione tecnica è quasi certamente dovuto al differente grado di esaurimento delle vinacce rispetto ai diversi processi di spremitura e distillazione subiti in azienda prima dalla loro fornitura come scarto. A tale aspetto, agevolmente superabile con l'individuazione dello step di lavorazione aziendale più adeguato a fornire matrici di scarto non totalmente esaurite, si sono aggiunte le restrizioni dovute alla pandemia Covid-19 che hanno fortemente limitato la potenzialità estrattiva dei laboratori di UNIFE limitando il numero di prove di repellenza in campo che avrebbero potuto consolidare i dati incoraggianti. Per concludere, il progetto BIOFACE ha fornito rispetto alle sfide fitosanitarie della focus area 5C risultati di grande interesse degni di essere approfonditi e sviluppati, con specifico riferimento alla repellenza verso *Drosophila suzukii* di estratti da matrici di scarto da vinacce rosse, con concrete e fattibili opportunità di ricaduta produttiva con costi iniziali di investimento relativamente contenuti (vedi sezione sulle ricadute in ambito produttivo).

Im merito alle sfide previste dalla focus area 5C, il progetto BIOFACE ha prodotto esiti del tutto corrispondenti agli indicatori attesi. Da progetto era previsto infatti 1) lo sviluppo di tecniche estrattive a maggiore efficienza per l'ottenimento di estratti e per l'isolamento di biomolecole note e di nuova definizione ad attività antiossidante; 2) l'ottenimento di estratti arricchiti per l'aggiunta delle biomolecole che ne

incrementano l'efficacia e l'appetibilità di mercato; 3) lo sviluppo di strategie applicative in contesti di filiera (es. 4° gamma) per migliorare la *shelf-life* dei prodotti agroalimentari. Per quanto attiene allo sviluppo lo sviluppo di tecniche estrattive a maggiore efficienza per l'ottenimento di estratti caratterizzati da un profilo chimico in grado di sviluppare una profittevole attività antiossidante, con il progetto BIOFACE si è messo a punto un processo ad alta efficienza che ha permesso di individuare nei vinaccioli da vinacce rosse di scarto la possibilità di ottenere estratti con l'efficienza antiossidante ricercata e corrispondente all'indicatore atteso. Nonostante i vinaccioli non presentassero livelli di resa estrattiva tra i più alti (10% contro il 25% dalle vinacce rosse o il 40% - il più alto - da scarti di mele), l'efficienza estrattiva del processo UAE messo a punto sulle diverse matrici permette di ottenere ad esempio 1kg di estratto ogni 10kg di scarto (vinaccioli). Considerando sempre un estrattore UAE di piccole/medie capacità (50 litri), da 20 kg di vinaccioli si possono ottenere 2kg di estratto utile ad ogni ciclo estrattivo. Le quantità necessarie al comparto nutraceutico sono molto più ridotte rispetto al comparto fitosanitario. Tenendo conto che in media una confezione di prodotto nutraceutico incapsulato può contenere circa 15 g di estratto attivo, per ogni ciclo di estrazione della durata di 80 min. si possono essere prodotte circa 130 confezioni utilizzando il modello di processo messo a punto con BIOFACE. Stimando una produzione annua di 20000 confezioni/anno di prodotto con attività antiossidante a base di estratto da scarti di vinaccioli, sarebbero necessari 300 kg di estratto utile, ottenibili estraendo 30ql di vinaccioli. Come per l'efficienza estrattiva stimata per il comparto fitosanitario, ipotizzando anche solo 1 estrattore UAE in RER da 50 litri di capienza in grado di processare 20kg di vinaccioli per volta, occorrerebbero 150 cicli estrattivi per ottenere il risultato voluto per la produzione di 1 anno. Questo dato, altamente sostenibile in termini di produzione di scarti vitivinicoli regionali, lo è anche per quanto attiene la produzione di estratto efficace date le stime di costo iniziale e gestionale relativamente contenute dell'impianto, come riportato nella sezione dedicata alle ricadute produttive. Il mercato della nutraceutica oggi è altamente proiettato verso la sostenibilità dei processi, così come dei prodotti dato che i consumatori sono sempre più sensibili alle ricadute poliedriche che il prodotto acquistato può determinare. Il processo ed il prodotto di BIOFACE per il comparto alimentare e nutraceutico aderiscono pienamente alle sensibilità del mercato attuale degli integratori alimentari, tra i più trainanti per trend di crescita (vedi la sezione Ricadute in ambito produttivo), rispondendo perciò in modo significativamente positivo alla seconda ulteriore sfida, ovvero l'ottenimento di estratti arricchiti per l'aggiunta delle biomolecole che ne incrementano l'efficacia e l'appetibilità di mercato. Analoghe considerazioni per relative allo sviluppo di strategie applicative per migliorare la *shelf-life* dei prodotti agroalimentari dal momento che l'estratto di vinaccioli ha anche manifestato una modesta ma evidente attività anti-proliferativa verso funghi che si sviluppano sugli alimenti. Questo risultato, se anche non giustifica appieno la totale sostituzione di conservanti di sintesi, permette senz'altro l'impiego in loro associazione, limitandone la quantità normalmente utilizzata a beneficio della salute dei consumatori. L'associazione dell'estratto di vinaccioli compenserebbe in termini di efficacia la riduzione di impiego di conservanti di sintesi, mantenendo la *shelf-life* del prodotto. Dal progetto BIOFACE è anche emersa la possibilità di estendere la diversificazione di mercato dell'estratto di vinaccioli alla cosmesi naturale, settore che segue al pari di quello dell'integrazione alimentare grande successo di mercato e di appetibilità del consumatore incrementando così la resa produttiva in termini di profitto per le aziende (vedi la sezione dedicata alle ricadute in ambito produttivo). Il processo e il prodotto messo a punto da BIOFACE, raggiungendo pienamente gli indicatori di risultato per il settore alimentare, dell'integrazione e dell'ingredientistica si identifica quindi come modello di successo per il progetto ma anche come modello di applicazione produttiva profittevole per la valorizzazione degli scarti agro-alimentari, nello specifico i vinaccioli da vinacce rosse.

Infine, per quanto di relativo al comparto energetico, i risultati del progetto BIOFACE rispondono anch'essi pienamente alla sfida della focus area 5C in merito alla valorizzazione a fini energetici delle biomasse residue rispondenti all'Allegato I. l'individuazione infatti di un protocollo previsionale, semplice ed efficace, sull'efficienza energetica degli scarti tale da poter essere adottato dalle aziende, mette facilmente queste ultime nelle condizioni di poter valorizzare gli scarti rispetto agli indirizzi di prima generazione. La proximate analysis rappresenta infatti un valido protocollo da adottare a livello aziendale per la caratterizzazione completa e mirata dei residui di estrazione per la loro valorizzazione energetica e la sua messa a punto espressa con il progetto BIOFACE si identifica con il raggiungimento dell'indicatore di risultato per le ricadute nel comparto energetico. Come infatti previsto dall'indicatore, la proximate analysis sulle matrici di scarto si identifica come un protocollo semplice, efficiente e ottimizzato da adottare a livello aziendale per la caratterizzazione completa e mirata dei residui di estrazione per la loro valorizzazione energetica.

In sintesi il progetto ha soddisfatto quindi gli **INDICATORI** previsti nel progetto. Di seguito viene fatta breve sintesi raffrontando i risultati ottenuti con gli indicatori previsti.

Indicatore per l'attività estrattiva: identificazione di un processo estrattivo con resa complessiva di estratto grezzo non inferiore al 10% per l'estrazione con fluidi supercritici e non inferiore al 15% per l'estrazione con ultrasuoni e microonde; per l'idrodistillazione non inferiore a 10 ml/kg (1%) di materiale di partenza; gli estratti dovranno contenere non meno del 1% in biomolecole attive come determinato da strategie analitiche.

Come primo obiettivo il progetto aveva quello di ottenere una resa dei processi estrattivi coerente con uno scale up di produzione industriale. Per le estrazioni UAE e MAE il limite è stato fissato al 15%. Le migliori rese estrattive totali sono state ottenute con macerazione assistita da ultrasuoni (UAE) rispetto a quella assistita da microonde (MAE), per questo, i fitocomplessi risultanti da tale metodica sono stati utilizzati per le successive valutazioni di attività biologica (fitoiatrice, repellente ed insetticida). Scendendo nel particolare, gli estratti UAE che hanno superato questo requisito sono stati: vinacce rosse e bianche, raspi, foglie di vite var. Lambrusco, mele, pere, mix di fagioli e fagiolini. Di questi estratti però non tutti hanno mostrato un contenuto di bioattivi (riferiti al contenuto di polifenoli valutati con metodica spettrofotometrica) che rispettava gli indicatori del progetto (non meno del 1% in biomolecole attive), infatti in questo caso l'elenco si restringe a, in ordine dal più ricco al meno ricco: vinaccioli, vinacce rosse, pere, raspi vinacce bianche, sanse e fagiolini.

Per gli estratti SFE e per l'idrodistillazione gli indicatori erano stati fissati rispettivamente al 10% ed all'1%. In questo caso nessuna matrice ha portato una resa dei processi estrattivi coerente con questi valori, e, di conseguenza, nessuno rispettava gli indicatori del progetto in termini di contenuto di biomolecole attive.

Per quanto riguarda l'attività antiossidante l'estratto UAE EtOH 50% di vinaccioli è stato l'unico a raggiungere un valore di mmol trolox/g coerente con quello dell'indicatore di progetto (0,5 mmol trolox/g).

In conclusione, l'indicatore di risultato è stato pienamente raggiunto per l'estratto di vinaccioli da scarti di uve rosse.

Indicatore per Comparto fitosanitario (a): almeno un estratto arricchito/biomolecola attiva in laboratorio verso almeno un ceppo batterico o fungino con una concentrazione efficace non superiore a 20mg/ml.

Le attività sviluppate con il progetto BIOFACE non hanno prodotto risultati tali da poter soddisfare l'indicatore dal momento che nessuno degli estratti prodotti ha determinato una attività biostatica o biocida coerente con il parametro previsto. Per questo motivo, tutte le attività e prove successive sono state focalizzate sulle possibili attività repellenti verso fitofagi.

Indicatore per Comparto fitosanitario (b): almeno un estratto arricchito/biomolecola attiva come insetticida complessivo in semi campo verso almeno uno dei fitofagi con una efficacia non inferiore al 40%. Le attività di laboratorio, semi campo e campo hanno permesso di individuare un estratto in grado di sviluppare una promettente attività repellente verso *Drosophila suzukii*. Sebbene i risultati ottenuti non abbiano pienamente soddisfatto l'indicatore atteso, tuttavia sono emersi aspetti tendenzialmente promettenti ed incoraggianti utili a promuovere ulteriori approfondimenti. Le criticità incontrate hanno riguardato essenzialmente la scarsa standardizzazione degli estratti ottenuti dalle matrici individuate come promettenti fonti di biomolecole efficaci che, ad annate differenti hanno dato rese discordanti che dunque hanno inciso sulle rese di estrazione in modo significativo (rese anche 20 volte inferiori). Tale aspetto critico, sottolineato nella sezione 3 della presente relazione tecnica è quasi certamente dovuto al differente grado di esaurimento delle vinacce rispetto ai diversi processi di spremitura e distillazione subiti in azienda prima dalla loro fornitura come scarto. A tale aspetto, agevolmente superabile con l'individuazione dello step di lavorazione aziendale più adeguato a fornire matrici di scarto non totalmente esaurite, si sono aggiunte le restrizioni dovute alla pandemia Covid-19 che hanno fortemente limitato la potenzialità estrattiva dei laboratori di UNIFE limitando il numero di prove di repellenza in campo che avrebbero potuto consolidare i dati incoraggianti. Per concludere, il progetto BIOFACE – pur non soddisfacendo appieno l'indicatore di risultato - ha fornito rispetto alle sfide fitosanitarie della focus area 5C risultati di grande interesse degni di essere approfonditi e sviluppati, con specifico riferimento alla repellenza verso *Drosophila suzukii* di estratti da matrici di scarto da vinacce rosse, con concrete e fattibili opportunità di ricaduta produttiva con costi iniziali di investimento relativamente contenuti (vedi sezione sulle ricadute in ambito produttivo).

Indicatore per Comparto alimentare: almeno un estratto arricchito/biomolecola attiva con una attività antiossidante espressa in laboratorio come equivalenti di trolox con valore non inferiore a 0.5 mmol trolox/g di matrice estratta.

L'indicatore di risultato è stato pienamente raggiunto, identificandosi nell'estratto ottenuto da scarti vitivinicoli (vinaccioli), evidenziando con diversi approcci sperimentali un'attività antiossidante variabile tra 0,5 e 0,6 mmol trolox/g di matrice estratta. Dal momento che il positivo risultato sull'attività antiossidante è trasversale a diversi contesti salutistici, come peraltro rimarcato nelle precedenti sezioni relative alle ricadute, è pertanto particolarmente apprezzabile perché si presta non solo ad essere sfruttato nel contesto dell'integrazione alimentare (nutraceutica), dell'ingredientistica alimentare (ad es. migliorare la shelf-life dei prodotti di II-IV gamma) ma anche della cosmesi naturale come ingrediente per prodotti anti-age e per migliorarne la conservabilità. In conclusione, l'indicatore risulta raggiunto appieno.

Indicatore per Comparto energetico: messa a punto di un protocollo da adottare a livello aziendale per la caratterizzazione completa e mirata dei residui di estrazione per la loro valorizzazione energetica.

È stato messo a punto un protocollo di valutazione delle potenzialità di sfruttamento energetico delle biomasse di scarto basato sulla determinazione delle percentuali di massa di umidità, ceneri, sostanze volatili e carbonio fisso, ottenute da una serie di test standardizzati applicate alle matrici di scarto oggetto del progetto. La proximate analysis come strategia individuata con il progetto BIOFACE rappresenta quindi un valido protocollo da adottare a livello aziendale per la caratterizzazione completa e mirata dei residui di estrazione per la loro valorizzazione energetica e la sua messa a punto qui espressa si identifica con il pieno raggiungimento dell'indicatore di risultato per le ricadute nel comparto energetico.

Indicatore per Modello di processo: messa a punto di un protocollo operativo di estrazione da adottare a livello aziendale per ogni sottoprodotto risultato utile all'ottenimento di estratti/biomolecole efficaci esportabile anche in altri contesti oltre quello fitosanitario e alimentare oggetto del presente progetto.

Con il progetto BIOFACE è stato messo a punto un modello di protocollo di estrazione efficace per diverse categorie di matrici, permettendo di ottenere estratti con rese significative con ricadute su diversi settori di mercato come sottolineato nelle sezioni dedicate alle ricadute e alle risposte alle sfide della focus area 5C. Il dato più rilevante è che tale modello di processo è effettivamente esportabile in altri contesti aziendali, primi tra tutti quelli delle industrie della trasformazione del prodotto agricolo (II-IV gamma) che potrebbero sfruttare gli scarti della lavorazione dei prodotti di gamma I per ottenere estratti da utilizzare per migliorare la conservabilità dei propri prodotti o per rifluire in altri contesti di mercato, come ben dimostrato dal progetto BIOFACE raggiungendo appieno l'indicatore di risultato atteso.

Indicatore per la parte economica: questo indicatore riguarda la redditività del sistema che, per un impianto industriale SFE, per un prezzo medio di vendita degli estratti di 10 euro a chilogrammo, risulta decisamente positivo con un VAN di 164 milioni di euro, un SRI del 350% e TRC di 2 anni, contro il valore degli scarti che, al contrario, molto spesso costituiscono un costo.

In merito alla divulgazione il numero di articoli è stato superiore a quelli previsti (7 anziché 5), visite guidate (6) e incontri tecnici (9), sebbene parte delle visite guidate e degli incontri tecnici sono stati svolti in modalità online a causa delle restrizioni causate dalla pandemia Covid-19. Si ritiene comunque ampiamente raggiunto e soddisfatto anche questo indicatore di piano sul raggiungimento dei risultati raggiunti.

Tutte le attività previste sono state svolte appieno soddisfacendo gli indicatori di risultato previsti. Nell'ultimo anno le attività sono state in gran parte sviluppate da remoto a partire da fine febbraio 2020 a causa delle restrizioni imposte dalla pandemia Covid-19.

RICADUTE SOCIALI:

Le ricadute sociali riguardano sostanzialmente l'occupazione. La ricaduta economica e produttiva nei comparti agroalimentare, fitosanitario (nutraceutica, ingredientistica) già descritta permette di individuare non solo opportunità incrementali di reddito ma anche la necessità di personale specializzato opportunamente formato per la gestione dell'intero sistema. Il tessuto aziendale regionale si caratterizza infatti anche di piccole realtà, spesso a gestione familiare, che possono aderire alle spinte di innovazione derivate dal progetto, creando sul territorio opportunità occupazionali. Questa sinergia tra opportunità di crescita economica e necessità operative favorisce un incremento dell'occupazione non solo per i settori direttamente interessati ma anche per altri comparti, come la cosmesi.

L'esperienza di BIOFACE dimostra come nell'ambito di una filiera di produzione che sfrutti materie prime secondarie, parallela a quella tradizionale di sfruttamento delle materie prime agricole, veda l'articolarsi di un processo che, in sintesi, sfrutta approcci tecnologici ciascuno dei quali andrebbe gestito da nuovo personale formato e tecnicamente preparato ai nuovi approcci produttivi che normalmente non appartengono a comparti produttivi agro-alimentari della trasformazione:

- Operatori specializzati in grado di gestire sistemi di conservazione temporanea della materia prima secondaria per conservarne le potenzialità come fonte di biomolecole e risorsa energetica. Il personale specializzato dovrebbe essere in grado di gestire sistemi come stufe/forni di essiccazione e/o liofilizzatori per ridurre al minimo (inferiore al 5%) la quantità di acqua che altrimenti determinerebbe detrimento della biomassa con conseguente detrimento del risultato finale (biomolecole attive). Il personale specializzato dovrà anche essere formato per interpretare la qualità della conservazione della materia prima secondaria per evitare che il processo di trasformazione successivo non risulti inefficace. Indicativamente questa posizione richiederebbe una posizione lavorativa specializzata.
- Operatori specializzati in grado di gestire sistemi di estrazione. Questo aspetto è quello più tecnologicamente complesso e che quindi si riflette sul livello di specializzazione dell'operatore. L'operatore deve essere in grado di governare un processo estrattivo rispetto a tutte le variabili individuate dal progetto BIOFACE in relazione al processo estrattivo con ultrasuoni (UAE) risultato complessivamente più efficiente che sono principalmente: rapporto quantità di biomassa/quantità di solvente, temperatura, tempo di estrazione. La gestione corretta di queste variabili permette di poter ottenere da una stessa matrice differenti categorie di estratti che possono risultare utili alla diversificazione della valorizzazione di seconda generazione degli scarti.
- Operatori specializzati in grado di interpretare le diverse tipologie di scarti in funzione delle diverse tipologie di estratto ottenibili, e quindi diversamente indirizzabili verso diversi comparti.
- Operatori specializzati in grado di interpretare le esigenze del mercato fitosanitario, alimentare/ingredientistico e cosmetico, sfruttando in modo duttile le tecnologie a disposizione.

Le ricadute sociali riguardano anche l'aspetto della salute pubblica. L'opportunità di utilizzare prodotti fitosanitari derivati da processi green e sostenibili - come ad esempio gli estratti con attività repellente individuati con BIOFACE riduce la necessità di utilizzare altri prodotti di origine sintetica limitando così la ricaduta sull'ambiente riducendo il rischio di esposizione degli operatori agricoli e migliorando la salute dei consumatori grazie alla naturalità e salubrità dei prodotti agricoli.

Gli aspetti che correlano i processi produttivi approfonditi dal progetto BIOFACE alla salute sociale sono legati anche alla riduzione dell'impatto sull'ambiente grazie al ridotto impiego di solventi organici nei processi estrattivi, ed allo sfruttamento energetico delle biomasse che conduce ad una limitazione delle emissioni.

In sintesi, la ricaduta sociale indotta dai processi evidenziati dal progetto BIOFACE si può tradurre in più occupazione e più salute, che sebbene non sia stimabile in termini economici, potrebbe avere un impatto enorme.

Infine, un'importante ricaduta la cui efficacia ricade trasversalmente anche su territorio, ambiente e ambito produttivo è la promozione di una nuova consapevolezza sociale della prevenzione dello spreco alimentare e del riutilizzo profittevole.

Elenco Allegati:

Allegato1_IncontriVisitePresenze_BIOFACE_5015191.pdf

Data 09 febbraio 2021

IL LEGALE RAPPRESENTANTE (Firmato digitalmente)