UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Dipartimento di Ingegneria Industriale

Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Chimica

Valorizzazione dei residui di vinificazione: estrazione e microincapsulazione di polifenoli

Tesi in

Fenomeni di trasporto

Relatori:

Prof. Ing. Gaetano Lamberti

Dott. Ing. Diego Caccavo

Candidata:

Anna Palumbo

matricola 0622201188

Anno Accademico 2020/2021

Ai miei fratelli Alessandro e Lucia

Questo testo è stato stampato in proprio, in Times New Roman

La data prevista per la discussione della tesi è il 21/03/22
Fisciano, 16/03/22

Sommario

Sommario I

Indice delle figure V

Indice delle tabelle IX

Abstract XI

Introduzione 1

1.1 Concetto di economia circolare ____ 2

1.1.1 Economia circolare nel settore agro-alimentare 3

1.2 La filiera vitivinicola ____ 5

1.2.1 La viticoltura 11

1.2.3 Processo di vinificazione 11

1.3 Composizione dei residui di produzione ____ 14

1.4 Gestione dei residui e aspetti legislativi ____ 16

1.5 I polifenoli dell'uva ____ 20

1.5.1 Acidi fenolici 23

1.5.2 Flavonoidi 23

1.5.3 Non-flavonoidi 24

1.5.4 Proprietà benefiche 24

1.6 Tecniche di estrazione ____ 26

1.6.1 Macerazione 26

1.6.2 Estrazione assistita da ultrasuoni 27

1.6.3 Stato dell'arte 31

1.7 I liposomi come sistema di incapsulamento _____ 35
1.7.1 Formazione dei liposomi 39
1.7.2 Metodi per la preparazione di liposomi 40
1.8 Progetto RINNOVINO _____ 48
1.9 Obiettivi della tesi _____ 50

Materiali, apparecchiature e metodi 51

2.1 Materiali _____ 52
2.1.1 Acido gallico 52
2.1.2 Reattivo Folin–Ciocalteau 52
2.1.3 Vinacce di Fiano, Aglianico, Piedirosso-Aglianico 52
2.1.4 Lecitina di soia (PC) 53
2.1.5 Solventi e altri materiali 54
2.2 Apparecchiature _____ 54
2.2.1 Spettrofotometro 54
2.2.2 Set up sperimentale utilizzato per la produzione di liposomi 55
2.2.3 Sonicatore 56
2.2.4 DLS 56
2.2.5 Centrifuga 57
2.2.6 Tangential Flow Filtration (TFF) 57
2.2.7 Bomba calorimetrica di Mahler 58
2.2.8 Altre apparecchiature utilizzate 60
2.3 Metodi _____ 60
2.3.1 Pretrattamento della matrice solida 60
2.3.2 Estrazione di polifenoli 63
2.3.3 Quantificazione dei polifenoli 67
2.3.4 Incapsulamento polifenoli 70
2.3.5 Caratterizzazione di liposomi 72
2.3.6 Misura potere calorifico 74

Risultati e discussione 79

3.1 Risultati processo di estrazione 80

3.2 Macerazione 80

3.3 Estrazione assistita da ultrasuoni 86

3.4 Confronto macerazione – UAE 93

3.5 Caratterizzazione della sospensione liposomiale incapsulante polifenoli 94

3.6 Potere calorifico delle vinacce esauste 98

Conclusioni 103

Bibliografia 109

Indice delle figure

Figura 1. Rappresentazione schematica di economia lineare ed economia cicolare [3]. 3

Figura 2. Biomassa della filiera vitivinicola [9]. 5

Figura 3. Ciclo di vita del vino [8]. 7

Figura 4. Produzione di uva 2018-2020 per regione [11]. 8

Figura 5. I primi 10 produttori mondiali di uva 2018-2020 [11]. 8

Figura 6. Produzione di vino 2018-2019 per regione [11]. 9

Figura 7. I primi 10 produttori mondiali di vino 2018-2019 [11]. 10

Figura 8. Schema di utilizzazione dell'uva [25]. 19

Figura 9. Meccanismi antiossidanti dei polifenoli [17]. 22

Figura 10. Classificazione polifenoli.[29] 23

Figura 11.Cavitazione acustica. 28

Figura 12. Collasso di una bolla di cavitazione [35]. 29

Figura 13. Rappresentazione schematica di vescicole unilamellari cationiche con il farmaco idrofilico incapsulato all'interno del core acquoso e il farmaco idrofobico intrappolato nel doppio strato fosfolipidico [46]. 37

Figura 14. Classificazione liposomi in base a dimensioni e lamellarità [48]. 38

Figura 15. Schema che illustra l'autoassemblaggio di fosfolipidi coinvolti nella formazione di liposomi [44]. 40

Figura 16. Formazione di liposomi mediante *membrane contactor* [44]. 43

Figura 17. Formazione di liposomi mediante *Microfluidic Hydrodynamic Focusing* (MHF) [44]. 44

Figura 18. Schematizzazione del setup sperimentale del metodov simil-microfluidico [51]. 46

Figura 19. Il partenariato RINNOVINO. 49

Figura 20. Piano sperimentale delle attività del progetto di tesi. 50

Figura 21. Struttura chimica acido gallico [54]. 52

Figura 22. Struttura della L-α-fosfatidilcolina di soia: in rosso è rappresentata la colina e il gruppo fosfato, in nero il glicerolo, in verde l'acido grasso insaturo e in blu l'acido grasso saturo. 53

Figura 23. Spettrofotometro Lambda 25 Perkin Elmer. 55

Figura 24. Schematizzazione del set up sperimentale finalizzato alla produzione di nanovescicole [55]. 55

Figura 25. Sonicatore VCX 130 PB 130 W, Sonics & Materials Inc. 56

Figura 26. Fluttuazioni di intensità e moto browniano [56]. 57

Figura 27. Centrifuga NEYA 16 High Speed. 57

Figura 28. Minimate TFF Capsule 300kDa Omega. 58

Figura 29. Schema di filtrazione con membrana TFF. 58

Figura 30. (a) Camera di combustione; (b) Schema di una bomba calorimetrica di Mahler: agitatore (1), bomba calorimetrica (2), vaso calorimetrico con intercapedine d'aria (camicia adiabatica) (3), cestello per l'acqua (4), termometro o sonda di temperatura (5), elettrodi (6), coperchio (7) [59]. 59

Figura 31. Vinacce appena consegnate (a); vinacce imbustate sottovuoto (b). 61

Figura 32. Vinacce tal quale (a); vinacce macinate (b); vinacce essiccate e macinate (c). 62

Figura 33. Set-up sperimentale estrazione assistita da ultrasuoni. 66

Figura 34. Retta di taratura acido gallico. 70

Figura 35. Sospensione di liposomi caricati con polifenoli. 72

Figura 36. Riscaldamento esperimento bomba calorimetrica di Mahler. 76

Figura 37. Bomba calorimetrica di Mahler. 77

Figura 38. Tempo di macerazione Aglianico pre-vinificazione. 81

Figura 39. Tempo di macerazione Fiano. 82

Figura 40. Polifenoli pre & post vinificazione. 83

Figura 41. Polifenoli pre & post essiccamento. 84

Figura 42. Polifenoli da macerazione. 85

Figura 43. Estrazione assistita da ultrasuoni Aglianico. 86

Figura 44. Estrazione assistita da ultrasuoni Piedirosso-Aglianico. 87

Figura 45. Estrazione assistita da ultrasuoni Fiano. 88

Figura 46. Campioni di estrazione con H_2O, H_2O:EtOH (1:1), EtOH da Pidirosso-Aglianico (a) e da Fiano (b). 89

Figura 47. Effetto termico resa UAE 60 min. 90

Figura 49. Effetto essiccamento H_2O:EtOH 1:1 UAE. 91
Figura 50. Effetto essiccamento EtOH UAE. 92
Figura 51. Distribuzione volumetrica dei liposomi. 95
Figura 52. Modello di fitting della cinetica di invecchiamento. 97
Figura 53. Sospensioni liposomiali mantenute a diverse temperature. 98

Indice delle tabelle

Tabella 1. Quantificazione di produzione e utilizzo dell'uva [12]. 9
Tabella 2.Scarti del settore vitivinicolo a livello nazionale per l'anno 2001 [7]. 15
Tabella 3. Soluzioni standard acido gallico. 69
Tabella 4. Coefficiente di regressione e coefficiente di proporzionalità..... 70
Tabella 5. Resa UAE [mgGAE/gdry]. 89
Tabella 6. Resa ed efficienza di estrazione UAE. 93
Tabella 7. Resa ed efficienza di estrazione UAE. 94
Tabella 8. Resa ed efficienza di estrazione UAE effetto termico 60 min. 94
Tabella 9. Risultati cinetica di invecchiamento. 96
Tabella 10. Parametri cinetica di invecchiamento. 97
Tabella 11. Potere calorifico inferiore biomasse [63, 64]. 101

Abstract

Vitis vinifera is one of the most widespread crops in the world. Numerous scientific works attest that grapes are rich in biologically active compounds such as polyphenols, whose biosynthesis begins before veraison and continues during ripening. The wine industry generates a high amount of processing residues.

For this reason, research and the wine industry are exploring solutions for the development of new products with high added value deriving from the enhancement of the residues of the supply chain. Studies show that pomace could be widely used in the field of cosmetics and nutraceuticals, as the extracts rich in polyphenols are able to exert an anti-inflammatory and counteracting action against free radicals, therefore against cellular aging.

The recovery of active ingredients with high added value is a key point for the enhancement of the vinified raw materials, making them close to commercialization.

This thesis project has the main objective of valorization the pomace by extracting from them products with high added value, such as polyphenols. The optimal operating conditions of the process are identified, assessing the influence of the technique and extraction parameters on the yield.

In particular, the extraction efficiency of the innovative ultrasonic method was evaluated compared to the conventional method of maceration, using in both cases a dry solid/solvent ratio (w/v) equal to 1:5. Maceration was carried out at 60°C in water/ethanol mixture (1:1) for up to 95 hours; while for the UAE process was started from room temperature. In this case the process was continued up to 45 or 60 minutes and three types of solvents were analyzed: water, water/ethanol (1:1) and ethanol. The following main conclusions were reached: the maximum recommended maceration time is 24 hours,

after which the degradation of the extracted polyphenols; occurs the quantity of polyphenols in the post-vinification marc is comparable to the pre-vinification one; drying the pomace at 40°C up to a humidity of 5,4% does not degrade the polyphenols; pomace from red grapes contains 1,5 times the polyphenols contained in pomace from white grapes; the best solvent for UAE extractions is water/ethanol (1:1); at 45 minutes of UAE the extraction efficiency varies from 50% to 90%; the effect of the ultrasounds alone at 1 hour has an extraction efficiency of 110% compared to 2 hours of maceration at 60°C.

Further objectives were aimed at encapsulating the extracted polyphenols and studying the aging kinetics of encapsulated polyphenols. For this purpose, the microfluidic-like method was used for the preparation of liposomes loaded with the extracted polyphenols obtaining a liposomal suspension containing 0,74 mg_{GAE}/mL. The DLS analysis showed that the liposomes produced have a Z-average of 488 nm, which corresponds to an average value of the polydispersity index, equal to 0,49. A polyphenol load of 10,7% was obtained with an encapsulation efficiency of 71,6%. In addition, with a view to circular economy, the energy potential of the exhausted marc (post-extraction) was assessed, in order to verify its possibility of use as a fuel deriving from waste. Thanks to the experiment with Mahler's calorimetric bomb, it was possible to estimate the lower calorific value of the post-extraction marc sample (24,11 MJ/kg_{ss}). Therefore the residue can be further exploited to produce thermal energy.

Bibliografia

1. *https://www.europarl.europa.eu/*. [22/01/22].
2. *https://sna.gov.it/*. [22/01/22].
3. *http://www.impresepossibili.it/*. [12/01/22].
4. *https://www.eea.europa.eu/*. [22/01/22].
5. *https://www.treccani.it/*. [12/01/22].
6. *https://www.politicheagricole.it/*. [22/01/22].
7. *https://www.isprambiente.gov.it/it*. [07/12/21].
8. ENEA, *Uso efficiente delle risorse nelle imprese vitivinicole*. 2018.
9. *https://www.ilgiornaledelcibo.it/biomasse-produzione-energia/*. [07/03/22].
10. Teixeira, A., et al., *Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A review.* International journal of molecular sciences, 2014. **15**(9): p. 15638-15678.
11. *https://www.fao.org/*. [07/01/2022].
12. *The International Organisation of Vine and Wine.* [27/12/21]; Available from: https://www.oiv.int/.
13. OIV, *Statistical Report on World Vitiviniculture*. 2019
14. *https://www.istat.it/*. 2020 [07/01/22]; Available from: https://www.istat.it/.
15. *https://www.quattrocalici.it/*. [12/01/22].
16. *http://www.assovini.it/*. [12/01/22].
17. *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*.
18. Fiori, L., et al., *Grape by-products: extraction of polyphenolic compounds using supercritical CO2 and liquid organic solvent–a preliminary investigation.* Cyta-Journal of Food, 2009. **7**(3): p. 163-171.
19. Ruggieri, L., et al., *Recovery of organic wastes in the Spanish wine industry. Technical, economic and environmental*

analyses of the composting process. Journal of cleaner production, 2009. **17**(9): p. 830-838.
20. Spigno, G., L. Marinoni, and G.D. Garrido, *State of the art in grape processing by-products*, in *Handbook of Grape Processing By-Products*. 2017, Elsevier. p. 1-27.
21. Barba, F.J., et al., *Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review.* Trends in Food Science & Technology, 2016. **49**: p. 96-109.
22. Ahmad, B., et al., *Integrated biorefinery approach to valorize winery waste: A review from waste to energy perspectives.* Science of the Total Environment, 2020. **719**: p. 137315.
23. FORESTALI, I.M.D.P.A.A.E., *DECRETO 27 novembre 2008*. Gazzetta Ufficiale n. 301 del 27 dicembre 2008.
24. *Filiera vitivinicola: valorizzare residui e sottoprodotti*. [22/01/22]; Available from: http://www.centrodocumentazionegrappa.it/.
25. *I sottoprodotti delle industrie vinicole.* 2011/2012 [10/01/22]; Available from: https://agrariacantoni.edu.it/wp-content/uploads/Sottoprodotti-industrie-vinicole.pdf.
26. Manconi, M., et al., *Polymer-associated liposomes for the oral delivery of grape pomace extract.* Colloids and surfaces B: biointerfaces, 2016. **146**: p. 910-917.
27. De Iseppi, A., et al., *Current and future strategies for wine yeast lees valorization.* Food Research International, 2020. **137**: p. 109352.
28. Munin, A. and F. Edwards-Lévy, *Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review.* Pharmaceutics, 2011. **3**(4): p. 793-829.
29. *https://www.researchgate.net/*. [07/03/22].
30. Tsao, R., *Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols.* Nutrients, 2010. **2**(12): p. 1231-1246.
31. BIOACTIVE-NET, *Guida ai composti bioattivi dai residui di lavorazione dell'uva*.
32. Da Porto, C., E. Porretto, and D. Decorti, *Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (Vitis vinifera L.) seeds.* Ultrasonics sonochemistry, 2013. **20**(4): p. 1076-1080.
33. Nunes, M.A., F. Rodrigues, and M.B.P. Oliveira, *Grape processing by-products as active ingredients for cosmetic*

proposes, in *Handbook of grape processing by-products*. 2017, Elsevier. p. 267-292.
34. https://www.wineandthecity.it/. [14/02/22].
35. Chemat, F. and M.K. Khan, *Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction.* Ultrasonics sonochemistry, 2011. **18**(4): p. 813-835.
36. Luque-Garcıa, J. and M.L. De Castro, *Ultrasound: a powerful tool for leaching.* TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2003. **22**(1): p. 41-47.
37. Chemat, F., et al., *Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review.* Ultrasonics sonochemistry, 2017. **34**: p. 540-560.
38. Hugo Miguel Santos, C.L., Prof. José-Luis Capelo-Martínez, *The Power of Ultrasound*, P.J.-L. Capelo-Martínez, Editor. 2008.
39. Spigno, G. and D.M. De Faveri, *Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts.* Journal of Food Engineering, 2007. **78**(3): p. 793-801.
40. Cho, Y.-J., et al., *Ultrasonication-assisted extraction of resveratrol from grapes.* Journal of Food Engineering, 2006. **77**(3): p. 725-730.
41. Corrales, M., et al., *Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison.* Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2008. **9**(1): p. 85-91.
42. Barba, F.J., et al., *Effect of alternative physical treatments (ultrasounds, pulsed electric fields, and high-voltage electrical discharges) on selective recovery of bio-compounds from fermented grape pomace.* Food and Bioprocess Technology, 2015. **8**(5): p. 1139-1148.
43. Guaita, M. and A. Bosso, *Polyphenolic characterization of grape skins and seeds of four Italian red cultivars at harvest and after fermentative maceration.* Foods, 2019. **8**(9): p. 395.
44. Patil, Y.P. and S. Jadhav, *Novel methods for liposome preparation.* Chemistry and physics of lipids, 2014. **177**: p. 8-18.

45. Isailović, B.D., et al., *Resveratrol loaded liposomes produced by different techniques.* Innovative food science & emerging technologies, 2013. **19**: p. 181-189.
46. *https://www.gruppotpp.it/*. [22/01/22].
47. Bochicchio, S., *Nanostructured vectors for the transport of active molecules through biological membranes for pharmaceutical and nutraceutical applications.* 2017.
48. M.Correale, *Preparazione e caratterizzazione di liposomi e fitosomi per applicazioni agronomiche*. 2018.
49. Akbarzadeh, A., et al., *Liposome: classification, preparation, and applications.* Nanoscale research letters, 2013. **8**(1): p. 1-9.
50. Recupido, F., *Produzioni di nanoliposomi per applicazioni nutraceutiche mediante un approccio simil-microfluidico*. 2016.
51. Bochicchio, S., et al., *Nanoliposomes production by a protocol based on a simil-microfluidic approach*, in *Advances in Bionanomaterials*. 2018, Springer. p. 3-10.
52. Chaturvedi, S.P. and V. Kumar, *Production techniques of lipid nanoparticles: a review.* Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 2012. **3**(3): p. 525-541.
53. *https://www.rinnovino.it/*. [25/02/22].
54. *https://www.sigmaaldrich.com/*. [25/02/22].
55. De Simone, V., et al., *Nanoliposomes in polymeric granules: Novel process strategy to produce stable and versatile delivery systems.* Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2020. **59**: p. 101878.
56. www.atascientific.com.au, *DLS concept*.
57. Romaniello, V., *Studio del processo di filtrazione tangenziale per la concentrazione di sospensioni liposomiali*. 2020.
58. *https://www.unisalento.it*. [14/02/22].
59. *https://tfascienzeunitn2012.files.wordpress.com/2013/02/esp2_-bomba-calorimetrica.pdf.*
60. Lamuela-Raventós, R.M., *Folin-Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity.* Meas. Antioxid. Act. Capacit. Recent Trends Appl, 2017: p. 107-115.
61. Ghosh, M., et al., *Flavonoids and phenolic compounds from Litsea polyantha Juss. Bark.* 2014.

62. Burg, P., et al., *Calorific evaluation and energy potential of grape pomace.* International Agrophysics, 2016. **30**(2).
63. E.E.n.p.l.m., *Biomasse ed energia*.
64. Alessandro Casula, P.d.M., *Utilizzo a fini energetici di biomasse*.