UNIVERSITÀ DEGLI STUDI FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN
GESTIONE SOSTENIBILE DELLE RISORSE AGRARIE, FORESTALI E ALIMENTARI

CICLO XXXII

COORDINATORE Prof. Susanna Nocentini

VALORIZZAZIONE DI UVE DA DIRADAMENTO PER LA PRODUZIONE INDUSTRIALE DI ESTRATTI AD ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE E LORO UTILIZZO SU MATRICI ALIMENTARI

Settore Scientifico Disciplinare AGR/15

Dottorando
Dott.ssa Ginevra Bucalossi

Tutor
Prof. Bruno Zanoni

Co-Tutor
Dott.ssa Giovanna Fia

Coordinatore
Prof. Susanna Nocentini

Anni 2016/2019

“Nella vita gli sprechi nascono dalla fretta.
Il mondo contadino e agricolo,
in qualche modo legato ai ritmi della natura,
non è dedito alla fretta, tantomeno agli sprechi”

Henry David Thoreau

RINGRAZIAMENTI

Questo studio è stato condotto nel periodo 2016-2019 presso il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agrarie, Alimentari, Ambientali e Forestali, DAGRI, Università di Firenze, Italia.

La ricerca è stata supportata dalle Aziende Agricole "Tenuta dello Scompiglio" (Lucca) e "La Torre" (Velletri, Roma), Aziende a cui porgo i miei più sentiti ringraziamenti per aver ospitato parte delle attività della ricerca, per la loro disponibilità e la loro professionalità.

Ringrazio calorosamente l'Enologo Claudio Gori per la sua collaborazione al progetto di ricerca. La sua dedizione e passione sono state preziose così come i suoi insegnamenti.

Una parte di questo studio ha ricevuto il supporto del Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca (MIUR) inserendosi nel Progetto di ricerca: 20158YJW3W Programmi di Ricerca Scientifica di Rilevante Interesse Nazionale – PRIN 2015 – Individual differences in the acceptability of healt foods: focus on phenol and fat content. Coordinatore il Prof. Erminio Monteleone.
Vorrei ringraziare tutte le persone che hanno preso parte attiva del progetto iniziando dal Prof. Erminio Monteleone, la Prof.ssa Caterina Dinnella, la Dott.ssa Sara Spinelli e la mia collega Alessandra De Toffoli per il supporto e la collaborazione. Ringrazio la Dott.ssa Valentina Canuti per la sua disponibilità, il supporto e per aver condiviso con me le sue conoscenze. Un sentito ringraziamento al Prof. Maurizio Servili e il Dott. Gianluca Veneziani dell'Università di Perugia, la Prof.ssa Tullia Gallina Toschi e la Dott.ssa Federica Tesini dell'Università di Bologna, la Prof.ssa Ella

Pagliarini e la Dott.ssa Cristina Proserpio dell'Università di Milano. Il contributo di voi tutti è stato fondamentale per la buona riuscita del progetto.
Desidero esprimere la mia sincera gratitudine al mio supervisore Prof. Bruno Zanoni e alla mia co-supervisore Dr.ssa Giovanna Fia. Senza entrambi, non sarei dove sono ora. Grazie Bruno, per la guida e l'incoraggiamento. Grazie Giovanna per la pazienza ed il supporto. Grazie ad entrambi per le critiche costruttive che mi hanno permessa di vedere il mio lavoro in una prospettiva più ampia e grazie per il tempo dedicato.

Ringrazio tutte le persone della sezione di via Donizetti che hanno condiviso con me questi tre anni di emozioni contrastanti, un grazie speciale alle mie compagne di stanza Carlotta ed Ottavia. Grazie per avermi alleggerito il carico di alcune giornate, grazie di avermi seguita e su(o)pportata lungo questo percorso.

Grazie ai miei amati nonni, ai miei cari genitori ed a Eleonora. Ci siete sempre stati e sempre ci sarete.

Un grazie a me stessa per essermi messa ancora una volta in gioco.

RIASSUNTO

La vite, in particolare la specie *Vitis vinifera,* è una delle colture più diffuse nel mondo (Grimplet, Deluc, Cramer, & Cushman, 2007). L'uva è ricca di composti ad elevata attività antiossidante come i polifenoli (antociani, flavonoli, flavan-3-oli, procianidine), gli acidi fenolici, il resveratrolo ed il glutatione (Kedage, ,Tilak, Dixit, Devasagayam, & Mhatre, 2007). La biosintesi di molti di questi composti inizia prima dell'invaiatura e prosegue nel corso della maturazione del frutto (Adams, 2006). Grazie alle loro proprietà antiossidanti, i composti fenolici dell'uva sono potenzialmente interessanti sia come ingredienti funzionali sia come alternativi agli antiossidanti inorganici abitualmente utilizzati negli alimenti e nel vino. Fra i composti biologicamente attivi dell'uva da vino, le vitamine idrosolubili, che possiedono ben note proprietà biologiche, sono state scarsamente studiate poiché rivestono un ruolo enologico marginale e la loro concentrazione è bassa in confronto ad altri costituenti come i composti fenolici (Andrade et al. 2019).

La filiera vitivinicola genera un'elevata quantità di residui di lavorazione che attualmente rappresentano un problema di sostenibilità ambientale ed economica per le aziende del settore. Per questo motivo, la ricerca e l'industria enologica stanno esplorando soluzioni per lo sviluppo di nuovi prodotti ad elevato valore aggiunto, derivanti dalla valorizzazione dei residui della filiera. I residui della filiera vitivinicola sono rappresentati dai residui di potatura (sarmenti, raspi e foglie), dai residui organici della vinificazione (vinacce che comprendono vinaccioli, residui di polpa, bucce e feccia derivante da operazioni di pulizia e decantazione di mosti e vini), dalle acque reflue e dai residui inorganici dei diversi trattamenti che il vino subisce nel corso della elaborazione (ad esempio terra di diatomea, bentonite e perlite) (Oliveira et al. 2013). Numerosi studi mettono in evidenza le proprietà biologiche, le tecniche di estrazione e le potenziali applicazioni tecnologiche nei settori alimentare, cosmetico e nutraceutico, dei fenoli estratti dalle vinacce e dagli

altri residui della filiera vitivinicola (Beres et al., 2017). Nel dettaglio, la ricerca si è incentrata sullo studio di applicazioni innovative per la valorizzazione dei residui della filiera come ad esempio la produzione di biogas, di estratti antiossidanti o estratti di natura proteica utilizzabili nel campo agro-alimentare. A fronte delle numerose applicazioni evidenziate dalle ricerche, il loro potenziale trasferimento tecnologico risulta ancora carente (Beres et al., 2017).

Il diradamento è una pratica di potatura verde che consiste nell'asportazione selettiva di specifici grappoli immaturi con lo scopo di garantire l'equilibrio vegeto-produttivo della pianta. Le uve immature derivanti dalle operazioni di diradamento non possiedono le caratteristiche idonee alla vinificazione e sono normalmente abbandonate in campo, come residuo della produzione. Le uve immature di bassa qualità sono tradizionalmente utilizzate per la produzione di salse acidule, come l'agresto, che mostrano elevata attività antiossidante (Öncül & Karabiyikli, 2015). Le uve immature ed il loro potenziale utilizzo innovativo come fonte di composti biologicamente attivi sono stati invece scarsamente studiate. Altri autori hanno proposto l'utilizzo di uve immature per ridurre il contenuto in alcol e pH di vini sperimentali Cabernet Sauvignon e Merlot (Kontoudakis, Esteruelas, Fort, Canals, & Zamora, 2011). Più recentemente, Tinello & Lante (2017) hanno studiato l'utilizzo di uve immature Barbera e Merlot come additivo per controllare l'imbrunimento enzimatico di alcuni prodotti vegetali. Gli utilizzi innovativi recentemente proposti e studiati dagli autori sopra citati, fanno riferimento a prove sperimentali condotte su piccola scala o su scala di laboratorio; da questo emerge che risultano necessari studi più approfonditi riguardo le loro potenziali applicazioni a livello industriale.

Questo progetto di dottorato si pone quindi l'obbiettivo generale di valorizzare le uve da diradamento che sono uno dei residui della filiera vitivinicola potenzialmente sfruttabili per ricavarne prodotti ad elevato valore aggiunto. A tale scopo le attività sperimentali sono state organizzate secondo i seguenti tre obiettivi: a) produzione industriale di estratti ad attività antiossidante; b) caratterizzazione chimico-fisica degli estratti ottenuti; c) utilizzo degli estratti su bevande e diverse matrici alimentari.

Per la produzione degli estratti a partire dalle uve immature è stato utilizzato un metodo di estrazione basato sull'utilizzo di un estrattore industriale, denominato "extraVelvet 1.0", brevettato dall'Università degli Studi di Firenze (Brevetto n° EP 2957627 - Gori, Menichetti & Fia, 2014), che è stato progettato per la conduzione di macerazioni a freddo e altre operazioni di cantina. La produzione degli estratti è stata realizzata nel corso di 3 annate diverse (2015-2016-2017) a partire da uve immature Sangiovese, Merlot e Viognier. Nel 2017, le uve immature Sangiovese sono state caratterizzate a tre stadi di sviluppo delle bacche. Gli estratti sono stati ridotti in forma secca mediante liofilizzazione e atomizzazione. Gli estratti sono stati caratterizzati per potere antiossidante, fenoli totali, profilo fenolico, antociani totali, vitamine idrosolubili, glutatione, pH, acidità totale, zuccheri e le polveri sono state caratterizzate dal punto di vista fisico per solubilità, attività dell'acqua, umidità ed igroscopicità. Gli estratti secchi sono stati utilizzati: a) come ingredienti funzionali in tre differenti prototipi alimentari vegetali: purea di barbabietole (zuccheri/pH basso/sapore dolce), purea di piselli (proteine/pH neutro/sapore dolce) e purea di patate (carboidrati/pH neutro/sapore neutro); b) come antiossidanti in vini bianchi e rossi nel test di ossidabilità (POM e IOA) in comparazione con solforosa, tannino enologico e acido ascorbico.

Negli estratti essiccati, i fenoli totali variavano da 8.7 a 20.4 mg di CAT eq/g di polvere e l'attività antiossidante da 16.0 a 33.8 µmol TEAC/g di polvere. Sono stati identificati acidi fenolici, flavonoli, flavanoli, procianidine, resveratrolo e glutatione. Tra le diverse classi fenoliche, gli acidi fenolici erano più concentrati rispetto agli altri composti. Gli estratti erano ricchi in quercetina-3-*O*-glucoside, kamferolo-3-*O*-glucoside, procianidine (B1-B2), (-)-epicatechina e (+)-catechina. Gli estratti Merlot e Viognier mostravano concentrazioni più elevate di glutatione sotto forma libera, rispetto all'estratto Sangiovese ottenuto nel 2015. Per la prima volta sono state identificate le vitamine idrosolubili nelle uve Sangiovese a diversi stadi di sviluppo della bacca e nel succo durante le fasi di estrazione. In particolar modo sono state identificate: piridossina, niacina, colina e acido pantotenico. La solubilità

dell'estratto secco Merlot era pari a 88.1 ± 1.2%, mentre i parametri di umidità e di attività dell'acqua a 25°C erano 8.1 ± 0.3% e 38.7 ± 0.1%, rispettivamente.

Il recupero dei fenoli d'uva immatura, l'attività antiossidante e il profilo sensoriale dei prototipi vegetali funzionalizzati variava in funzione della loro macro-composizione e della quantità di fenoli d'uva immatura aggiunti. Il recupero dei fenoli variava dal 45.7 al 90.4% e l'attività antiossidante da 3244 a 9282 µmol TEAC eq/kg di prototipo vegetale, indicando una buona estraibilità ed il mantenimento dell'attività biologica dei fenoli d'uva immatura dopo la funzionalizzazione. La purea di pisellini ha mostrato il miglior recupero in termini di fenoli rispetto alle altre puree, dovuto alle interazioni proteina-fenolo. A parità di fenoli aggiunti, l'attività antiossidante era significativamente più elevata nella purea di barbabietola rispetto alle altre puree funzionalizzate. Nel vino bianco, l'effetto protettivo degli estratti era simile a quello della SO_2 e migliore rispetto a quello del tannino commerciale. Nei vini rossi, l'effetto antiossidante degli estratti era simile a quello del tannino enologico, migliore rispetto a quello dell'acido ascorbico ma inferiore alla solforosa.

INDICE

1.0 INTRODUZIONE 21

1.1 I RESIDUI DI LAVORAZIONE DELLA FILIERA VITIVINICOLA 22

1.2 NORME LEGISLATIVE RIGUARDANTI I RESIDUI DI LAVORAZIONE 30

1.3 COMPOSIZIONE ED UTILIZZO DEI RESIDUI DELLA FILIERA VITIVINICOLA.. 35

1.3.1 I raspi 36
1.3.2 La vinaccia 40
1.3.3 Le bucce 43
1.3.4 I vinaccioli 46
1.3.5 Le fecce di fermentazione 50
1.3.6 Le uve da diradamento 52

1.4 I COMPOSTI BIOATTIVI DEI RESIDUI DELLA FILIERA VITIVINICOLA 60

1.4.1 Composti fenolici 62
1.4.1.1 Fenoli non flavonoidi 63
1.4.1.2 Fenoli flavonoidi 65
1.4.2 Acidi grassi 71
1.4.3 Vitamine 73
1.4.4 Sostanze minerali 74
1.4.5 Fibre alimentari 75

1.5 TECNICHE DI ESTRAZIONE 78

1.5.1 Tecniche convenzionali 79
1.5.1.1 Estrazione Soxhlet 79
1.5.1.2 Macerazione 81
1.5.1.3 Idrodistillazione 81
1.5.2 Tecniche non convenzionali 84
1.5.2.1 Estrazione mediante campo elettrico pulsato (PEF) 85
1.5.2.2 Estrazione mediante applicazione di scariche elettriche alto voltaggio (HVED) 87
1.5.2.3 Estrazione mediante riscaldamento pulsato (POH) 88
1.5.2.4 Estrazione mediante ultrasuoni (USN) 89
1.5.2.5 Estrazione microonde assistita (MAE) 91
1.5.2.6 Estrazione con liquido supercritico (SC-CO_2) 93
1.5.2.7 Estrazione mediante processo al alta pressione (HP) 94
1.5.2.8 Estrazione con solvente accelerata (ASE) 95
1.5.2.9 Estrazione assistita mediante solvente idrotropico 96

2.0 SCOPO 99

3.0 MATERIALI E METODI..... 101

3.1 UVE IMMATURE (UI)..... 101

3.2 PROCESSO DI PRODUZIONE (P) 104
3.2.1 Processo di produzione industriale A 107
3.2.2 Processo di produzione industriale B 109
3.2.3 Processo di produzione industriale C 109

3.3 ESTRATTI ANTIOSSANTI (EA) 110

3.4 USO DEGLI ESTRATTI 110
3.4.1 Prototipi alimentari vegetali (PAV)..... 111
3.4.1.1 Purea di barbabietole (PAVB) 111
3.4.1.2 Purea di pisellini (PAVP).....111
3.4.1.3 Purea di patate (PAVPA) 112
3.1.4.4 Funzionalizzazione dei PAV.....112
3.4.2 Vini (V) 113
3.4.2.1 Additivi Enologici (AE) 113
3.4.2.2 Prove su vino rosso S1 114

4.0 DETERMINAZIONI ANALITICHE..... 117

4.1 ESTRAZIONE DEI FENOLI 117

4.2 CARATTERIZZAZIONE CHIMICA 117
4.2.1 Analisi di base 117
4.2.2 Maturità fenolica 118
4.2.3 Intensità e Tonalità Colorante 118
4.2.4 Contenuto di antociani totali 119
4.2.5 Contenuto dei polifenoli totali..... 120
4.2.6 Determinazione del profilo fenolico e del glutatione mediante LC-HRMS 120
4.2.7 Determinazione del profilo delle vitamine idrosolubili mediante LC-HRMS..... 122
4.2.8 Attività antiossidante..... 123
4.2.9 Test di ossidabilità POM-Test..... 124
4.2.10 Test di ossidabilità IOA-Test..... 124

4.3 CARATTERIZZAZIONE FISICA..... 125
4.3.1 Attività dell'acqua..... 125
4.3.2 Umidità..... 125
4.3.3 Solubilità 125
4.3.4 Igroscopicità..... 125

4.4 VALUTAZIONI SENSORIALI **126**

4.5 ANALISI STATISTICA **128**

5.0 RISULTATI E DISCUSSIONE 131

5.1 CARATTERIZZAZIONE UVE **131**
5.1.1 Maturità fenolica 131
5.1.2 Composti antiossidanti delle bacche 134
5.1.3 Profilo delle vitamine idrosolubili 140

5.2 PRODUZIONE E CARATTERIZZAZIONE DEGLI ESTRATTI LIQUIDI **143**
5.2.1 Produzione e caratterizzazione degli estratti liquidi da uve immature sangiovese 143
5.2.1.1 Fase di estrazione 143
5.2.1.2 Caratteristiche degli estratti a fine lavorazione 156
5.2.2 Caratterizzazione di estratti liquidi proveniente da uve immature Merlot e Viognier 157

5.3 CARATTERIZZAZIONE CHIMCA E FISICA DEGLI ESTRATTI SECCHI **161**

5.4 PROTOTIPI ALIMENTI VEGETALI (PAV) : STUDIO DELLE PROPRIETÀ FUNZIONALI E SENSORIALI DEI FENOLI ESTRATTI DA UVA IMMATURA **169**
5.4.1 Fenoli da uve immature in soluzione acquosa 169
5.4.1.1 Caratterizzazione chimica e sensoriale 169
5.4.2 Fenoli da uva immatura in prototipi di alimenti vegetali (PAV) 173
5.4.2.1 Caratterizzazione chimica *173*
5.4.2.2. Caratterizzazione sensoriale *180*

5.5 AZIONE ANTIOSSIDANTE SUI VINI **186**
5.5.1 Prove sangiovese S1 192

6.0 CONCLUSIONI 199

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1. Produzione mondiale di vino (O.I.V, 2018). I dati sono espressi in milioni di ettolitri (Mhl).

Figura 2. Produzione di vino dei cinque Paesi maggiori produttori (O.I.V, 2018). I dati sono espressi in milioni di ettolitri (Mhl).

Figura 3. Generazione dei residui durante il ciclo vegetativo e nel processo di trasformazione uva-vino.

Figura 4. Struttura di flavonoidi e stilbeni (ε-viniferina) generalmente presenti nei raspi d'uva (Teixeira et al., 2018).

Figura 5. Attività enzimatica di A. fumigatus e A. niger in substrati di fermentazione solidi a 2-4-6-10-15 giorni. B = bucce d'uva, BG = bucce d'uva e grano, mB = bucce d'uva triturata, mBG = bucce d'uva e grano triturata.

Figura 6. Diagramma delle operazione per la produzione in laboratorio di "agresto" e "sour grape sauce" (Oncül & Karabiykly 2015).

Figura 7. Variazione di colore monitorato sulle chips di mela essiccate a seguito dei diversi pre-trattamenti di immersione (C, acqua distillata; AACA, soluzione di 1% (*w/v*) acido citrico e 1% (*w/v*) acido ascorbico; AS1, soluzione al 6% NatureSeal®, SM, soluzione al 0,1% (*w/v*) di metabisolfito di sodio; GJ, estratto ottenuto da uve acerbe). tl15, 15 minuti dopo il pre-trattamento a immersione a 25°C; td1080, 1080 min dopo l'essiccamento a 45°C; tcat15, 15 minuti dopo l'applicazione di 10 mmol/L catecolo a 25°C (Tinello, Mihaylova & Lante, 2018).

Figura 8. Gli acidi fenolici delle uve e dei vini.

Figura 9. Struttura di base dei fenoli flavonoidi.

Figura 10. 3,5,4'-triidrossistilbene o trans-resveratrolo.

Figura 11. Flavoni e flavonoli delle uve.

Figura 12. Struttura delle antocianidine delle uve e dei vini.

Figura 13. Struttura flavan-3-oli, precursori delle procianidine e dei tannini.

Figura 14. Meccanismo di reazione tra composti fenolici e ROS (Waterhouse & Laurie, 2006).

Figura 15. Estrattore Soxhlet; a) pallone con il solvente b) estrattore c) condensatore; 1) braccio laterale che permette il passaggio dei vapori del solvente al condensatore 2) sifone per lo svuotamento dell'estrattore 3) ditale contenente il composto da estrarre.

Figura 16. Rappresentazione schematica di un sistema di estrazione PEF in continuo (Barba et al., 2016)

Figura 17. Rappresentazione di un sistema di estrazione HVED su scala di laboratorio (Barba et al., 2016).

Figura 18. Rappresentazione schematica di un sistema di estrazione POH (Barba et al., 2016).

Figura 19. Principio del sistema di estrazione ad ultrasuoni assistita e fenomeno della cavitazione (Barba et al., 2016).

Figura 20. Estrazione mediante microonde assistita con meccanismo molecolare di rotazione (Barba et al., 2016).

Figura 21. Rappresentazione schematica del processo di estrazione ad alta pressione per il recupero di composti bioattivi nelle matrici vegetali (Barba et al., 2016).

Figura 22. Piano sperimentale delle attività del progetto.

Figura 23. Esterno ed interno del sistema di estrazione extraVelvet 1.0.

Figura 24. Diagramma di flusso delle operazioni condotte nel processo di produzione industriale (P). In arancione la materia prima utilizzata, in verde il processo di produzione applicato, in blu il prodotto finale del processo, in grigio il coadiuvante aggiunto ed in giallo i residui del processo.

Figura 25. Piano sperimentale delle attività svolte per la funzionalizzazione dei prototipi alimentari. Fra parentesi il contenuto in polifenoli totali (PFT) dell'estratto, della soluzione madre (SM) e dei PAV fortificati.

Figura 26. Piano sperimentale delle attività svolte sui campioni di vino.

Figura 27. Attività antiossidante e polifenoli totali nelle uve Sangiovese (2017) a tre fasi di sviluppo (26 Luglio, 21 Agosto, 22 Settembre).

Figura 28. Profilo delle vitamine idrosolubili delle uve a tre stadi di sviluppo delle bacche (26 Luglio, 21 Agosto, 22 Settembre).

Figura 29. PCA delle uve a diversi stadi di sviluppo della bacca (G1 = 26 Luglio, G2 = 21 Agosto, G3 = 22 Settembre).

Figura 30. Evoluzione dei polifenoli totali (PFT, A) e degli antociani (AnT, B) durante la fase di estrazione del processo PA (2015) e del processo PC (2017) per la produzione degli estratti liquidi UIS15PAL e UIS15PCL. I dati sono riportati come la media ± la deviazione standard. Lettere diverse indicano valori significativamente differenti [a,b,c,d].

Figura 31. Andamento della temperatura (°C) durante le fasi di estrazione nel processo di produzione PC.

Figura 32. Evoluzione del colore del succo Sangiovese 2017 nel corso dell'estrazione. Le barre indicano la deviazione standard. Lettere diverse indicano valori significativamente differenti [a,b,c,d,e].

Figura 33. Attività antiossidante durante il processo di estrazione. Le barre rappresentano la deviazione standard. Lettere diverse indicano valori significativamente differenti [a,b,c,d,].

Figura 34 . Profilo delle vitamine idrosolubili durante la produzione dell'estratto UIS17PCL. I valori sono riportati come la media ± la deviazione standard. Le barre rappresentano l'errore standard. Lettere differenti indicano valori significativamente differenti [a,b,c] .

Figura 35. Profilo degli acidi fenolici, flavanoli e procianidine (A), flavonoli e stilbeni (B) e glutatione (C) degli estratti UIM16PBEL, UIV16PBEL e UIS15PAEA. Le barre rappresentano la deviazione standard.

Figura 36. Isoterma di adsorbimento dell'estratto secco a 25°C; dati sperimentali ( );

Figura 37. Relazione tra i polifenoli totali e l'attività antiossidante di UIM16PBEL in soluzioni acquose. I dati sono riportati come la media ± la deviazione standard; (n = 3)

Figura 38. Intensità media delle sensazioni target nelle soluzioni acquose dell'estratto UIM16. Le barre rappresentano le deviazioni standard.

Figura 39. Polifenoli totali (PFT) dosati nei PAV funzionalizzati con dosi crescenti (0.00 – 0.21 – 0.44 – 1.11 – 1.93 g/kg di purea, peso fresco) di fenoli d'uva immatura. Le

barre rappresentano le deviazioni standard. Lettere differenti indicano valori significativamente differenti ($p < 0.001$).

Figura 40. Valori medi di recupero (%) dei fenoli da PAVB, PAVP e PAVPA funzionalizzati con dosi crescenti (0.21 – 0.44 – 1.11 e 1.93 g/kg di purea, peso fresco) di fenoli d'uva immatura. Le barre rappresentano la deviazione standard. Lettere differenti indicano valori significativamente differenti ($p \leq 0.001$).

Figura 41. Percentuale di ciascuna classe fenolica identificata negli estratti da UIM16 e nei PAV funzionalizzati con la massima concentrazione di estratto (1.93 g/kg).

Figura 42. Attività antiossidante dosata negli estratti UIM16 e dei PAV funzionalizzati con dosi crescenti (0.00 – 0.21 – 0.44 – 1.11 – 1.93 g/kg di purea, peso fresco) di fenoli di UI. Le barre rappresentano le deviazioni standard. Lettere diverse indicano valori significativamente differenti ($p \leq 0.001$).

Figura 43. Intensità media delle sensazioni target nel PAVB con diverse concentrazioni di fenoli da UIM16. Le barre rappresentano le deviazioni standard.

Figura 44. Intensità media delle sensazioni target nel PAVP con diverse concentrazioni di fenoli da UIM16. Le barre rappresentano le deviazioni standard.

Figura 45. Intensità media delle sensazioni target nel PAVPA con diverse concentrazioni di fenoli da UIM16. Le barre rappresentano le deviazioni standard.

Figura 46. Effetto della matrice vegetale sull'intensità percepita delle sensazioni di acido e dolce dei PAV funzionalizzati con diverse concentrazioni di estratto UIM16PBEL.

Figura 47. IOA test su i vini rossi (R1, R2, S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9). In azzurro è evidenziato il range di ossidabilità dal 40 al 60%.

Figura 48. POM test eseguito sui vini bianchi (B1, B2, B3, C, V, M). In azzurro è evidenziato il range di ossidabilità dal 40 al 60%.

Figura 49. Risultati del test IOA eseguito sui vini rossi addizionati con i diversi prodotti antiossidanti. Vini rossi (R1, R2, S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9), vino non trattato (TQ), acido ascorbico (AA), tannino (T), anidride solforosa (SO2), estratti da uva immatura (UIM16PBEL, UIV16OBEL, UIS15PAEA).

Figura 50. Risultati del test POM eseguito sui vini bianchi addizionati con i diversi prodotti antiossidanti. Vini bianchi (B1, B2, B3, C, V, M), vino non trattato (TQ),

acido ascorbico (AA), tannino (T), anidride solforosa (SO2), estratti da uva immatura (UIM16PBEL, UIV16OBEL, UIS15PAEA).

Figura 51. Acidità volatile (g/L di acido acetico), acidità totale (g/L di acido tartarico), pH e grado alcolico (% p/v) dei campioni Tq, A, B, C.

Figura 52. Polifenoli totali (A) in g/L e attività antiossidante (B) in µmol TEAC/ L dei campioni Tq, A, B, C. Le barre rappresentano la deviazione standard.

Figura 53. IOA test (%) dei campioni Tq, A, B, C all'inizio (A) e dopo tre mesi (B) di maturazione in acciaio.

1.0 INTRODUZIONE

1.1 I RESIDUI DI LAVORAZIONE DELLA FILIERA VITIVINICOLA

La vite, in particolare la specie *Vitis vinifera,* è una delle colture più diffuse in tutto il mondo (Grimplet, Deluc, Cramer, & Cushman, 2007).

Negli ultimi anni si è assistito ad un'oscillazione della produzione di uva fresca a livello globale; FAOSTAT attesta che dal 2013 al 2017 la produzione di uva è diminuita di circa 2.73 milioni di tonnellate ma con diversi andamenti nei primi cinque Paesi produttori di uva: Cina, Italia, Usa, Spagna e Francia (Tab.1). Annualmente, circa il 35% del quantitativo totale di uva fresca prodotta è rappresentato da uva da tavola, il 1.5% da uva passa ed il restante 63% da uva destinata alla produzione di vino (O.I.V, 2018).

Tabella 1. Quantità di uva fresca prodotta a livello mondiale e nei cinque Paesi maggiori produttori, dal 2013 al 2018 (FAOSTAT,2018). I dati sono espressi in milioni di tonnellate (Mton).

PRODUZIONE UVA FRESCA milioni di tonnellate (Mton)	2013	2014	2015	2016	2017	2018 (previsione)
MONDO	77.00	74.77	76.33	74.99	74.27	80
CINA	11.64	12.67	13.25	12.71	13.71	-
ITALIA	8.01	6.93	7.92	8.20	7.17	-
FRANCIA	5.54	6.20	6.26	6.25	5.91	-
SPAGNA	7.48	6.25	5.79	5.95	5.39	-
USA	7.83	7.15	6.96	7.23	6.68	-

Nonostante la diminuzione di uva prodotta a livello mondiale, la Cina e la Francia hanno incrementato rispettivamente del 12% e del 7% la loro produzione interna dal 2013 al 2017, mentre Spagna, Stati Uniti d'America e Italia hanno invece seguito

l'andamento generale, subendo rispettivamente un decremento di produzione pari al 28%, 15% e 11%.

Analogamente alla produzione di uva, la produzione di vino ha riscontrato un'oscillazione quantitativa. Nel 2018 è stata stimata una produzione mondiale di vino molto elevata, pari a 282 Mhl, dopo un raccolto 2017 particolarmente basso. La produzione vitivinicola 2018 è stata stimata una delle più elevate dal 2000 assieme a quella degli anni 2004 e 2013 (Fig.1).

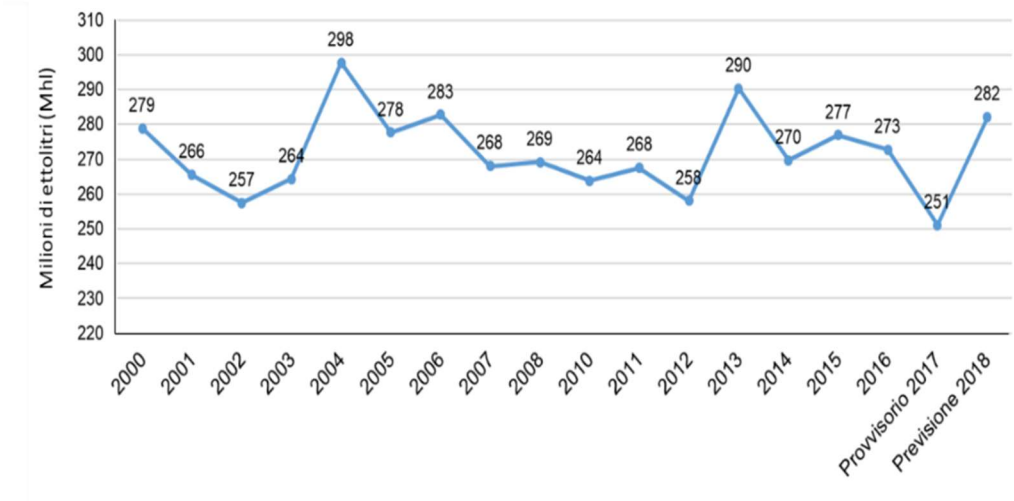


Figura 1. Produzione mondiale di vino (O.I.V, 2018). I dati sono espressi in milioni di ettolitri (Mhl).

L'andamento della produzione di vino degli ultimi 6 anni (2013-2018) nei Paesi maggiori produttori è mostrato nella Figura 2. Si sono confermati come maggiori produttori di vino l'Italia, la Francia, gli Stati Uniti d'America, la Spagna e l'Argentina.

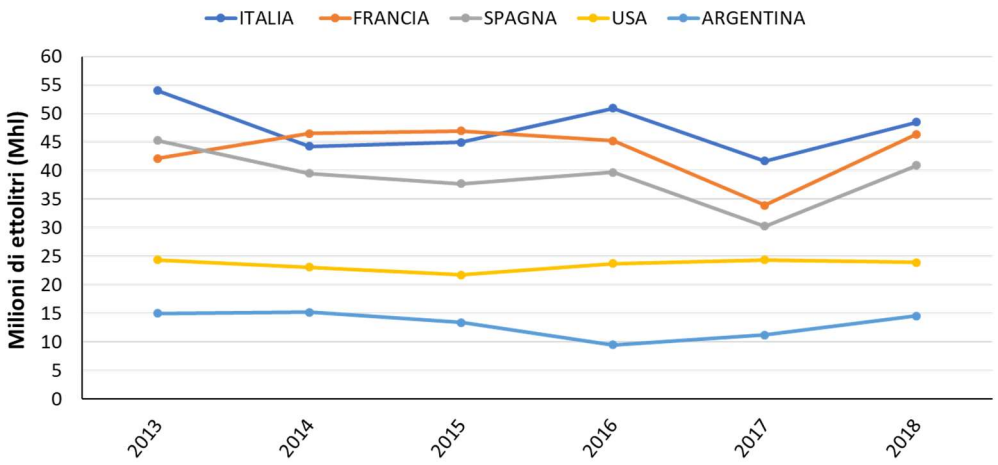


Figura 2. Produzione di vino dei cinque Paesi maggiori produttori (O.I.V, 2018). I dati sono espressi in milioni di ettolitri (Mhl).

Nei principali Paesi produttori europei le stime della produzione 2018 sono state maggiori rispetto a quelle dell'anno precedente (+ 19%). In Italia la produzione è cresciuta del 14% rispetto al 2017 e ha raggiunto quota 48.5 Mhl, in linea con la media quinquennale. In Francia (46.4 Mhl) e in Spagna (40.9 Mhl), con crescite rispetto al 2017 del 27% e del 26%, i livelli stimati sono stati superiori alla media degli ultimi cinque anni. Gli Stati Uniti d'America, con 23.9 Mhl vinificati (- 2% rispetto al 2017), hanno registrato per il terzo anno consecutivo un livello di produzione elevato, confermandosi nella loro posizione di quarto produttore mondiale. In America del Sud, l'Argentina, dopo due anni di produzione molto scarsa, ha ritrovato nel 2018 un livello elevato di produzione pari a 14.5 Mhl, con un aumento del 23% rispetto al 2017.

Focalizzando l'attenzione sull'Italia, numerose sono le Regioni caratterizzate da una elevata produzione di vino (ISTAT, 2018). Tra queste, Piemonte, Puglia, Sicilia, Toscana, Veneto ed Emilia Romagna sono le maggiori produttrici. All'interno di questa classificazione, le Regioni vengono suddivise in funzione della qualità dei vini prodotti appartenenti alle denominazioni DOC, IGT e Tavola. Nel 2017 la Toscana è risultata essere la Regione con il maggior numero di DOC rosse immesse sul mercato (ISTAT, 2018). I dati relativi alla produzione di uva da vino nella Regione Toscana sono mostrati nella Tabella 2.

Tabella 2. Quantità di uva e stima dei residui di lavorazione prodotti nel 2013, 2014, 2016 e 2017 in Toscana.

ANNATA	UVA (q)	VINO FECCIOSO (hL)	VINACCIA (q)	FECCE (hL)
2013	3230000	2300000	387600	115000
2014	3700000	2700000	444000	135000
2016	3600000	2630000	432000	131500
2017	2300000	1630000	276000	81500

La produzione di uva in Toscana ha seguito lo stesso andamento della produzione di uva a livello mondiale, con un 2017 segnato da un raccolto molto basso dovuto alle particolari condizioni climatiche di tale annata, caratterizzata da temperature elevate e scarsissima piovosità; il calo di produzione è stato di circa il 30% rispetto a quello della stagione 2016 (Tab.2).

La filiera vitivinicola genera una elevata quantità di residui di lavorazione. La Tabella 3 mostra le stime della quantità annua di residui, basata su una resa media di uva in vino dell'80% (Mildner-Szkudlarz, Siger, Szwengiel & Bajerska, 2015). Solo in Italia, Spagna e Francia si stima vengano prodotti annualmente una media di 4 milioni di tonnellate di residui di lavorazione, circa il 30% della produzione a livello mondiale.

Tabella 3. Stima dei residui di lavorazione prodotti annualmente a livello mondiale e nei tre principali Paesi Europei produttori di vino.

RESIDUI PRODOTTI milioni di tonnellate (Mton)	2013	2014	2015	2016	2017	2018 (previsione)
MONDO	15.41	14.90	15.27	14.99	14.85	16.00
ITALIA	1.60	1.38	1.58	1.64	1.43	-
FRANCIA	1.11	1.24	1.25	1.25	1.18	-
SPAGNA	1.49	1.25	1.16	1.19	1.08	-

Nel caso specifico della Regione Toscana i principali residui di lavorazione sono la vinaccia e le fecce, ottenuti rispettivamente da uva e vino feccioso (Tab.2). La quantità di vinaccia prodotta varia dal 11% al 13% dell'uva totale, mentre il quantitativo percentuale di feccia oscilla tra il 2% ed il 5%. Le elevate temperature e la scarsa piovosità, che hanno caratterizzato la stagione del 2017, hanno portato alla maturazione di acini con un rapporto vinaccia/succo più elevato rispetto alle annate caratterizzate da condizioni climatiche normali. Conseguenza di questo andamento è stata una produzione di residui più elevata rispetto alla quantità media riscontrata nelle annate precedenti. Il quantitativo di vinaccia si è attestato infatti intorno al 12.89% dell'uva totale contro un 12% medio annuale e la feccia ha superato la media annuale del 5% (5.3%) del vino feccioso prodotto (Tab.2).

I principali residui della filiera vitivinicola (Oliveira, Salvador, Smănia, Maraschin & Ferreira, 2013) sono rappresentati dai residui di potatura (sarmenti, raspi e foglie), dai residui organici della vinificazione (vinacce, vinaccioli, polpa e bucce), dalle acque reflue e dai residui inorganici dei diversi trattamenti che il vino subisce nel corso della elaborazione (terra di diatomea, bentonite e perlite) (Fig.3).

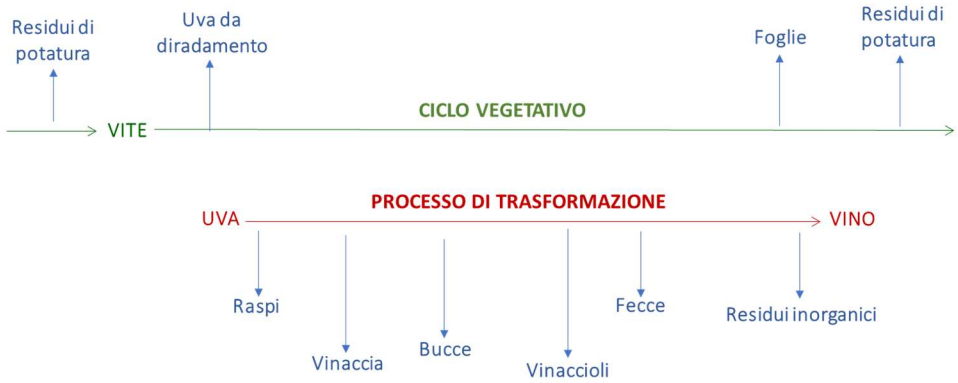


Figura 3. Generazione dei residui durante il ciclo vegetativo e nel processo di trasformazione uva-vino.

L'impatto ambientale negativo che i residui hanno, la crescente domanda per una produzione sempre più rispettosa dell'ambiente e la sfida di ottenere efficienza operativa riducendo al minimo i costi di produzione e di trattamento dei residui hanno spostato il settore vitivinicolo verso l'adozione di una filiera sempre più sostenibile (Brito et al., 2007).

Un processo di vinificazione per essere sostenibile deve massimizzare le risorse ricavabili dai residui e ridurre le emissioni generate durante i processi produttivi. Per dare un'idea dell'impatto della filiera vitivinicola nel campo delle emissioni di gas serra, il settore del vino è responsabile, su scala globale, di circa lo 0.3% di tali emissioni (Beres et al., 2017). Gli stessi Autori attestano che la coltivazione dell'uva contribuisce in media del 41% agli impatti ambientali totali, principalmente a causa

dell'utilizzo di pesticidi, fertilizzanti e combustibili; tra questi, i trasporti contribuiscono con una media del 32% a tale impatto ambientale (Beres et al., 2017). Il maggior numero e quantità di residui di lavorazione vengono prodotti durante il periodo di vendemmia, ma questo non significa che il problema dello smaltimento e del recupero di essi non sia una costante fissa durante tutto l'anno. Le acque utilizzate per il lavaggio delle uve, dei locali e delle attrezzature costituiscono un residuo di lavorazione. Le acque reflue della cantina sono altamente inquinanti a causa dell'elevato contenuto di sostanza organica, del basso pH, della salinità, dell'eventuale presenza di soda e del contenuto in sodio, potassio, fosforo e metalli pesanti. La quantità delle acque reflue può variare in relazione alla tipologia di vino o di prodotto che si desidera ottenere e dalle pratiche più o meno efficienti di risparmio idrico adottate dall'azienda stessa (Spigno, Marinoni & Garrido, 2017).
I residui solidi o semi-solidi prodotti durante il processo di vinificazione, quali raspi, vinacce e fecce, presentano delle caratteristiche compositive specifiche che richiedono un trattamento adeguato prima di essere utilizzati (Bustamante et al., 2005). Le fecce e le vinacce, sia per motivi legislativi che per un ritorno economico, sono state tradizionalmente inviate alla distillazione per la produzione di grappa o più in generale di distillati, producendo a loro volta un altro residuo, la vinaccia esausta. Tuttavia, fino a pochi anni fa, nonostante l'onere della tassa di smaltimento imposta dalle specifiche autorità, i piccoli produttori di vino preferivano generare dalla feccia e dalla vinaccia, unite ai raspi, un residuo organico piuttosto che inviarle alla distilleria. Il costo della tassa era calcolato in relazione alla natura, alle caratteristiche e al grado di contaminazione ambientale dei residui, inclusa la loro tossicità. Attualmente, vista la maggiore ricerca di soluzioni economicamente valide per il riciclaggio e/o la valorizzazione dei residui di lavorazione, il costo di smaltimento degli stessi è aumentato notevolmente, costringendo i produttori a sperimentare soluzioni maggiormente sostenibili (Devesa-Rey et al., 2011). Non solo, se fino al 2008 la legge dava la possibilità ai produttori di conferire le vinacce

e le fecce esclusivamente alla distilleria, la nuova legislazione offre anche la possibilità di un uso alternativo dei residui di lavorazione.

1.2 NORME LEGISLATIVE RIGUARDANTI I RESIDUI DI LAVORAZIONE

E' consuetudine considerare un residuo di lavorazione come un sottoprodotto (i.e. by-product) o come un rifiuto (i.e. waste) in funzione del suo destino di essere riutilizzato oppure inviato a depuratori/centri di raccolta dei rifiuti.

L'articolo 183, comma 1- lettera "a", del decreto legislativo 152/2006 (decreto legislativo del 3 Aprile 2006, n° 152 : Norme in materia Ambientale) definisce rifiuto una *"qualsiasi sostanza od oggetto di cui il detentore si disfi o abbia l'intenzione o abbia l'obbligo di disfarsi"*. Per distinguere tutti quei residui di produzione che non divengono rifiuti, l'articolo 184-bis dello stesso decreto, definisce la nozione di sottoprodotto come segue: "*È un sottoprodotto e non un rifiuto ai sensi dell'articolo 183, comma 1, lettera a), qualsiasi sostanza od oggetto che soddisfi tutte le seguenti condizioni:*

I. *la sostanza o l'oggetto è originato da un processo di produzione, di cui costituisce parte integrante, e il cui scopo primario non è la produzione di tale sostanza od oggetto;*
II. *è certo che la sostanza o l'oggetto sarà utilizzato, nel corso dello stesso o di un successivo processo di produzione o di utilizzazione, da parte del produttore o di terzi;*
III. *la sostanza o l'oggetto può essere utilizzato direttamente senza alcun ulteriore trattamento diverso dalla normale pratica industriale;*
IV. *l'ulteriore utilizzo è legale, ossia la sostanza o l'oggetto soddisfa, per l'utilizzo specifico, tutti i requisiti pertinenti riguardanti i prodotti e la protezione della salute e dell'ambiente e non porterà a impatti complessivi negativi sull'ambiente o la salute umana*.

Le condizioni previste dalla norma legislativa devono tutte sussistere, la mancanza di una sola di esse comporta, inevitabilmente, l'assoggettamento del materiale alla disciplina sui rifiuti.

Per facilitare la comprensione delle nozioni sopra riportate, in data 2 Marzo 2017 è entrato in vigore il Decreto del Ministero dell'Ambiente 264/2016 (Decreto del Ministero dell'Ambiente del 13 Ottobre 2016, n° 264, "Regolamento recante criteri indicativi per agevolare la dimostrazione della sussistenza dei requisiti per la qualifica dei residui di produzione come sottoprodotti e non come rifiuti").

Esso definisce nell'articolo 2:

I. *prodotto: ogni materiale o sostanza che è ottenuto deliberatamente nell'ambito di un processo di produzione o risultato di una scelta tecnica. In molti casi è possibile identificare uno o più prodotti primari.*
II. *residuo di produzione: ogni materiale o sostanza che non è deliberatamente prodotto in un processo di produzione e che può essere o non essere un rifiuto.*
III. *sottoprodotto: un residuo di produzione che non costituisce un rifiuto ai sensi dell'articolo 184 bis del Dlgs 152/2006.*

Il suddetto decreto sottolinea che il regime dei sottoprodotti deve contribuire alla dissociazione della crescita economica della produzione dei rifiuti, in quanto favorisce l'innovazione tecnologica per il riutilizzo dei residui di lavorazione nello stesso o nel successivo ciclo produttivo.

Nel settore vitivinicolo per poter gestire la grande quantità di residui di lavorazione generati nel processo di produzione e per adempiere in maniera corretta al loro smaltimento, il produttore o chi per lui deve far riferimento anche al Decreto ministeriale del Ministero delle Politiche Agricole, Ambientali e Forestali n. 5396 del 27 Novembre 2008 "Disposizioni di attuazione dei regolamenti CE n. 479/2008 del Consiglio e CE n. 555/2008 della Commissione per quanto riguarda l'applicazione della misura della distillazione dei sottoprodotti della vinificazione".

Nello specifico l'articolo 3 afferma che:

1. La consegna ai distillatori o il ritiro sotto controllo è effettuata:

- *per le vinacce, entro 30 giorni dalla fine del periodo vendemmiale determinato annualmente con il provvedimento delle Regioni e Province autonome;*
- *per le fecce, entro 30 giorni dal loro ottenimento e comunque entro il 31 luglio di ciascuna campagna.*

L'articolo 2 identifica invece coloro che sono obbligati a effettuare tale consegna e coloro che, al contrario, ne sono esonerati, con i seguenti termini:

2. Ai sensi dell'articolo 14 della legge n. 82 del 20 febbraio 2006, i produttori e coloro che abbiano proceduto ad una qualsiasi trasformazione delle uve da vino sono obbligati alla consegna dei sottoprodotti ottenuti (fecce e vinacce) ad un distillatore o, nei casi indicati al successivo art. 5, al ritiro sotto controllo.

3. *Sono esonerati sia dall'obbligo di consegna in distilleria dei sottoprodotti che dall'obbligo del loro ritiro sotto controllo i produttori che producono nei propri impianti un quantitativo di vino o di mosto fino a 25 hl.*

L'articolo 5 dello stesso decreto tratta inoltre dell'utilizzo alternativo della vinaccia e della feccia, nel caso il produttore non scelga di effettuare la consegna dei sottoprodotti in distilleria, ma opti per il ritiro sotto controllo. Secondo tale articolo: "*I produttori sono esonerati dall'obbligo di consegna dei sottoprodotti, ma obbligati al ritiro sotto controllo, qualora la distillazione rappresenti un onere sproporzionato. Fra questi ritroviamo coloro che hanno una produzione nei propri impianti di vino o di mosto compresa tra i 25 hl ed i 100 hl, coloro che praticano il metodo di produzione biologico delle uve da vino destinate alla produzione di vino e mosti".*

Allo scopo di rendere più chiari gli utilizzi alternativi dei sottoprodotti, il suddetto articolo è stato modificato dal Decreto del Ministero delle Politiche Agricole, Ambientali e Forestali n° 7407 del 2010. Il ritiro sotto controllo è consentito a tutti i vinificatori senza limitazioni quantitative secondo i seguenti usi alternativi:

a) Uso agronomico diretto, mediante la distribuzione dei sottoprodotti nei terreni agricoli, nel limite di 3.000 kg per ettaro di superficie agricola risultante nel fascicolo aziendale, a condizione di un espresso impegno ad utilizzare i sottoprodotti stessi per uso agronomico;

b) Uso agronomico indiretto, mediante l'utilizzo dei sottoprodotti per la preparazione di fertilizzanti;

c) Uso energetico, mediante l'utilizzo dei sottoprodotti quale biomassa per la produzione di biogas o per alimentare impianti per la produzione di energia, utilizzati anche congiuntamente ad altre fonti energetiche destinabili alla produzione di biogas o biomasse combustibili;

d) Uso farmaceutico, mediante l'utilizzo dei sottoprodotti per la preparazione di farmaci;

e) Uso cosmetico, mediante l'utilizzo dei sottoprodotti per la preparazione di cosmetici.

Secondo tale articolo sono considerate uso alternativo anche le vinacce destinate all'estrazione di enocianina o alla produzione di prodotti agroalimentari, così come i sottoprodotti ottenuti dalla trasformazione delle uve da vino in prodotti diversi dal mosto e dal vino. Inoltre, il produttore, che decide di destinare i sottoprodotti agli usi alternativi, ha il dovere di comunicare tale decisione, almeno entro il quarto giorno antecedente l'inizio delle operazioni di ritiro, all'ufficio territorialmente competente dell'Ispettorato Centrale della tutela della Qualità e Repressioni Frodi dei Prodotti Agroalimentari (ICQRF), compilando il modello allegato 2-bis al decreto.

Da quanto letto e definito dalle norme vigenti riguardo la definizione di rifiuto e sottoprodotto, è possibile sostenere che la scelta di effettuare un ritiro sotto controllo piuttosto che la consegna in distilleria, dovrebbe essere, nei limiti del possibile, privilegiata. Il produttore opterebbe infatti per un utilizzo alternativo dei sottoprodotti della filiera, che consentirebbe un recupero di sottoprodotti ad elevato valore aggiunto ed un loro riutilizzo in molteplici settori con la capacità di portare benefici sia all'ambiente che alla salute del consumatore.

1.3 COMPOSIZIONE ED UTILIZZO DEI RESIDUI DELLA FILIERA VITIVINICOLA

I residui generati dalla filiera vitivinicola che destano maggiore interesse per le loro caratteristiche fisico-chimiche e, di conseguenza, per il loro potenziale utilizzo sono mostrati nella Tabella 4.

Tabella 4. Utilizzo convenzionale ed innovativo/alternativo dei principali residui della filiera vitivinicola.

RESIDUI	USO CONVENZIONALE	USO INNOVATIVO / ALTERNATIVO	RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI
RASPI	COMPOST UTILIZZO IN CAMPO	SUBSTRATI FERMENTAZIONE BIOMASSA ESTRATTI ANTIOSSIDANTI	Pronzil et al. (2012-2014); Spigno et al. (2008-2013b-2017) ; Teixeira et al (2018); Ping et al (2011); Zouboulis et al (2002); Anastasiadi et al. (2012); Kumar et al. (2009).
VINACCIA	DISTILLATI AGENTE COLORANTE COMPOST	SUBSTRATI FERMENTAZIONE BIOMASSA ESTARTTI ANTIOSSIDANTI	Amendola et al. (2010); Spigno et al. (2013-2017); Mokochinski et al. (2015); Burg et al. (2014); Fabbri et al.(2015); Da Ros et al. (2016); Katalinic et al.(2010); Garcia-Lomillo et al. (2016)
BUCCE	DISTILLATI AGENTE COLORANTE COMPOST	SUBSTRATI FERMENTAZIONE BIOMASSA ESTARTTI ANTIOSSIDANTI	Spigno et al. (2017); Romo-Sanchez et al. (2015); Deng et al. (2011); Pinelo et al.(2006)
VINACCIOLI	OLIO DI VINACCIOLI	ESTRATTI ANTIOSSIDANTI ESTRATTI PROTEICI	Fiori et al. (2014); Pinelo et al.(2016); Ignea et al. (2013); Spigno et al.(2017); Vincenzi et al. (2013); Pardo et al.(2009); Aghamirzaei et al. (2015); Mohamed et al.(2016); Hogervorst et al.(2017)
FECCE	DISTILLATI ACIDO TARTARICO AGENTE COLORANTE	SUBSTRATI FERMENTAZIONE ESTRATTI ANTIOSSIDANTI ESTRATTI PROTEICI BIOCHAR	Dimou et al. (2015); Teixeira et al.(2014); Delegado de la Torre et al. (2015); Mazauric et al. (2006); Escott et al. (2001); Sharma et al. (2015); Rosi et al.(1999); Hogervorst et al.(2017); Del Barrio-Galán et al.(2011); Zhu et al. (2016); Fia et al. (2014-2016); Serradilla et al.(2008); Gonzalez-Marco et al.(2006)
UVE IMMATURE / UVE DA DIRADAMENTO	'AGRESTO' / VERIJUICE	ESTRATTI ANTIOSSIDANTI	Tinello & Lante (2017; 2018); Kontoudakis et al. (2011); Oncul & Karabiyikli (2015)

1.3.1 I raspi

Uno dei principali residui solidi della filiera vitivinicola è rappresentato dallo 'scheletro' del grappolo, ossia il raspo (Ping, Brosse, Sannigrahi, & Ragauskas, 2011). I raspi, che derivano dalle operazioni di diraspatura, rappresentano il 14% circa in peso del totale dei residui solidi ottenuti durante il processo di vinificazione ed il 3 - 5% dell'uva trasformata in vino. La diraspatura è un'operazione effettuata subito prima o contemporaneamente alla pigiatura delle uve subito dopo il trasferimento dalla vigna alla cantina, mediante apparecchiature denominate diraspa-pigiatrici.

I raspi sono un residuo lignocellulosico, le cui componenti principali sono: lignina (17 – 26%), cellulosa (20 – 30%), emicellulosa (3 -20%) e ceneri (6 – 9%) (Prozil, Evtuguin & Lopes, 2012; Spigno, Maggi, Amendola, Dragoni & De Faveri, 2013a). Se comparati ad altre materie prime lignocellulosiche, come ad esempio legno decorticato o residui di altre colture annuali, i raspi d'uva hanno una maggiore concentrazione di proantocianidine (tannini condensati), costituite principalmente da unità monomeriche di flavan-3-oli (Ping et al., 2011).

Diversi sono gli utilizzi convenzionali e/o alternativi a cui i raspi sono destinati. In Italia, circa il 76% dei raspi residui è ancor oggi destinato principalmente ad un utilizzo convenzionale riguardante sia l'uso agronomico che comprende lo spargimento in campo dei raspi che come materiale di compostaggio (Spigno et al, 2017).

Numerosi studi sono stati effettuati sul possibile utilizzo dei raspi. Gran parte della ricerca si è concentrata sull'utilizzo dei raspi sia come materiale adsorbente per la rimozione di alcuni composti tossici che nei processi di compostaggio, senza distinzioni in relazione alla cultivar o alle pratiche di coltivazione (Spigno et al., 2013a).

Zouboulis, Lazaridis & Matis (2002) hanno utilizzato i raspi d'uva per diminuire la concentrazione di metalli pesanti nelle acque reflue. L'esperimento ha previsto due fasi consecutive: l'adsorbimento dei metalli da parte della biomassa utilizzata (raspi) e la separazione dei raspi caricati con i metalli adsorbiti mediante flottazione. Tali Autori hanno osservato una rimozione del 100% , dell' 85% e del 70% in rame, zinco e nichel rispettivamente nelle acque reflue con un pH pari a 6.0.

Recentemente, i raspi sono stati selezionati come potenziali fonti di composti ad alto valore aggiunto. L'elevato contenuto in composti fenolici, principalmente tannini ed emicellulosa, rendono i raspi una potenziale fonte di composti antiossidanti e di zuccheri fermentescibili (Ping, et al., 2011; Prozil, et al., 2012). Visti i pochi studi sull'influenza della cultivar sulle caratteristiche chimico-fisiche dei raspi, Spigno, et al. (2013a) hanno dimostrato come la cultivar influenzi in modo significativo il frazionamento lignocellulosico della materia prima. Il frazionamento lignocellulosico è una operazione che permette di separare, attraverso diverse tecniche tali idrolisi acida, idrolisi basica e/o sbiancamento mediante l'utilizzo di acqua ossigenata, le diverse componenti dei raspi quali glucosio, fruttosio, xilosio, composti fenolici, acido acetico, lignina e contenuto in cellulosa. Gli stessi Autori hanno dimostrato che, a seconda della cultivar, è possibile recuperare dal 9% al 24% della componente monosaccaridica in termini di glucosio, fruttosio e xilosio. I composti antiossidanti presenti nei raspi erano anch'essi diversi in relazione alla cultivar di provenienza; differenze significative sono state trovate anche nella proprietà dei tannini ed in particolare nelle reazioni di condensazione tannino-lignina di raspi provenienti da cultivar a bacca rossa (*Vitis vinfera*) (Prozil, et al., 2014).

Teixeira, Mateus, de Freitas, & Oliveira (2018) hanno studiato la composizione fenolica di raspi provenienti da cultivar a bacca rossa della zona del Douro (Fig.4). Gli Autori hanno studiato quantitativamente e qualitativamente la composizione fenolica dei raspi attraverso sistemi di estrazione solido-liquido condotti a diverse condizioni. Tali residui risultavano ricchi in procianidine, antocianine, flavonoli e flavanoli. Nel dettaglio, la malvidina-3-*O*-cumarilglicoside era l'unica antocianina

indentificata nei raspi. Nella zona del Douro infatti, tale antocianina è la seconda maggiormente presente nelle cultivar a bacca rossa. Tra i flavonoidi sono stati identificati la quercetina gluconoride e il campferolo glucoside. L'acido caftarico è stato il solo acido fenolico ad essere identificato. Un composto fenolico è stato osservato per la prima volta nei raspi d'uva, il crisoeriolo-malonil-apiosil-glucoside, appartenente alla classe dei flavoni (Teixeira et al., 2018).

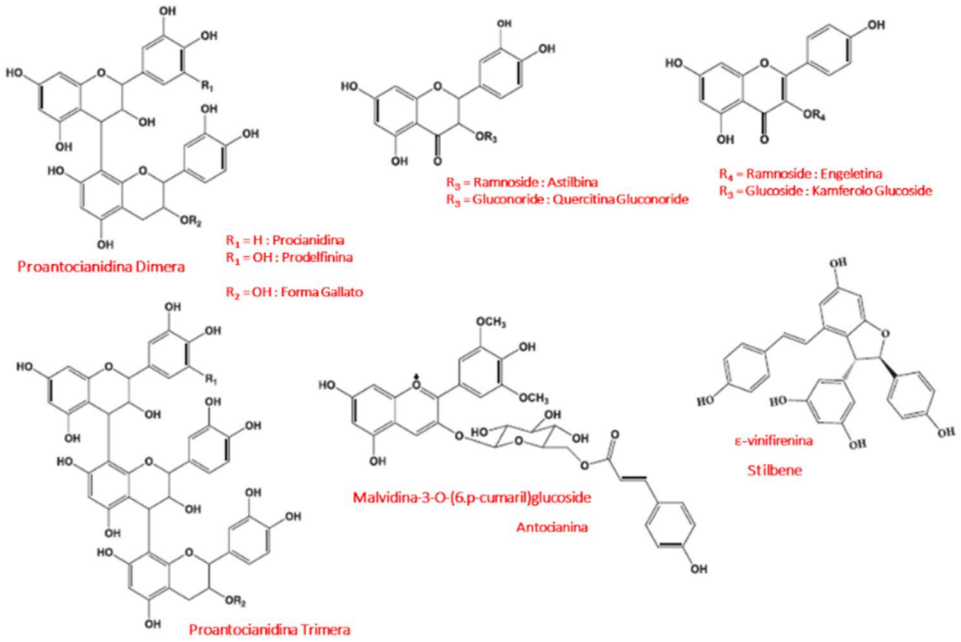


Figura 4. Struttura di flavonoidi e stilbeni (ε-viniferina) generalmente presenti nei raspi d'uva (Teixeira et al., 2018).

L'attività antiossidante di estratti ottenuti da raspi di cultivar a bacca rossa (Mandilaria, Mavrotragano & Voidomatis) ed a bacca bianca (Asyrtiko, Athiri & Aidani), provenienti dall'isola greca Santorini, è stata studiata da Anastasiadi, Pratsinis, Kleatsas, Skaltsounis & Haroutounian (2012) mediante i test di DPPH e FRAP. Per la produzione degli estratti, una quantità pari a 10 gr di raspi sotto forma di polvere è stata estratta utilizzando come solvente MeOH/H_2O/HCl (90:9.5:0.5) e

successivo allontanamento del solvente mediante filtrazione ed evaporazione. Gli stessi Autori hanno studiato anche la capacità degli estratti di inibire l'ossidazione delle proteine LDL e la riduzione del livello di radicali liberi (ROS) presenti a livello cellulare. I risultati di questa ricerca hanno evidenziato come tutti gli estratti mostrassero una elevata capacità antiossidante e come essa non variasse in funzione della cultivar, ma bensì dal contenuto fenolico della bacca. La capacità di inibire l'ossidazione delle proteine LDL era direttamente correlata all'attività antiossidante degli estratti e di conseguenza alle proprietà di "*scavenging*" radicale dei singoli composti fenolici. Per quanto riguarda la capacità di ridurre i livelli di ROS nelle cellule, gli estratti hanno mostrato una marcata variabilità in relazione alle diverse cultivar di provenienza (Anastasiadi et al., 2012).

La crescente ricerca di fonti di energia rinnovabili a minor impatto ambientale spinge il mercato agro-industriale verso la ricerca di materiale "*green*" per la produzione di energia. Materiali lignocellulosici come i residui agricoli di diverse colture (i.e raspi, vinaccia, mais, grano) sono fonti energetiche rinnovabili. Tali residui sono infatti molto abbondanti e generano emissioni di gas serra molto basse (Kumar, Barrett, Delwiche & Strove, 2009). Circa il 90% del peso secco della maggior parte dei materiali vegetali è immagazzinato sotto forma di cellulosa, emicellulosa, lignina e pectina. Per la conversione della biomassa in combustibile, la cellulosa e l'emicellulosa vengono scomposti nei corrispondenti monosaccaridi in modo tale da fornire un substrato idoneo per i microrganismi (Kumar et al., 2009).

L'utilizzo dei raspi per la produzione di biomassa lignocellulosica è stato riportato per la prima volta da Spigno, Pizzorno & De Faveri (2008). A causa del loro elevato contenuto in tannini, l'utilizzo dei raspi come fonte energetica rappresenta una sfida per i processi di pretrattamento nella fase di de-lignificazione, a causa di alcuni inconvenienti che si possono verificare durante il processo di frazionamento come la produzione di sottoprodotti inquinanti e non facilmente eliminabili, l'ossidazione parziale della cellulosa, la degradazione termica degli zuccheri ed anche un notevole consumo di energia termica. Nel loro lavoro, Spigno et al. (2008) hanno confrontato

due procedure di frazionamento chimico per separare e recuperare i componenti lignocellulosici dai raspi d'uva. Il primo metodo consisteva in una lieve idrolisi acida per la separazione delle emicellulose, seguita da una fase alcalina/ossidativa per la solubilizzazione della lignina, mentre nel secondo metodo l'idrolisi acida era preceduta da una fase di macerazione alcalina. Entrambi i metodi applicati hanno portato a promettenti risultati anche se, la quantità di emicellulosa estratta è risultata troppo bassa per rendere i raspi economicamente sfruttabili come substrati di fermentazione a livello industriale (Spigno et al., 2008).

1.3.2 La vinaccia

La vinaccia rappresenta il principale residuo solido della vinificazione. Essa deriva da operazioni di pressatura dell'uva fresca nella vinificazione in bianco e dalla pressatura della vinaccia fermentata nella vinificazione in rosso. La vinaccia rappresenta il 20% - 25% del peso iniziale dell'uva (Spigno et al., 2017). Ad oggi vengono prodotte 9 milioni di tonnellate annue di vinaccia in tutto il mondo (Katalinik et al., 2010).

La vinaccia è costituita da bucce, polpa e vinaccioli e in taluni casi anche da raspi. La sua composizione chimica varia in funzione della cultivar, dello stadio di maturazione e dal tipo di processo di vinificazione a cui l'uva viene sottoposta. Durante il processo di vinificazione, dalle diverse parti dell'acino viene estratto soltanto il 30% - 40% dei composti fenolici, per cui, nella vinaccia rimane un'elevata quantità di tali composti, pari al 60% - 70% del contenuto fenolico totale dell'uva. Nel caso di cultivar a bacca rossa, la vinaccia risulta essere molto ricca in flavonoli, flavanoli e antociani (Spigno et al., 2017).

Da sempre la vinaccia è stata utilizzata come residuo per la produzione di distillati, principalmente grappa, acido tartarico e come agente colorante attraverso l'estrazione di enocianina. Recentemente sono stati adottati degli usi alternativi della vinaccia, quali la produzione di estratti con proprietà antiossidanti, di substrati di

fermentazione, compostaggio e biomassa per la produzione di energia (Spigno et al., 2017).

L'utilizzo della vinaccia come agente colorante, ad esempio nel settore alimentare, dipende da più fattori: il metodo di estrazione della componente antocianica e dalle caratteristiche del prodotto alimentare a cui si intende addizionare la enocianina. Sono note infatti le variazioni del colore degli antociani in funzione del pH del mezzo e come varia la stabilità del colore in termini di intensità e tonalità a seguito di reazioni di acetilazione, polimerizzazione e condensazione. Inoltre, la presenza di solfiti nell'alimento può portare ad una diminuzione drastica del colore a causa delle reazioni di decolorazione antociani-solfiti (Garcià-Lomillo & Gonzàlez-Sanjosé, 2016). Nonostante tali problematiche, l'enocianina è sempre stata utilizzata, e lo è tuttora, come agente colorante in ambito alimentare su matrici molto diverse tra loro, quali latte, gelati, bevande, succhi, marmellate e altre preparazioni alimentari, e presenta caratteristiche di stabilità se aggiunta a concentrazioni tra 20 e 60 ppm (Garcià-Lomillo & Gonzàlez-Sanjosé, 2016).

Un altro prodotto interessante recuperato dalle vinacce è l'acido tartarico. La resa del recupero di acido tartarico varia tra 50 e 75 grammi di acido tartarico per chilogrammo di vinaccia (Garcià-Lomillo & Gonzàlez-Sanjosé, 2016). Grazie alle sue proprietà, quali capacità antiossidante, regolatore di pH e conservante, l'acido tartarico viene ampiamente applicato in diverse categorie alimentari tra cui prodotti lattiero-caseari, oli e grassi commestibili, pesce e prodotti a base di carne, prodotti ortofrutticoli e bevande analcoliche ed alcoliche. I tartrati di potassio sono anche usati nei prodotti da forno grazie alla loro capacità di reagire con bicarbonato di sodio producendo anidride carbonica senza richiedere processi di fermentazione (Garcià-Lomillo & Gonzàlez-Sanjosé, 2016).

Amendola, De Faveri & Spigno (2010) hanno studiato le caratteristiche chimico-fisiche di un estratto fenolico ottenuto dalla vinaccia di cultivar a bacca rossa. L'estratto è stato ottenuto per estrazione idroalcolica e successiva liofilizzazione ed ha mostrato un contenuto fenolico totale ed un'attività antiossidante stabile se

conservato a 25°C in un contenitore chiuso e al riparo dalla luce, per un massimo di 300 giorni. Spigno et al. (2013b), sfruttando questi risultati, hanno studiato la capacità dell'estratto fenolico come additivo naturale per migliorare la conservazione della pasta di nocciole. Per verificare la protezione nei confronti dell'ossidazione lipidica del prodotto con l'aggiunta degli estratti di vinaccia liofilizzati, la pasta di nocciole è stata conservata a 60 °C per 5 giorni, accelerando così il processo di irrancidimento del prodotto. Gli Autori hanno dimostrato l'efficienza di un estratto di vinacce nel migliorare la *shelf-life* della pasta di nocciole inibendone l'ossidazione, nonostante la limitata solubilità dell'estratto in una matrice contenente un'elevata concentrazione lipidica. Mokochinski et al. (2015) hanno studiato la produzione di biomassa a partire da substrati di fermentazione provenienti da diverse matrici vegetali quali grano, malto, ananas (polpa e buccia), mela (polpa) e vinaccia. La ricerca ha evidenziato che tutti i substrati consentono la crescita del fungo *Agaricus brasiliensis* e la produzione di elevate quantità di steroli, in particolare ergosterolo. La vinaccia rappresenta un potenziale substrato che tali funghi potrebbero utilizzare per il processo di fermentazione.

Il compostaggio è un trattamento comunemente utilizzato per lo smaltimento dei residui biologici. Burg, Vitěz, Turan & Burgová (2014) hanno studiato la possibilità di destinare la vinaccia al compostaggio. Nello studio è stato monitorato il processo di compostaggio di masse di compost costituite da percentuali diverse di vinacce, materiale vegetale di scarto, *chips* e letame. Ogni massa di "compost" è stata sottoposta ad un processo di sanificazione/risanamento ad una temperatura di 45°C per 5 giorni. Gli Autori hanno evidenziato che il processo di compostaggio rappresenta un uso efficace delle vinacce e che il "compost" ottenuto è considerato un fertilizzante organico di alta qualità.

Uno degli utilizzi maggiormente innovativi della vinaccia è infine la produzione di energia attraverso una degradazione dei costituenti in condizioni anaerobiche (Da Ros, Cavinato, Bolzonella & Pavan, 2016). Numerosi studi sono stati effettuati sulla digestione anaerobica della vinaccia condotta in condizioni mesofile, ovvero ad un

range di temperatura dai 35°C ai 45°C. Ad esempio, Fabbri, Bonifazi & Serrandi (2015) hanno evidenziato come il tipo di cultivar e le tecnologie di vinificazione siano i principali fattori che influenzano la variabilità del substrato per la produzione di biomassa. Gli stessi Autori hanno evidenziato che la vinaccia proveniente da cultivar a bacca bianca presentava un miglior potenziale nella produzione di biometano a differenza di vinaccia fermentata ottenuta da cultivar a bacca rossa. Gli Autori sostengono infatti che la maggiore concentrazione in composti fenolici ed alcool riscontrata nella vinaccia proveniente dalle cultivar a bacca rossa, ha portato ad un rallentamento nella cinetica del processo di degradazione della vinaccia nella produzione di biogas.
Da Ros et al. (2016) hanno invece valutato la prestazione della digestione termofila, condotta ad una temperatura di 55°C, di alcuni residui della filiera vitivinicola, tra cui la vinaccia. Confrontando i risultati ottenuti in termini energetici attraverso la digestione termofila della vinaccia con quelli riportati in letteratura in condizioni mesofile, la potenziale produzione di metano aumentava fino all' 84% (Da Ros et al., 2016).

1.3.3 Le bucce

Le bucce rappresentano circa il 50% delle vinacce ed il rapporto tra bucce e semi varia notevolmente a seconda del vitigno (Spigno et al., 2017). Le bucce sono particolarmente interessanti per il loro contenuto in proteine, dal 5% al 12%, in ceneri, dal 2% all'8%, in zuccheri solubili, dall'1% a oltre il 70% (in funzione del processo applicato) e, soprattutto, per il contenuto di fibre e composti fenolici (Deng, Penner & Zhao, 2011). Gli stessi Autori riportano infatti un contenuto totale di fibre alimentari pari al 60% circa della sostanza secca.
La composizione fenolica e delle pareti cellulari delle bucce è stata studiata da Pinelo, Arnous & Meyer (2006). La parete cellulare è costituita da monosaccaridi e disaccaridi quali cellulosa, xiloglucano, arabinosio, galattosio, xilosio e mannosio,

pectine acide e neutre, proantocianidine insolubili, lignina, proteine strutturali, composti fenolici, aromi e loro precursori. I composti fenolici nella buccia sono presenti sia sottoforma legata ai polisaccaridi della parete cellulare mediante interazioni idrofobiche e/o legami a ponte di idrogeno, sia sotto forma libera. Pertanto, in relazione al processo di estrazione che può agire sulla struttura della parete cellulare, è possibile estrarre o meno i composti fenolici liberi e/o nella loro forma legata. E' noto anche che i tannini sono principalmente localizzati nella buccia della bacca d'uva e che tali tannini hanno un elevato grado di polimerizzazione (da 28 a 80) ed una bassa quantità di gallotannini rispetto a quelli presenti nei vinaccioli. Nel caso delle cultivar a bacca rossa, le bucce sono ricche nella componente antocianica; si troveranno quindi in funzione della cultivar concentrazioni più o meno elevate di delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina, nelle loro forme libera o sotto forma glucosidica o piruvica (Spigno et al., 2017).

Analogamente alla vinaccia, le bucce vengono utilizzate convenzionalmente per la produzione di distillati e come agenti coloranti. Per le loro caratteristiche chimico-fisiche e per il loro elevato contenuto in composti bioattivi le bucce sono anche fonte di estratti antiossidanti, compostaggio, substrato di fermentazione e biomassa per la produzione di energia. Romo-Sànchez, Gil Sànchez, Arévalo-Villena & Briones Pérez (2015) hanno confrontato le bucce d'uva e la sansa d'olio d'oliva (anche addizionati con grano) per la produzione di enzimi lignocellulosici e di conseguenza di substrati di fermentazione utilizzando come microorganismi due ceppi fungini tali *Apergillus niger* e *Aspergillus fumigatus*. I processi fermentativi sono stati condotti e analizzati a 2, 4, 6, 8, 10 e 15 giorni per monitorare l'attività enzimatica in termini di xilanasi, cellulasi, *p*-glucosidasi e pectinasi. I valori più alti di attività enzimatica sono stati registrati dopo 10 e 15 giorni di fermentazione (Fig.5).

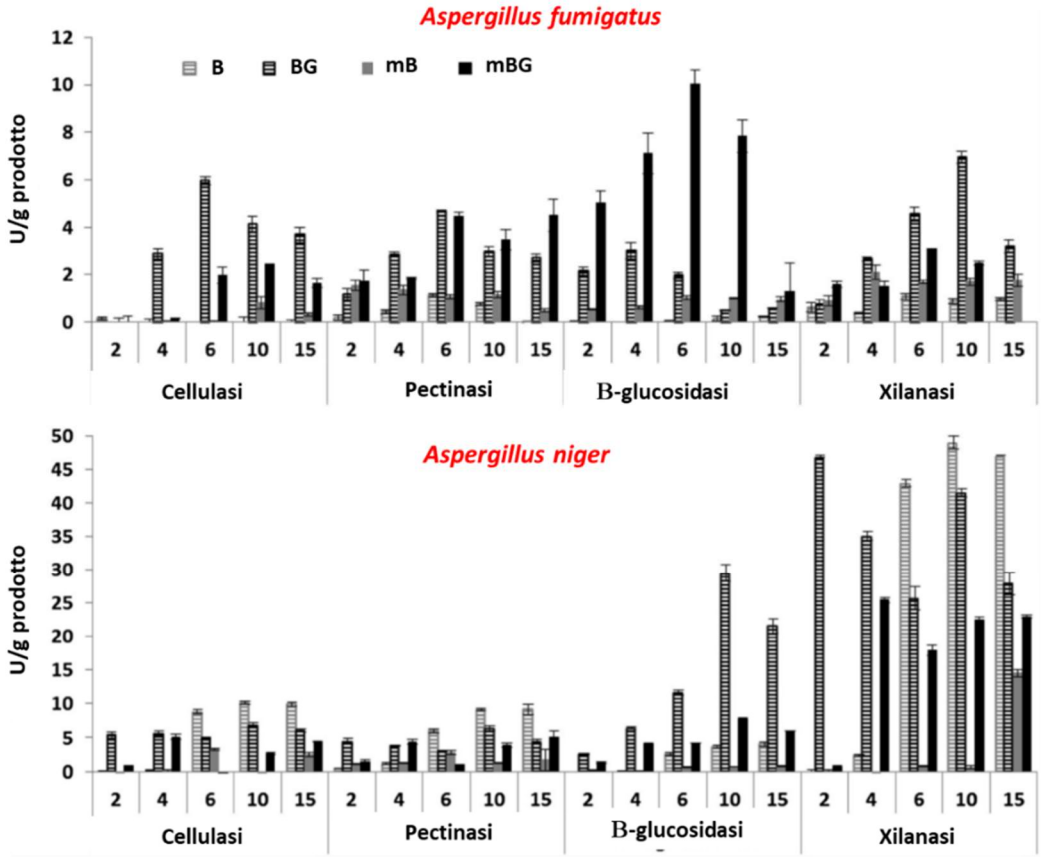


Figura 5. Attività enzimatica di A. fumigatus e A. niger in substrati di fermentazione solidi a 2-4-6-10-15 giorni. B = bucce d'uva, BG = bucce d'uva e grano, mB = bucce d'uva triturata, mBG = bucce d'uva e grano triturata.

Gli estratti enzimatici ottenuti sono stati purificati, liofilizzati e immobilizzati su chitosano. Lo studio di Romo-Sanchez et al. (2015) attesta l'appropriatezza sia della buccia che della sansa di oliva nella produzione di estratti enzimatici. I migliori risultati dell'attività enzimatica di *Aspergillus niger* è stata trovata in substrati di fermentazione solidi costituiti dalle bucce d'uva, essendo la xilanasi l'enzima presente alla massima concentrazione.

1.3.4 I vinaccioli

I vinaccioli rappresentano fino al 52% del peso secco della vinaccia, ma tale valore può variare considerevolmente in funzione del processo di produzione applicato. I vinaccioli sono caratterizzati da un elevato contenuto in fibre (40%), lipidi (16%) e proteine (11%) (Spigno et al., 2017). Tra gli altri componenti, i vinaccioli contengono una elevata concentrazione di composti fenolici (fino al 70% dei composti estraibili totali) e vitamine. Derivati dell'acido idrossibenzoico, l'acido protocateico e l'acido gallico sono stati misurati in quantità elevate in vinaccioli provenienti sia da cultivar a bacca rossa che da cultivar a bacca bianca. Inoltre, i vinaccioli delle cultivar a bacca rosse sono caratterizzati da acidi idrossicinnamici quali acido clorogenico, molecola non identificata nelle cultivar a bacca bianca (Hogervorst, Miljić & Puškaš, 2017).

Le concentrazioni di flavan-3-oli presenti nei vinaccioli sono simili a quelle osservate nelle bucce d'uva, ma, poiché tendono ad essere in forma monomerica, il loro grado di polimerizzazione (circa 11) è inferiore. D'altra parte, Pinelo et al. (2006) mettono in evidenza che i livelli di gallotannini sono superiori del 30% rispetto a quelli presenti nella buccia e nel raspo. I vinaccioli contengono inoltre molecole antiossidanti tali tocoferoli e tocotrienoli (Hogervorst et al., 2017). Il principale derivato dei vinaccioli è l'olio di vinacciolo.

Alcuni studi sono presenti sulla caratterizzazione chimico-fisica e sulle tecniche di estrazione dell'olio di vinaccioli. Pardo, Fernàndez, Rubio, Alvarruiz & Alonso (2009) hanno studiato la composizione chimico-fisica di oli di vinaccioli ottenuti da cultivar diverse (cv. Monastrell, Grenacha, Tintorera, Syrah e Petit Verdot), estratti meccanicamente (Tab.5).

Tabella 5. Parametri chimico-fisici di diversi campioni di olio di vinaccioli (Pardo et al., 2009).

	Monastrell *	Monastrell **	Granacha Tintorea **	Petit Verdot **	Syrah **
Acidità (%)	0.37^{c}	1.20^{a}	1.47^{a}	0.73^{b}	0.82^{b}
Perossidi (meq/Kg)	5.99^{c}	8.00^{b}	6.80^{bc}	13.50^{a}	11.60^{a}
K_{270}	0.35^{c}	0.39^{b}	0.34^{c}	0.46^{a}	0.36^{c}
Steroli (mg/g)	30.6^{c}	40.5^{b}	59.3^{a}	42.4^{a}	45.8^{b}

* pretrattamento vinaccioli a 50°C per 6 ore;

** pretrattamento vinaccioli a 20°C per 7 giorni.

[a,b,c] Lettere differenti nella stessa riga indicano differenze significative ($p < 0,05$).

I valori di acidità erano tutti superiori al livello massimo consentito (0.2%) dalla legislazione Spagnola per gli oli vegetali commestibili. Tuttavia, dato che gli oli di vinaccioli esaminati sono stati ottenuti solo attraverso processi fisici, gli Autori hanno confrontato i parametri di tali oli anche con l'olio di oliva, che classificherebbe i campioni nella categoria "vergine" (≤ 2%) o anche nella categoria "extravergini" (≤ 0.8%) per le varietà Petit Verdot e Syrah (Tab.5). Per quanto riguarda il contenuto in perossidi, tutti i campioni mostravano valori inferiori del limite stabilito per l'olio di oliva vergine (20 meq/kg), indicando un basso livello di ossidazione.

Pardo et al. (2009) hanno evidenziato delle differenze non solo in termini di cultivar di provenienza, ma in base alla tecnica di estrazione o di trattamento del vinacciolo. Per la varietà Monastrell infatti, il trattamento ad aria calda (50°C) e prolungato per 5 giorni ha portato ad una netta diminuzione dell'acidità, di perossidi e anche del contenuto in steroli rispetto al trattamento a temperatura ambiente (Tab.5).

Risultati simili sono stati ottenuti da Fiori et al. (2014) che riportano la composizione dell'olio di vinaccioli ed osservano un elevato contenuto in tocoferoli e acidi grassi insaturi. Gli stessi Autori offrono un quadro chiaro delle somiglianze e delle differenze tra gli oli provenienti da diverse cultivar e ottenuti attraverso diverse tecniche di estrazione. In particolar modo mettono in luce che la tipologia di

estrazione incide maggiormente sul contenuto in tocoferoli e in acidi grassi rispetto alla cultivar di appartenenza.

Analogamente al contenuto in steroli e acidi grassi anche il contenuto in polifenoli totali e l'attività antiossidante degli oli di vinaccioli (Tab.6), ottenuti da sei cultivar a bacca bianca e a bacca rossa (cv. Barbera, Chardonnay, Muller Thurgau, Moscato, Nebbiolo e Pinot Nero), variavano in relazione alla tecnica di estrazione utilizzata (Mohamed et al., 2016).

Tabella 6. Polifenoli totali (mg acido gallico AG / Kg olio) in olio di vinaccioli ottenuto attraverso estrazione supercritica CO2 (SC-CO2) e mediante metodo Soxhlet (n-esano) delle sei cultivar (*Vitis vinifera*). Ogni valore rappresenta il valore medio ± deviazione

	Polifenoli totali (mg AG/ Kg)	
	SC-CO_2	Soxhlet
Pinot Nero	60 ± 4a,A*	53 ± 4a,A
Moscato	28 ± 2e,A	24 ± 3d,A
Muller Thurgau	41 ± 3c,A	38 ± 4bc,A
Nebbiolo	47 ± 2b,A	42 ± 3b,A
Chardonnay	32 ± 3d,A	29 ± 3d,A
Barbera	39 ± 2c,A	35 ± 2c,A

*Analisi della varianza ANOVA e T-test sono state eseguite considerando rispettivamente come fattori cultivar e processo di estrazione. Diverse lettere (a-e) indicano differenze significative tra cultivar per ciascun processo di estrazione in base al test di Duncan ($p < 0.05$). Diverse lettere (A-B) indicano differenze significative tra i processi di estrazione per ciascuna cultivar in base al T-test ($p < 0.05$).

Analizzando anche il contenuto il steroli e acidi grassi, Mohamed et al. (2016) hanno dimostrato che l'olio di vinaccioli è particolarmente ricco in α-tocoferolo, α- e γ-tocotrienolo e che l'estrazione con CO_2 supercritica ha permesso di ottenere livelli più elevati di tocoferoli e di carotenoidi associati ad una maggiore attività antiossidante lipofila, rispetto all'estrazione effettuata con n-esano. Al contrario, il contenuto fenolico totale, il contenuto di clorofilla e l'attività antiossidante idrofila non sono stati influenzati dal metodo di estrazione. L'olio di vinacciolo ottenuto

dalle cultivar Barbera, Nebbiolo e Pinot Nero ha presentato i più alti potenziali antiossidanti associati alla presenza del più alto contenuto di composti bioattivi. Sono state dimostrate sostanziali correlazioni positive tra l'attività antiossidante lipofila, i carotenoidi, i tocoferoli ed il contenuto di clorofilla (Mohamed et al., 2016).

Gli usi alternativi dei vinaccioli riguardano la produzione di estratti antiossidanti e di estratti proteici. La capacità degli estratti, provenienti dalla farina di vinaccioli, di rimuovere i fenoli potenzialmente astringenti dalle soluzioni di tannino e dai vini rossi, è stata valutata determinando l'Indice di Astringenza della Mucina, AMI (Vincenzi et al., 2013). L'intensità dell'astringenza percepita nelle soluzioni di tannino e in due vini rossi trattati con gli estratti è stata valutata mediante test sensoriali. Gli autori hanno evidenziato che l'AMI e l'intensità dell'astringenza dei campioni trattati sono stati significativamente ridotti rispetto a quelli dei campioni non trattati con l'estratto proveniente dai vinaccioli, suggerendo che gli estratti di semi d'uva potrebbero essere uno strumento promettente per la chiarifica del vino come sostituto delle proteine esogene. L'azione antiossidante degli estratti da vinaccioli, provenienti da cultivar a bacca rossa e bianca, è stata studiata da Ignea et al. (2013) in diverse cellule di lievito aventi dei deficit nel sistema anti-radicalico e nella produzione di glutatione. Anche la citotossicità, la vitalità delle cellule di lievito e l'azione antivirale nei confronti della proliferazione delle cellule (HepG2 2.2.15) responsabili del carcinoma della prostata PC3 e HBV sono state osservate nello studio. Gli Autori hanno concluso che gli estratti di vinaccioli esplicavano un ruolo antiossidante in vivo secondo le carenze del sistema analizzato e che mostravano proprietà citotossiche nelle linee cellulari PC3 e Hep2 2.2.15, in particolar modo l'azione citotossica maggiore è stata osservata per gli estratti ottenuti da cultivar a bacca rossa. Nessuna azione antivirale contro HBV è stata rilevata (Ignea et al., 2013). Gli effetti dell'estratto di vinaccioli come ingrediente funzionale sulle caratteristiche fisico-chimiche della farina di frumento e delle proprietà reologiche dell'impasto è stato studiato da Aghamirzaei, Peighambaradoust, Azadmard-Damirchi & Majzoobi (2015). L'aggiunta dell'estratto alla farina di frumento ha

aumentato il grado di ammorbidimento e la tolleranza di miscelazione dell'impasto. Un buon aumento del valore nutrizionale sul pane è stato ottenuto incorporando l'estratto di vinaccioli all'impasto.

1.3.5 Le fecce di fermentazione

Tutti i processi di vinificazione portano alla produzione di fecce. Le fecce sono i residui del processo di vinificazione che si trovano sul fondo di un vaso vinario a seguito del processo di fermentazione, durante lo stoccaggio o a seguito della filtrazione o centrifugazione del vino (Texiera et al., 2014). Alcuni tipi particolari di vino vengono lasciati a contatto con le proprie fecce durante l'invecchiamento e solo una piccola parte delle fecce viene utilizzata nell'invecchiamento tradizionale. Il vino spumante, ottenuto con il metodo classico o *champenoise*, viene invecchiato sulle fecce dopo la fase della presa di spuma.

Le fecce ottenute nella vinificazione in rosso possono contenere fino a 12 Kg di pigmenti per tonnellata (Hogervorst et al., 2017). Rappresentano dal 2% al 6% del totale del vino prodotto e sono costituite principalmente da etanolo, acido tartarico, cellule di lievito e composti fenolici (Dimou et al., 2015; Delegado de la Torre, Priego-Capote & Luque de Castro, 2015).

Generalmente dopo la svinatura, le fecce vengono raccolte e inviate a specifici sistemi di smaltimento, ma possono anche costituire un residuo utilizzabile per l'ottenimento di estratti antiossidanti, *biochar* e come additivo funzionalizzante di diverse matrici. Il *biochar* è un materiale carbonioso, ottenuto per degradazione termica da biomassa di origine vegetale e/o animale utilizzato prevalentemente in agricoltura sostenibile per eliminare dal suolo elementi inquinanti come piombo ed altri metalli pesanti.

Sharma, Kumar, Azad & Adsule (2015) hanno studiato l'effetto dell'aggiunta delle fecce di fermentazione, raccolte dalla seconda svinatura di vino Cabernet Sauvignon, sul gelato. Le fecce sono state addizionate a concentrazioni diverse (5, 10, 20, 40

g/Kg); la capacità antiossidante, il contenuto in polifenoli totali ed il contenuto in antociani sono stati analizzati sia sul gelato addizionato con le diverse concentrazioni di feccia che sul controllo non trattato. I risultati dello studio indicano che i parametri chimici del gelato sono stati significativamente influenzati dall'aggiunta della feccia e che le proprietà antiossidanti del gelato fortificato erano significativamente aumentate rispetto al controllo non trattato. Dal punto di vista sensoriale, Sharma et al. (2015) osservarono che l'aggiunta di fecce a 20 g/Kg è risultata la migliore tra i trattamenti. Tuttavia, la varietà dell'uva da vino, la qualità dell'uva, la temperatura di fermentazione, il ceppo del lievito, la durata della svinatura ed il tipo di fecce possono influenzare l'accettabilità del gelato fortificato.

Zhu, Wu, Wang, Yang & Zhang (2016) hanno studiato la produzione di *biochar* a partire da fecce di fermentazione, osservandone il meccanismo di adsorbimento, le caratteristiche della superficie e l'effetto del pH sui fenomeni di adsorbimento. I risultati sperimentali hanno rivelato che il *biochar* derivato dalle fecce presentava un'ampia superficie specifica ed alti contenuti di gruppi -COOH e -OH sulla sua superficie. L'adsorbimento di Pb^{2+} sul *biochar* ottenuto avveniva mediante un meccanismo di adsorbimento multistrato, come descritto dal modello di adsorbimento di Freundlich e che l'equilibrio di adsorbimento è stato raggiunto entro 30-60 minuti. La capacità di adsorbimento, studiata da un range di pH da 3 a 6, incrementava all' aumentare del pH (Zhu et al., 2016).

La possibilità di ottenere vino di alta qualità dalle fecce è stata trattata da Fia, Zanoni & Gori (2016). Gli Autori hanno utilizzato fecce di fermentazione, provenienti da cultivar diverse quali Sangiovese, Cabernet Franc, Syrah, Merlot, Montepulciano, Cabernet Sauvignon e Viognier. Dopo la svinatura, le fecce sono state sottoposte ad una estrazione solido-liquido (Gori, Menichetti & Fia, 2014) e processate in condizioni controllate di temperatura, micro-ossigenazione e cicli di rimescolamento. Durante il trattamento sono stati effettuati prelievi della massa ed è stato rilevato un aumento dell'intensità del colore, dei polifenoli totali e dei

polisaccaridi totali nel vino ottenuto dalle fecce, mentre la tonalità manteneva un valore stabile.

1.3.6 Le uve da diradamento

Le uve da diradamento sono un residuo solido ottenuto a seguito dell'operazione di diradamento. Il diradamento è una pratica di potatura verde che consiste nell'asportazione selettiva dei grappoli con lo scopo di garantire un equilibrio vegeto-produttivo della pianta. Interessa il 30% - 50% dei grappoli totali sulla pianta e, in funzione dello scopo enologico, viene effettuato nel periodo antecedente all'invaiatura su grappoli ancora verdi o al momento stesso dell'invaiatura, si parla quindi di un intervallo di tempo che va dalla seconda metà di Luglio alla seconda metà di Agosto.

Con la tecnica del diradamento ogni tralcio viene esaminato e trattato in relazione alla sua particolare situazione: nel caso di un tralcio ricco in uva, questo verrà privato dei grappoli posti nella parte più alta della pianta, mentre in presenza di un tralcio piccolo e fine verranno asportati solamente uno o due grappoli in modo tale da indurre, nei rimanenti, una maturazione completa. Le uve diradate sono quindi delle uve immature, non adatte al processo di vinificazione, ma con un patrimonio fenolico importante, che generalmente vengono abbandonate in campo (Oncül & Karabiykly 2015).

Uno degli usi più comuni e più antichi delle uve immature è stato quello di trasformarle in un succo d'uva a carattere acido, denominato "agresto". Oncül & Karabiykly (2015), in un'ottica di una domanda sempre più elevata di prodotti naturali e ricchi in composti bioattivi, hanno studiato le proprietà chimico-fisiche e l'attività antiossidante di due prodotti derivanti da uve immature provenienti da zone diverse della Turchia. A patire da tali uve, gli Autori hanno prodotto in laboratorio due tipologie di succo d'uva: "agresto" e "sour grape sauce" (uno sciroppo acido). Il processo di lavorazione delle uve immature è mostrato nella Figura 6.

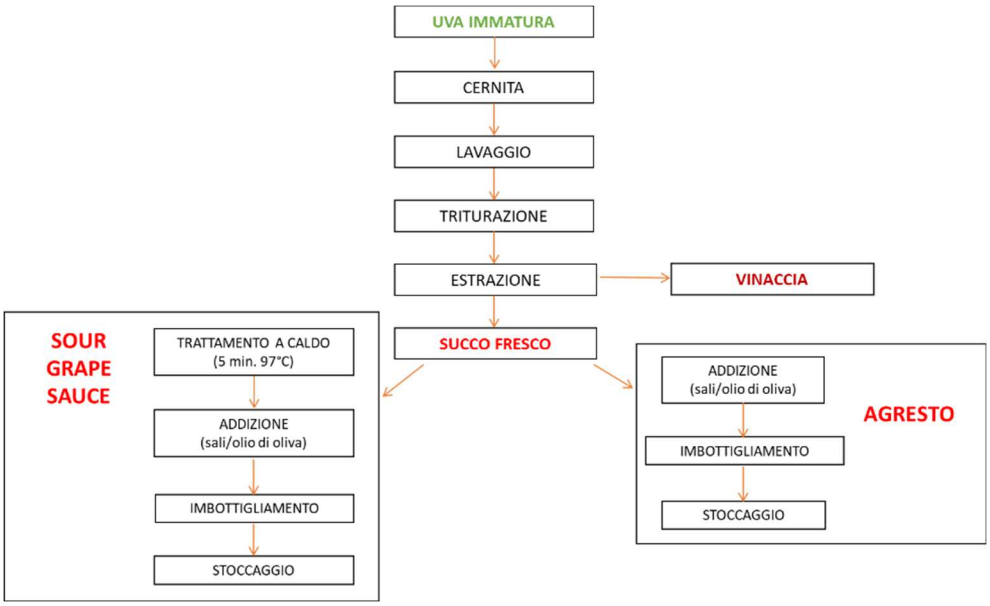


Figura 6. Diagramma delle operazione per la produzione in laboratorio di "agresto" e "sour grape sauce" (Oncül & Karabiykly 2015).

Sono stati ottenuti valori medi di 2.41 per il pH, 0.97 di attività dell'acqua, 3.83% di acidità titolabile, 6.72 g/L di zuccheri totali e 473.96 mg/L per il contenuto fenolico totale. L'attività antiossidante è stata analizzata mediante FRAP e ABTS test. Valori medi di attività antiossidante tra 0.010 – 0.231 e 0.035 – 0.885 µmol TE (trolox equivalente)/mL sono stati osservati rispettivamente mediante FRAP e ABTS. Oncül & Karabiykly (2015) hanno evidenziato differenze nei risultati in relazione alla fase di maturazione, alla qualità delle uve, al genotipo e alle condizioni ambientali.

Poche ricerche sono state effettuate sulle uve da diradamento. Kontoudakis, Esteruelas, Fort, Canals & Zamorra (2011) hanno utilizzato uve da diradamento, cv. Grenache, per la produzione di un vino finale a basso contenuto di alcol e con un pH acido. Nel loro studio le uve da diradamento sono state vinificate ed il vino ottenuto è stato trattato con carbone attivo e bentonite per ottenere un vino inodore ed incolore con caratteristiche acide e con una gradazione alcolica molto bassa. Tale vino è stato

addizionato ad un altro vino ottenuto da uve completamente mature, cv. Merlot e Cabernet Sauvignon, con basso valore di pH ed eccessiva gradazione alcolica. La procedura descritta ha consentito la produzione di un vino finale (cv. Merlot, Cabernet Sauvignon e Grenache) con contenuto alcolico e pH ridotti, pur mantenendo il contenuto fenolico e le proprietà sensoriali simili al vino non trattato ottenuto dalle uve Merlot e Cabernet Sauvignon. Secondo gli Autori tale procedura potrebbe offrire un mezzo per affrontare il problema dei vini che sviluppano etanolo elevato e pH basso a causa dell'eccessiva maturazione delle uve (Kontoudakis et al., 2011).

Tinello & Lante (2017) hanno studiato l'attività antiossidante e antiossidasica di uve immature (cv. Barbera e Merlot) provenienti da operazioni da diradamento. Nell'estratto liquido sono stati studiati la capacità inibitoria dell'attività enzimatica di un tirosinasi commerciale (TYR), l'effetto sbiancante e la capacità antiossidante tramite test del DPPH, a confronto con il composto di riferimento per l'azione anti-imbrunimento ed il contenuto di acido ascorbico. I risultati dello studio hanno evidenziato che l'estratto ottenuto dalla uve da diradamento esplicava non solo un'azione antiossidasica ma anche buone proprietà antiossidanti e di sbiancamento. E' stato rilevato un effetto della cultivar sulla capacità antiossidasica. L'estratto ottenuto da uve immature Merlot mostrava infatti un'attività anti-imbrunimento maggiore rispetto a quella misurata nell'estratto ottenuto da uve immature Barbera (Tinello & Lante, 2017).

A seguito di questi risultati, Tinello, Mihaylova & Lante (2018) hanno utilizzato un estratto liquido ottenuto da uve diradate (cv. Merlot) per prevenire i meccanismi di ossidazione nella produzione di rondelle (*chips*) di mela (*Malus domestica* cv. Golden Delicius). Il trattamento con l'estratto ottenuto dalle uve da diradamento è stato effettuato prima dell'essicamento delle *chips* di mela. Le *chips* sono state sottoposte ad un processo di immersione in 100 ml di estratto liquido ad una temperatura di 25°C. Il trattamento con l'estratto è stato confrontato con una soluzione di acido citrico (1% *w/v*) e acido ascorbico (1% *w/v*), con una soluzione al

6% (*w/v*) NatureSeal®, una soluzione di metabisolfito di sodio al 0.1% (*w/v*) ed infine con H_2O distillata (controllo). Dopo 15 minuti di immersione, tutte le *chips* sono state sottoposte al processo di essiccamento.

La composizione fenolica totale e degli acidi organici delle *chips* sottoposte ai diversi trattamenti è mostrata nella Tabella 7. Le *chips* trattate con l'estratto mostravano un contenuto in acidi organici maggiore a quello osservato nel controllo e nelle *chips* trattate con il metabisolfito di sodio e simile a quello analizzato nelle *chips* immerse nella soluzione di acido citrico e acido ascorbico. Per quanto riguarda la composizione fenolica totale, l'incremento maggiore, rispetto al controllo, è stato riscontrato nei campioni trattati con l'estratto ottenuto da uve immature (Tab.7).

Tabella 7. Concentrazione di acidi organici e di composti fenolici totali misurati mediante HPLC sulle chips essiccate e sottoposte ad un pre-trattamento ad immersione condotto a differenti condizioni (Tinello, Mihaylova & Lante, 2018).

Parametri	Pre-trattamento				
	C	AACA	AS1	SM	GJ
Acidi Organici (µg/g s.s)					
Acido L-Ascorbico	43.58± 3.00^{d}	1268.79 ± 4.50^{a}	44.08 ± 3.50^{d}	164.87 ± 2.50^{b}	75.40 ± 3.00^{c}
Acido Citrico	256.60 ± 2.50^{e}	319.60 ± 2.01^{b}	276.70 ± 2.50^{d}	86.18 ± 0.29^{c}	388.64 ± 0.37^{a}
Acido L-Malico	2303.62 ± 4.00^{c}	1924.49 ± 5.00^{e}	13061.44 ± 3.50^{a}	2260.70 ± 4.50^{d}	3051.20 ± 3.00^{b}
Acido Organici Totali	2612.79 ± 9.50^{d}	3512.88 ± 8.67^{b}	13382.22 ± 9.50^{a}	2711.75 ± 6.86^{c}	3515.24 ± 6.20^{b}
Composti Fenolici (µg/g s.s)					
(+)-Catechina	33.84 ± 0.80^{c}	53.60 ± 0.33^{a}	37.62 ± 2.18^{c}	45.28 ± 0.98^{b}	43.46 ± 1.41^{b}
Acido Clorogenico	136.14 ± 2.01^{b}	155.50 ± 4.00^{a}	142.40 ± 6.22^{b}	146.01 ± 3.00^{ab}	143.50 ± 2.34^{b}
(-)-Epicatechina	93.48± 3.95^{c}	127.59 ± 0.68^{a}	90.33 ± 4.07^{c}	116.70 ± 0.64^{b}	107.89 ± 3.55^{b}
Procianidina B1	116.60 ± 5.43^{c}	209.54 ± 3.60^{a}	172.70 ± 0.65^{b}	128.83 ± 6.04^{c}	173.42 ± 5.00^{b}
Procianidina B2	232.63 ± 5.00^{d}	230.42 ± 03.68^{d}	300.84 ± 4.20^{b}	285.50 ± 5.00^{c}	336.17 ± 3.50^{a}
Composti Fenolici Totali	612.69 ± 7.29^{c}	776.65 ± 6.28^{a}	743.89 ± 11.12^{b}	722.32 ± 7.55^{b}	804.44 ± 13.69^{a}

I valori sono espressi come la media ± deviazione standard di tre repliche; ^{a,b,c,d} lettere diverse indicano valori statisticamente diversi ($P < 0.005$); C, acqua distillata; AACA, soluzione di 1% (*w/v*) acido citrico e 1% (*w/v*) acido ascorbico; AS1, soluzione al 6% NatureSeal®, SM, soluzione al 0,1% (*w/v*) di metabisolfito di sodio; GJ, estratto ottenuto da uve acerbe.

Tinello, Mihaylova & Lante (2018) hanno dimostrato che il pre-trattamento a immersione con l'estratto d'uva acerba è efficace nell'inibire l'attività delle PPO, limitando i cambiamenti di colore e aumentando la capacità antiossidante delle *chips*

di mela “BGolden Delicious” essiccate grazie al suo arricchimento in composti bioattivi.

Il cambiamento di colore delle *chips* di mela a seguito di diversi trattamenti è indice dell’attività delle PPO (Fig.7). Nel dettaglio, dopo il pre-trattamento ad immersione a 25°C, le *chips* trattate con le diverse soluzioni mantenevano una colorazione maggiormente verde rispetto al controllo che tendeva ad una colorazione gialla, indice dei processi ossidativi, confermando la loro azione antiossidasica. Anche a seguito dell’essicamento a 45°C, tutti i campioni trattati con le diverse soluzioni presentavano una colorazione più lucente ed il risultato migliore è stato osservato nel campione trattato con l’estratto di uve immature (Fig.7). Per visualizzare in breve tempo l'effetto *antibrowning*, alle *chips* di mela essiccate è stata addizionata una soluzione di catecolo allo scopo di accelerare l’attività delle PPO e di conseguenza la variazione del colore. In tal caso, è possibile osservare dalla Figura 7, che il migliore effetto nei confronti dell’imbrunimento enzimatico è stato ottenuto trattando il campione con il metabisolfito di sodio (AS1) e con la soluzione di acido citrico e acido ascorbico (AACA).

Gli Autori affermano infatti che i campioni trattati con AS1 e AACA mostravano il migliore effetto inibitorio nei confronti dell’azione delle PPO (96% e 75% rispettivamente). L’estratto di uva immatura presentava un effetto inibitorio delle PPO pari al 30%. L’azione di “*antibrowning”* era direttamente legata alla composizione chimica delle *chips* addizionate con le rispettive soluzioni. AS1 e AACA contenevano infatti una concentrazione maggiore di acido L-malico e di acido citrico, molecole ad elevata azione inibitoria nei confronti delle PPO (Tinello, Mihaylova & Lante, 2018).

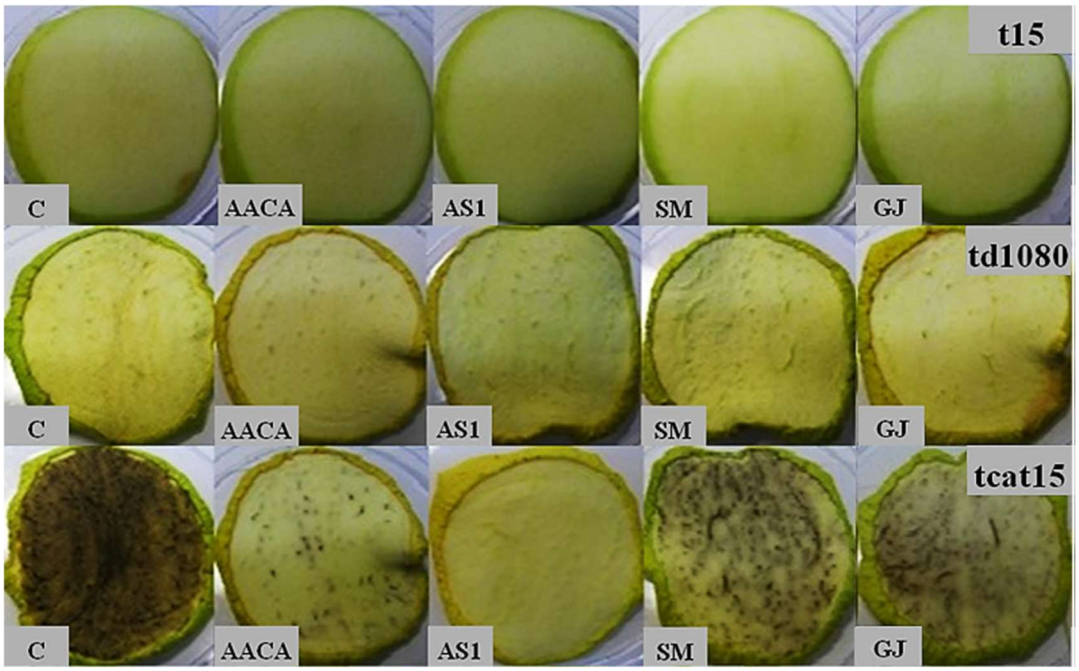


Figura 7. Variazione di colore monitorato sulle chips di mela essiccate a seguito dei diversi pre-trattamenti di immersione (C, acqua distillata; AACA, soluzione di 1% (*w/v*) acido citrico e 1% (*w/v*) acido ascorbico; AS1, soluzione al 6% NatureSeal®, SM, soluzione al 0,1% (*w/v*) di metabisolfito di sodio; GJ, estratto ottenuto da uve acerbe). tl15, 15 minuti dopo il pre-trattamento a immersione a 25°C; td1080, 1080 min dopo l'essiccamento a 45°C; tcat15, 15 minuti dopo l'applicazione di 10 mmol/L catecolo a 25°C (Tinello, Mihaylova & Lante, 2018).

Anche l'attività antiossidante aveva un andamento molto simile a quanto osservato per l'azione inibitoria delle PPO. L'attività antiossidante delle *chips* trattate con GJ era maggiore rispetto a quella osservata in SM e ovviamente del controllo C, ma minore rispetto a quella analizzata in AS1 e AACA.

Recentemente Dupas de Matos et al. (2019) hanno utilizzato uve immature (cv Chardonnay e Sauvignon) per l'ottenimento di un succo acido (i.e verjuice) utilizzabile come alternativa all'aceto nella conservazione di alcuni alimenti. In

questo studio, le conserve di cetriolo sottaceto sono state preparate industrialmente confrontando l'azione acidificante del verjuice e dell'aceto, utilizzato tradizionalmente. I campioni sono stati caratterizzati chimicamente e sottoposti ad analisi sensoriali. Gli Autori osservarono che l'utilizzo dei diversi agenti acidificanti dava luogo a variazioni sensoriali nella percezione delle sensazioni di acido, amaro, dolce e salato, ma che entrambi i prodotti erano graditi dal consumatore. Dal punto di vista chimico l'utilizzo del verjuice aumentava il livello di acidità nei campioni, ma tale parametro può essere moderato in relazione alla maturità delle uve in funzione del rapporto acidi/zuccheri. L'utilizzo del verjuice aveva il vantaggio di non contenere acido acetico e rappresentava una valida alternativa agli agenti acidificanti utilizzati tradizionalmente (Dupas de Matos et al., 2019).

1.4 I COMPOSTI BIOATTIVI DEI RESIDUI DELLA FILIERA VITIVINICOLA

Nei diversi organi delle piante, quali foglie, stelo, fiori e frutti e di conseguenza anche nei derivati di origine vegetale come i residui della filiera vitivinicola, sono naturalmente presenti composti definiti "composti bioattivi" o "*phytochemicals*", ovvero molecole dotate di attività biologica che si esplica nel prevenire il rischio di sviluppo di numerose malattie croniche (Cabras & Martelli, 2004) e quindi in grado di svolgere una fondamentale azione protettiva sulla nostra salute (Adom, Sorrels & Liu, 2005; Ninfali & Bacchiocca, 2003; Robards, 2003). Tali benefici si raggiungono grazie all'interazione di questi "ingredienti" con una o più funzioni fisiologiche dell'organismo.

I composti bioattivi delle piante rientrano nella classe dei metaboliti secondari; vengono sintetizzati quindi in una fase secondaria della crescita della pianta ed esplicano una funzione di difesa a seguito di stress o attacchi da patogeni di varia natura.

Quando si parla di composti biologicamente attivi, è necessario far riferimento alla loro attività antiossidante. Con il termine "antiossidante" si definiscono tutte le sostanze in grado di contrastare i fenomeni ossidativi. La definizione più largamente usata è quella di Halliwell & Whiteman (2004) secondo cui gli antiossidanti sono sostanze che, a basse concentrazioni rispetto al substrato ossidabile, e sotto specifiche condizioni, sono in grado di ritardare o prevenire l'ossidazione del substrato stesso.

Una sostanza ad attività antiossidante, sia essa naturalmente presente, prodotta o introdotta con la dieta, generalmente agisce sull'attività delle specie radicaliche in modo diretto, donando ad esse elettroni o atomi d'idrogeno e stabilizzandosi, al contempo, in altre forme non reattive, o in modo indiretto legando ioni metallici come il rame o il ferro coinvolti nella catalisi del meccanismo ossidativo dei lipidi (Kaur & Kapoor, 2001).

L'importanza degli antiossidanti contenuti negli alimenti è da associare sia alla capacità di garantire la shelf-life degli alimenti, ritardando l'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi, sia di esplicare in vivo, nell'organismo umano, effetti benefici contro le malattie cronico – degenerative indotte dallo stress ossidativo e dall'età (Shi, Noguchi & Niki, 2001).

Presenti in maggiore quantità in alimenti di origine vegetale, (cereali, frutta e verdura), ma anche in carne, uova, latte e formaggi, questi composti (principalmente sali minerali, vitamine C, E, β-carotene e i carotenoidi, flavonoidi, acidi fenolici, alcaloidi, derivati della clorofilla, aminoacidi) sono in grado di agire anche se presenti in piccole quantità e molti di loro presentano anche il non trascurabile vantaggio di resistere alle elevate temperature o ad altri trattamenti tecnologici (Kaur & Kapoor, 2001).

Dal punto di vista chimico gli antiossidanti si suddividono in :

Naturali: componenti abituali degli alimenti dove svolgono azione protettiva quali composti fenolici come tocoferoli, flavonoidi e acidi fenolici, composti azotati alcaloidi, derivati della clorofilla, aminoacidi, ammine, carotenoidi e acido ascorbico.

Sintetici: molecole prodotte in laboratorio e largamente impiegate nell'industria alimentare, cosmetica e farmaceutica.

Un'altra classificazione prende in considerazione i meccanismi d'azione degli antiossidanti e in base a questi possiamo distinguerli in antiossidanti che interrompono i meccanismi radicalici a catena o "***chain-breaking***" e in antiossidanti "**preventivi**" (Somogyi, Rosta, Pusztai, Tussay & Nagy 2007):

- Gli antiossidanti "***chain-breaking***" agiscono da inibitori dei radicali liberi donando idrogeno o trasferendo un singolo elettrone alle specie radicaliche. Sono composti che, grazie al potenziale di riduzione negativo, sono in grado di fornire ai radicali liberi gli elettroni di cui sono privi, ripristinando così l'equilibrio chimico del sistema in cui agiscono. La loro efficacia dipende dalla stabilità dei radicali nei quali si trasformano; pertanto, più efficiente è la delocalizzazione

degli elettroni spaiati prodotti nella reazione con i radicali liberi, maggiore è il loro potere antiossidante. Gli antiossidanti "***chain-breaking***" rimuovono le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e includono sia composti idrosolubili, come i polifenoli, la vitamina C e il glutatione, che liposolubili, come la vitamina E, i caroteni, l'acido lipoico e il coenzima Q10 (Somogyi et al., 2007).

- Gli antiossidanti "**preventivi**" non agiscono direttamente sui radicali liberi, ma hanno molteplici meccanismi di azione coinvolti nel rallentare la velocità di ossidazione (Somogyi et al., 2007). Tra questi rientrano i "*metal scavengers*" che prevengono la formazione di radicali liberi agendo da chelanti dei metalli, come ad esempio l'acido citrico e l'EDTA.

Gli antiossidanti sono ulteriormente classificabili in **idrofili**, se sono solubili in acqua, o **idrofobi** (o lipofili), se nei lipidi. In generale, gli antiossidanti **idrosolubili** reagiscono con gli ossidanti nel citoplasma cellulare e nel plasma, mentre quelli **liposolubili** proteggono le membrane cellulari dalla perossidazione dei lipidi.

A seguito delle classificazioni sopra elencate e della definizione di composto bioattivo, è possibile identificare all'interno dei residui della filiera vitivinicola molecole antiossidanti naturali sia "*chain breaking*" che preventivi, a carattere sia idrofilo che idrofobo come composti fenolici, acidi grassi, vitamine, sostanze minerali e fibre alimentari.

1.4.1 Composti fenolici

I composti fenolici costituiscono la classe dei composti bioattivi maggiormente presente nei residui della filiera vitivinicola (Texeira et al., 2014). Dal punto di vista enologico tali composti sono molti importanti, contribuiscono infatti alle differenze tra vini bianchi e rossi, in particolare sono responsabili del colore e del gusto di quest'ultimi. Numerosi studi hanno evidenziato che questi metaboliti secondari posseggono delle proprietà fisiologiche tali da esprimere attività antinfiammatorie,

antimicrobiche, antiossidanti e cardioprotettive tali da promuovere la salute umana e ridurre il rischio di numerose malattie croniche (Horgervosrt et al., 2017).
Dal punto di vista strutturale i composti fenolici sono caratterizzati da un anello aromatico con uno o più sostituenti idrossilici; nelle uve e nei vini vengono suddivisi in due gruppi principali quali fenoli non flavonoidi e fenoli flavonoidi.

1.4.1.1 Fenoli non flavonoidi

Fanno parte di questa classe gli acidi fenolici ed i loro derivati. Essi si differenziano per il grado e la natura dei sostituenti dell'anello benzenico. Gli acidi fenolici delle uve si suddividono in due categorie: **acidi benzoici** ed **acidi cinnamici**. La loro concentrazione varia da 100 a 200 mg/L nei vini rossi e da 10 a 20 mg/L nei vini bianchi. Gli **acidi benzoici** si trovano principalmente sotto forma di eterosidi e di esteri, da cui sono liberati rispettivamente per idrolisi acida ed idrolisi alcalina ed hanno una struttura C6-C1. Gli **acidi cinnamici**, formula di struttura C6-C3, si trovano principalmente sotto forma esterificata con l'acido tartarico o come eterosidi del glucosio. Gli esteri con l'acido tartarico sono l'acido *p*-cumaril tartarico (acido cutarico), acido caffeil tartarico (acido caftarico) e acido ferulil tartarico (acido fertarico) e sono i precursori dei **fenoli volatili**, molecole indesiderate e sgradevoli dal punto di vista olfattivo. Nella Figura 8 sono rappresentati gli acidi fenolici presenti nelle uve e nei vini (Ribèreau-Gayon, Glories, Maujean & Dubourdieu, 2007).

Acidi benzoici	R_2	R_3	R_4	R_5	Acidi cinnamici
p-idrossibenzoico	H	H	OH	H	p-cumarico
Protocatechico	H	OH	OH	H	Caffeico
Vanillico	H	OCH_3	OH	H	Ferulico
Gallico	H	OH	OH	OH	
Siringico	H	OCH_3	OH	OCH_3	Sinapico
Salicilico	OH	H	H	H	
Gentisico	OH	H	H	OH	

Figura 8. Gli acidi fenolici delle uve e dei vini.

1.4.1.2 Fenoli flavonoidi

I flavonoidi sono il gruppo fenolico più ampio e diversificato nel regno vegetale, rappresentando il 60% dei polifenoli alimentari totali (Andersen & Markham, 2005). La loro tipica struttura chimica (Fig.9) è costituita da due anelli aromatici (A e B) collegati da un anello piranico (C). Lo scheletro flavonoide di base può avere numerosi sostituenti, come gruppi idrossilici che sono normalmente presenti nelle posizioni 4, 5 e 7. Il grado di ossidazione dell'anello eterociclico, il numero e le specifiche posizioni dei gruppi OH o la natura dei gruppi funzionali, determinano la funzione dei flavonoidi come agenti antiossidanti, agenti antinfiammatori, agenti citotossici e agenti mutageni in *vitro* o in *vivo*, a dimostrazione di come piccole differenze di struttura determinano grandi diversità nelle attività biologiche (Carratù & Sanzini, 2005). Questa famiglia è particolarmente presente nell'epidermide delle foglie e nella buccia dei frutti, svolgendo la sua funzione più importante di antiossidanti.

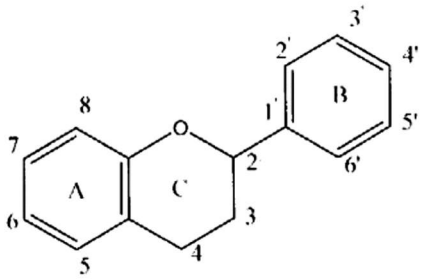


Figura 9. Struttura di base dei fenoli flavonoidi.

I fenoli flavonoidi sono un ampio gruppo formato da diverse famiglie tra cui le principali sono **stilbeni**, **flavoni**, **antociani** e **tannini**.

Gli **stilbeni** sono una classe di composti fenolici che negli ultimi anni ha assunto grande importanza, soprattutto in relazione agli studi effettuati sul loro ruolo nella prevenzione di alcune malattie. Si tratta di molecole costituite da due anelli benzenici uniti per mezzo di una catena etilenica. Fra questi composti, il più importante risulta

essere l'isomero *trans* del resveratrolo o 3,5,4'-triidrossistilbene (Fig.10), prodotto dalla vite in risposta ad attacchi da patogeni. Il resveratrolo è localizzato nella buccia dell'acino e la concentrazione a cui si trova varia da 1 a 3 mg/L (Ribèreau-Gayon, et al., 2007).

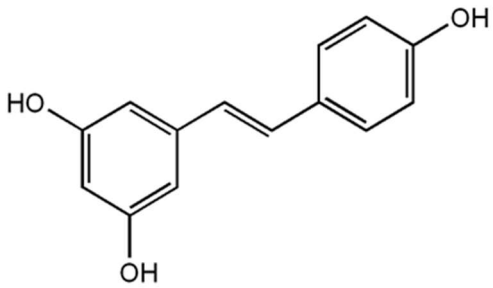


Figura 10. 3,5,4'-triidrossistilbene o trans-resveratrolo.

I **flavoni** sono pigmenti di colore giallo caratterizzati da due anelli benzenici uniti da per mezzo di un eterociclo ossigenato, derivante sia dal nucleo 2-fenil cromone (**flavoni** e **flavonoli**), sia dal nucleo 2-fenil cromanone (**flavanoni** e **flavanonoli**).
Tra questi i composti più comuni sono i **flavonoli** ed i **flavanonoli**, entrambi pigmenti di colore giallo più o meno intenso presenti sia nelle uve a bacca bianche che nera dove si trovano principalmente sotto forma di eterosidica. Essi si differenziano per i sostituenti dell'anello benzenico laterale. I **flavoni** presentano un gruppo OH in posizione R_3, mentre nei **flavonoli** il carbonio in posizione 3 lega un idrogeno. Le molecole di maggiore importanza sono campferolo, quercetina, miricetina e isoramnetina (Fig.11) (Makris, Kallithraka & Kefalas, 2006).

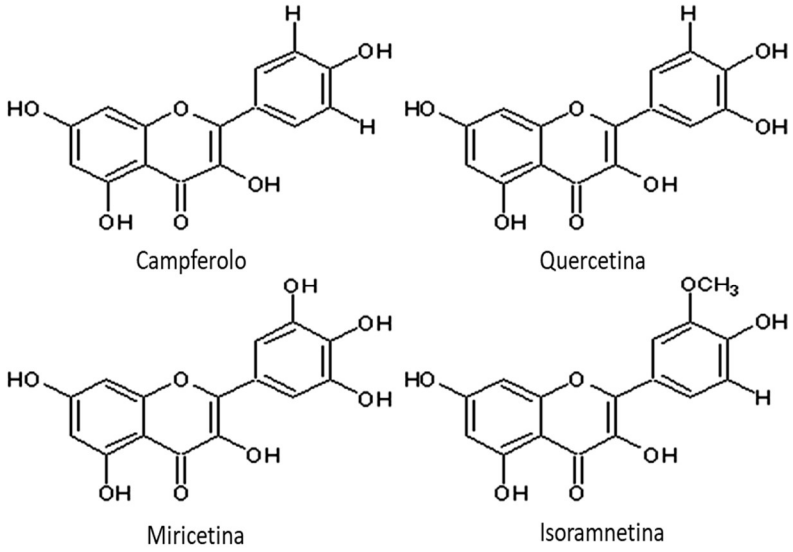
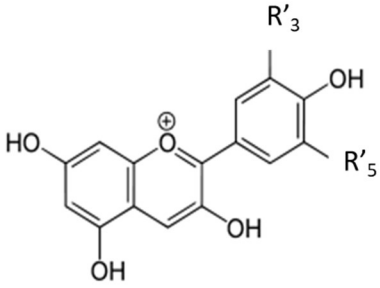


Figura 11. Flavoni e flavonoli delle uve.

Anche i **flavanoni** ed i **flavanonoli** si distinguono per i sostituenti dell'anello benzenico su R_3. Il **flavanonolo** più importante fra quelli identificati nelle uve e nei vini è la diidrossiquercetina detta anche tassifolina (Ribèreau-Gayon et al., 2007).
Gli **antociani** sono i pigmenti rossi delle uve. Si trovano principalmente nella buccia, ma sono presenti anche nelle foglie, ad una concentrazione tanto maggiore quanto la vite è prossima alla fine del ciclo vegetativo (Xia, Deng, Guo & Li, 2010).
La molecola degli **antociani** è costituita da due anelli benzenici uniti per mezzo di un eterociclo ossigenato, insaturo e cariato positivamente, lo ione flavilio, che deriva dal 2-fenil-benzopirilio. Nelle uve e nei vini si distinguono 5 molecole fondamentali, aventi 2 o 3 sostituenti laterali. Si parla di **antocianidine** se sotto forma di aglicone, altrimenti di **antocianine** se sotto forma eterosidica, principalmente con il glucosio (Fig.12).



R'3	R'5	Nome Aglicone
OH	H	Cianidina
OCH_3	H	Peonidina
OH	OH	Delfinidina
OH	OCH_3	Petunidina
OCH_3	OCH_3	Malvidina

Figura 12. Struttura delle antocianidine delle uve e dei vini.

Fra le 5 antocianine, la malvina o malvidina monoglucoside è la molecola dominante in tutte le varietà; essa varia dal 90% (cv. Grenache) a poco più del 50% (cv. Sangiovese) sul totale degli antociani e può essere considerata il composto maggiormente coinvolto nella formazione del colore delle uve a bacca nera e conseguentemente dei vini rossi (Ribèreau-Gayon et al., 2007).

I **tannini** per definizione sono sostanze in grado di formare complessi stabili con proteine ed altri polimeri vegetali come polisaccaridi. Essi reagiscono con le glicoproteine ricche in prolina (PRP) della saliva determinando la sensazione di astringenza, con le colle proteiche nel collaggio dei vini e con le parti proteiche degli enzimi durante l'inibizione dell'attività enzimatica (Ribèreau-Gayon et al., 2007).

I **tannini** derivano dalla polimerizzazione di molecole monomeriche contenenti funzioni fenoliche e la cui configurazione spaziale è correlata con la loro reattività. Secondo la laro natura, si distinguono tannini idrolizzabili, condensati e complessi o misti.

Gallotannini ed ellagitannini fanno parte dei tannini idrolizzabili. Per idrolisi acida liberano rispettivamente acido gallico e acido ellagico. Tali molecole non sono dei tannini naturali dell'uva, ma fanno parte dei tannini commerciali più diffusi nel campo enologico e derivano dal legno di quercia, di castagno e dalla noce di galla. L'acido gallico eventualmente presente, essendo un acido fenolico delle uve, può provenire dalle bucce e dai semi della bacca (Ribèreau-Gayon et al., 2007).

I tannini condensati rappresentano i tannini endogeni delle uve. Le loro unità monomeriche sono rappresentate da flavan-3-oli o catechine; le più importanti sono (+)-catechina ed (-)-epicatechina (Fig.13). Dal punto di vista strutturale, le catechine sono caratterizzate da due anelli benzenici legati da un ciclo ossigenato saturo. Attraverso reazioni di condensazione e/o polimerizzazione dei flavan-3-oli, si ha la formazione di molecole complesse ad elevato peso molecolare tali procianidine dimere, trimere o più in generale oligomere e polimere (Ribèreau-Gayon et al., 2007). Tali composti sono presenti in tutte le parti solide delle uve (buccia, semi, raspi).

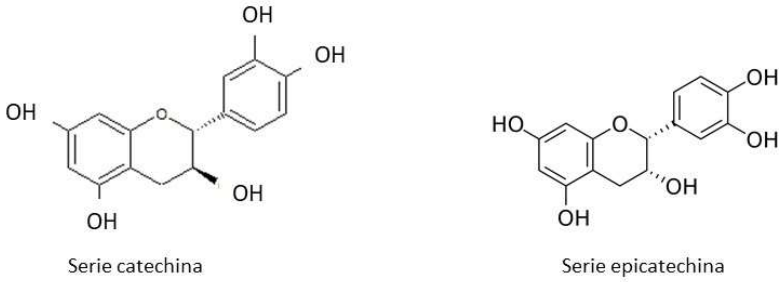


Figura 13. Struttura flavan-3-oli, precursori delle procianidine e dei tannini.

I residui ottenuti dal processo di vinificazione contengono elevate quantità di acidi fenolici, flavanoli, proantocianidine, flavonoli, antociani e stilbeni (Corrales, Toepfl, Butz, Knorr & Tauscher, 2008; Puškaš e Miljic´, 2012). La concentrazione delle molecole fenoliche nelle uve e nei residui della filiera dipende da vari fattori, tra questi i più incidenti sono risultati essere la cultivar, le condizioni climatiche e le operazioni svolte durante il processo di vinificazione (Cvejic´ & Atanackovic´, 2015; Cvejic´ & Gojkovic-Bukarica, 2016). Gharras (2009) ha evidenziato che i composti fenolici più abbondanti nei sottoprodotti della filiera vitivinicola sono i flava-3-oli, principalmente la catechina, e gli acidi fenolici.

Come precedentemente detto, i composti fenolici sono molto importanti per la loro attività antiossidante. E' ben noto che l'attività antiossidante delle uve sia positivamente correlata con la loro composizione in antociani, flavonoli, flavan-3-oli, procianidine e acidi fenolici (Bertelli, Falchi, Lo Scalzo & Morelli, 2004; Kedage, Tilak, Dixit, Devasagayam, & Mhatre, 2007).

La capacità antiossidante dei composti fenolici è dovuta alla presenza di gruppi idrossilici legati alle strutture aromatiche ed alla geometria della molecola.

Come scritto precedentemente i composti fenolici sono antiossidanti naturali "***chain breaking***", reagiscono quindi con le specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Le reazioni tra i composti fenolici ed i ROS nella matrice vino, avvengono in presenza di catalizzatori metallici come il ferro (Fe^{++}) ed il rame (Cu^{++}).

Al pH del vino infatti, i composti fenolici non reagiscono direttamente con l'ossigeno ma con le sue forme radicaliche. Nello specifico, il radicale superossido ($O_2^{\bullet-}$) viene ridotto dalla molecola fenolica trasformandosi in radicale idroperossile ($HOO^{\bullet}$) che, nelle condizioni del mezzo, si converte nella forma di anione perossile (O_2^{2-}). Contemporaneamente i composti fenolici, reagendo, vengono ridotti a semichinoni o benzochinoni, i quali, essendo molecole instabili, riducono il radicale formatosi ad un'altra forma radicalica, portando ad una sequenza di reazioni a catena con la formazione del prodotto finale di reazione, l'H_2O (Oliveira, Ferreira, De Freitas & Silva, 2011). Il meccanismo di reazione tra i composti fenolici e le specie reattive dell'ossigeno è mostrato nella Figura 14.

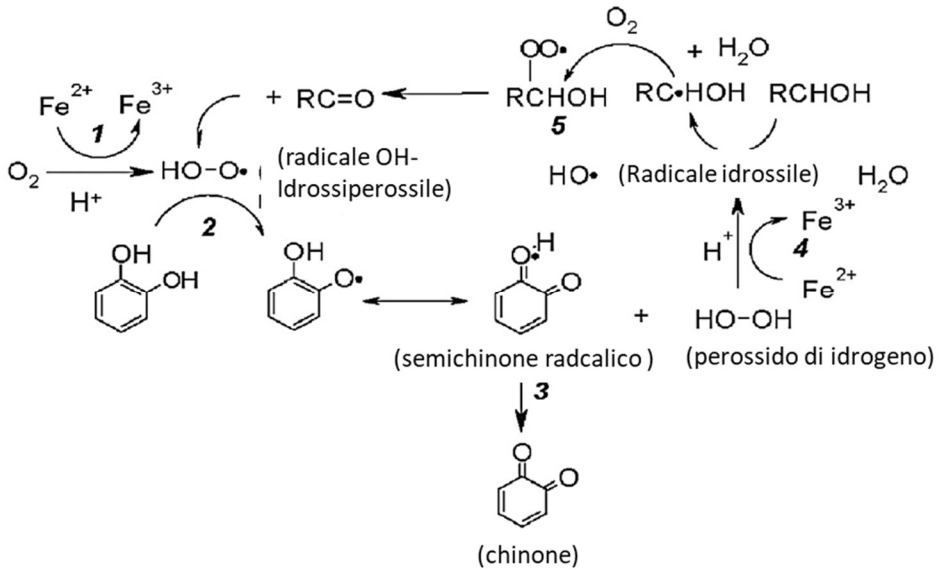


Figura 14. Meccanismo di reazione tra composti fenolici e ROS (Waterhouse & Laurie, 2006).

1.4.2 Acidi grassi

La famiglia degli acidi grassi è direttamente legata ad uno dei sottoprodotti della filiera vitivinicola, i vinaccioli, e al suo derivato principale, l'olio di vinaccioli.

La composizione dell'olio di vinaccioli è stata ampiamente studiata e numerosi benefici sono stati associati alla salute e al benessere, in particolare grazie al suo profilo di acidi grassi e al contenuto di vitamina E. Crews et al. (2006) sostenevano che la composizione dell'olio di vinaccioli fosse influenzata non solo dalla varietà, ma anche dalla zona di origine e quella di coltivazione, dalla maturità delle uve e dalla composizione del suolo. L'olio di vinaccioli è ricco di acidi grassi insaturi, ad esempio, Baydar, Őzkan & Cetin (2007) hanno valutato il contenuto di acidi grassi di diversi vitigni ed hanno osservato che l'acido linoleico era l'acido più rappresentativo (63% – 71%), seguito dagli acidi palmitico (7% – 10%), stearico (3% – 5%) ed oleico (16% – 22%). Gli acidi grassi si possono trovare sotto forma di complessi con altri lipidi o possono essere presenti in forma libera.

Gli acidi grassi insaturi sono infatti particolarmente importanti, date le loro proprietà idratanti ed emollienti, per l'industria cosmetica (Da Porto, Porretto & Decorti, 2013). La presenza di acidi grassi è infatti fondamentale per la fisiologia dell'epidermide, con un impatto importante come componenti del film lipidico che protegge la superficie epiteliale (Rodrigues et al., 2015). Inoltre, il contenuto dell'acido grasso monoinsaturo, acido oleico, è importante per il suo effetto sulla stabilità all'ossidazione dell'olio, caratteristica importante nelle formulazioni cosmetiche (Lachman et al., 2015).

Secondo Zielinska & Nowa (2014) gli acidi grassi più importanti per i cosmetici sono gli acidi linoleici e α-linolenici, in quanto non sono ingredienti comedogeni e limitano la formazione di eczemi. Inoltre, entrambi gli acidi grassi possono essere incorporati nei componenti lipidici delle membrane cellulari, rigenerando la barriera lipidica danneggiata dell'epidermide e limitando la perdita di acqua. Inoltre, gli acidi grassi ammorbidiscono lo strato corneo dell'epidermide, riducendone le infiammazioni (Babu, Chen, Kanikkannam, 2015).

Per esercitare le sue proprietà bioattive, l'olio deve essere isolato dai vinaccioli. A causa della bassa resa di estrazione, la tecnica maggiormente utilizzata è un estrazione con l'utilizzo di solventi, ma Van Hoed et al. (2011) sostengono che per una migliore estrazione delle componenti antiossidanti sarebbe opportuno utilizzare una spremitura a freddo, ossia eseguita a basse temperature.

Barba, Zhu, Koubaa, Sant'Anna & Orlien, (2016) sostenevano infatti che soluzioni innovative come l'utilizzo di campi elettrici pulsati, ultrasuoni o persino processi ad alta pressione, dovevano essere sperimentate per ridurre al minimo la degradazione dei composti bioattivi e soddisfare i requisiti delle tecnologie verdi per estrarre composti antiossidanti dai sottoprodotti.

1.4.3 Vitamine

I vinaccioli sono il sottoprodotto più ricco in vitamina E; l'olio di vianccioli contiene infatti elevate quantità di tocoferoli e tocotrienoli comprese tra 10 e 530 mg di vitamina E/Kg di olio (Barba et al., 2016; Dos Santos Freitas, Jacques, Richter, da Silva & Caramão, 2008). La vitamina E è un potente antiossidante naturale composta da otto isoforme, tra le quali quattro tocoferoli (α-tocoferolo, β-tocoferolo, γ-tocoferolo e δ-tocoferolo) e quattro tocotrienoli (α-tocotrienolo, β-tocotrienolo, γ-tocotrienolo e δ-tocotrienolo). Tra le varie forme, l'α-tocoferolo è l'isoforma più potente e abbondante nei sistemi biologici (Carocho & Ferreira, 2013).

Nei prodotti cosmetici la vitamina E è comunemente usata come ingrediente funzionale prevenendo lo stress ossidativo delle cellule epiteliali (Dos Santos Freitas et al., 2008; Soto, Falqué & Domìnguez, 2015). Inoltre, i tocoferoli sono coinvolti nella protezione dall'ossidazione dei radicali liberi degli acidi grassi polinsaturi.

Hagen, Keller & Edwards (2008) hanno studiato il profilo delle vitamine idrosolubili di uve immature, circa un mese prima dall'invaiatura. Tali Autori hanno osservato che nelle uve, sia di cultivar a bacca nera che a bacca bianca erano presenti vitamine quali biotina ed acido pantotenico. Gli stessi Autori hanno analizzato il profilo vitamine delle stesse cultivar a maturazione ultimata ed hanno osservato che la concentrazione in biotina e acido pantotenico non variava significativamente in funzione dello stadio di maturazione delle uve, ma ampliando la ricerca sia in annate che zone geografiche diverse, Hagen et al. (2008), hanno concluso che i fattori che incidevano maggiormente sul profilo delle vitamine idrosolubili erano l'annata, la zona geografica e la cultivar di appartenenza. Nello specifico, per la biotina, il fattore maggiormente incidente è risultato essere la cultivar, essa era presente in concentrazioni minori nelle cultivar a bacca bianca rispetto a quelle a bacca rossa, mentre per l'acido pantotenico non è stato osservato lo stesso trend; per le cultivar a bacca bianca è stata osservata una concentrazione media di 449 µg/L simile a quella determinata per le cultivar a bacca rossa, pari a 431 µg/L.

La presenza di vitamine idrosolubili nelle uve è stata confermata da Andrade et al. (2019), i quali hanno osservato la presenza di acido pantotenico, tiamina, vitamina C o acido ascorbico, riboflavina, niacina e vitamina B-6 in cultivar a bacca rossa appartenenti alla specie *Vitis vinifera*. Gli Autori hanno determinato le proprietà antiossidanti di tali cultivar e dei loro sottoprodotti (bucce, vinaccioli e vinaccia), concludendo che anche le vitamine idrosolubili contribuiscono all'attività antiossidante delle uve e dei suoi sottoprodotti.

1.4.4 Sostanze minerali

I minerali nell'uva sono generalmente classificati in gruppi in base alla loro mobilità nel floema. Tra questi i cationi minerali come potassio, fosforo, zolfo, magnesio, ferro, rame e calcio, sono elementi essenziali per il metabolismo di tutte le cellule, in quanto hanno funzione di cofattori aprotici nell'attività enzimatica di ossidoreduttasi e chinasi. Tali cationi hanno una grande mobilità e sono accumulati e soprattutto localizzati nelle bucce durante la maturazione. Di conseguenza, le bucce presentano livelli più alti di minerali dei vinaccioli, soprattutto a causa del loro alto contenuto di sali di potassio localizzati nelle bucce, più precisamente nelle cellule ipodermiche. Il tipo e soprattutto la durata dei processi di macerazione hanno una forte influenza sull'estrazione e sul riassorbimento dei minerali durante la vinificazione, influenzandone notevolmente il contenuto rimanente nella vinaccia. (Ribèreau-Gayon et al., 2007).

García-Lomillo, Gonzalez-SanJose, Del Pino-Garcià, Rivero-perez & Muniz-Rodriguez (2014) hanno studiato la quantità di sostanze minerali contenuta in vinaccia, buccia e vinaccioli. I vinaccioli presentavano il minor contenuto di ceneri (≈ 3% di sostanza secca) rispetto alla vinaccia e alle bucce, le quali presentavano una elevata concentrazione di sostanze minerali, rispettivamente, ≈11 e 14% di sostanza secca. Nei tre sottoprodotti analizzati, il potassio era il principale minerale presente. Gli Autori hanno osservato il più alto contenuto in potassio nella buccia e nella

vinaccia con una concentrazione pari a 43 e 38 mg/g di sostanza secca rispettivamente, seguite dai vinaccioli in cui il tenere del catione minerale si aggirava intorno ai 4 mg/g di sostanza secca (García-Lomillo et al., 2014). Nello studio sono stati determinati altri cationi minerali quali calcio (≈2–3 mg/g), fosforo (≈ 2–3 mg/g) e sodio (≈ 0.1–1 mg/g).

Il potassio ed i suoi sali sono particolarmente importanti per l'idratazione, la rigidità e il pH dello strato corneo della pelle (Rawlings & Matts, 2005).

Non solo, il sistema cellulare è protetto dalle ossidazioni attraverso un sistema antiossidante che si suddivide in due gruppi principali, quello enzimatico e quello non enzimatico (Carocho & Ferreira, 2013). Tra gli elementi costituitivi del sistema antiossidante non enzimatico, le sostanze minerali ricoprono un importante azione protettiva assieme al cofattore Q10, vitamine, composti fenolici, carotenoidi, composti organici solforati e composti azotati non proteici (Poljšak & Dahmane, 2012).

1.4.5 Fibre alimentari

Le fibre alimentari sono definite come "polimeri di carboidrati che presentano dieci o più unità monomeriche, le quali non sono digeribili dall'intestino tenue" (FAO/WHO, 2010). I principali effetti legati al consumo di fibre alimentari sono la riduzione del rischio di malattie cardiovascolari, la protezione contro il cancro, la prevenzione del diabete dovuta ad un minor assorbimento di glucosio, il miglioramento del processo digestivo, la riduzione del colesterolo nel sangue e la prevenzione dell'obesità (Beres et al., 2017). La fibra alimentare è suddivisa in fibra solubile e fibra insolubile, della prima categoria fanno parte pectine, gomme, β-glucani, mentre cellulosa, emicellulosa e lignina fanno parte della fibra insolubile (Beres et al., 2017).

Nonostante la maggior parte della fibra derivi dai cereali, anche i sottoprodotti della filiera vitivinicola, quali vinaccia, buccia e vinaccioli, contengono buone

concentrazioni di fibra alimentare (Deng et al., 2011). Ad esempio le bucce sono un materiale lignocellulosico caratterizzato da una grande quantità di zuccheri emicellulosici che, dopo idrolisi, producono elevate quantità di monomeri quali xilosio e glucosio (Devesa-Rey et al., 2011). Le bucce hanno anche una grande quantità di pectine, esse sono un ingrediente alimentare ad alto valore funzionale usato come agente gelificante e stabilizzante. Come riportato da Gonzales-Centeneo et al. (2010), le pectine con un basso grado di metil esterificazione, sono le principali componenti delle pareti cellulari della vinaccia, mentre nelle strutture cellulari della parete del raspo, la cellulosa è la molecola prevalente.

La composizione monosaccaridica della vinaccia è stata ampiamente studiata. Vari Autori sottolineano che le componenti principali sono ramnosio, arabinosio, xilosio, mannosio, galattosio, glucosio e acido galatturonico (Beres et al., 2016; Ferreira, Pinho & Cabral, 2013; González-Centeno et al., 2010). La Tabella 8 mostra la composizione monosaccaridica di vinacce provenienti da cultivar diverse.

Tabella 8. Composizione in monosaccaridi di vinacce provenienti da cultivar diverse.

Cultivar	Ramnosio	Arabinosio	Xilosio	Mannosio	Galattosio	Glucosio	Acido galatturonico
Pinot Nero [b]	2.0	20.4	3.0	11.8	8.8	37.0	17
Chardonnay [c]	4.6	29.8	3.5	8.5	14.5	39.1	-
Chardonnay [d]	0.1	6.4	14.1	4.8	3.9	29.8	40.7
Mix cultivar a bacca bianca [e]	0.4	1.5	4.6	2.7	2.0	0.2	4.13
Cultivar a bacca nera [f]	2.5	10.2	9.6	10.8	5.3	61.1	-
Vitis vinifera L. [g]	1.7	5.5	20.4	4.8	4.9	62.7	-
Cabernet Sauvignon [h]	3.8	21.2	7.7	19.9	15.5	10.7	21.2

[b] Beres et al., (2016); [c] Ferreira et al., (2013); [d] Gonzales-Centeno et al., (2010); [e] Rondeau et al., (2013); [f] Mendes et al., (2013); [g] Prozil et al., (2012); [h] Corbin et al., (2015).

Alcuni studi hanno correlato il contenuto di fibre alimentari dei sottoprodotti con la loro capacità antiossidante. Tale combinazione viene tradotta come “fibra alimentare antiossidante” ed è stata definita da Saura-Calixto (1998) come un prodotto composto da oltre il 50% di fibre alimentari su un base di sostanza secca che presenta una capacità antiossidante equivalente pari ad almeno 50 mg di vitamina E misurata con il metodo DPPH. Recenti studi hanno sfruttato ed evidenziato le proprietà antiossidanti ed i benefici di tali composti per le aree di applicazione cosmeceutiche e nutraceutiche (Soto et al., 2015).

1.5 TECNICHE DI ESTRAZIONE

La sostenibilità delle tecniche estrattive costituisce una questione fondamentale per ottenere una razionale valorizzazione dei sottoprodotti della filiera vitivinicola. Pertanto, la composizione qualitativa e quantitativa degli estratti fenolici dei sottoprodotti dipende non solo dalla cultivar, dalle condizioni agro-climatiche della zona di produzione e dal tipo di residuo considerato (raspi, vinaccioli, bucce, vinaccia, feccia di fermentazione, uva immatura o da diradamento), ma anche dai parametri fisico-chimici del processo industriale, nonché dalla combinazione di solventi e procedure di estrazione impiegate. Ulteriori fattori come la qualità del materiale vegetale, le condizioni di conservazione e il pretrattamento sono tutti decisivi per definire il profilo biochimico degli estratti fenolici e, quindi, per la loro potenziale attività biologica (Teixeira et al., 2014). Inoltre, alcune caratteristiche dei composti bioattivi dei sottoprodotti della filiera vitivinicola, tali la loro elevata bioattività, la loro sensibilità alla degradazione enzimatica e termica, rendono difficile la loro lavorazione (Atanacković, et al., 2012; Miljić, Puškaš, Vučurovic & Razmovski, 2014). E' necessario quindi ottimizzare tutti questi parametri al fine di produrre estratti di alta qualità con elevate proprietà biologiche, utilizzabili nelle industrie alimentari, cosmetiche e/o farmaceutiche (Teixeira et al., 2014).

Al fine di ottenere degli estratti biologicamente attivi risulta necessario analizzare i sottoprodotti della filiera vitivinicola in modo tale da sviluppare delle procedure di estrazione ottimizzate in termini di tempi di estrazione, del consumo di solventi organici e al mantenimento del recupero dei composti di interesse (Teixeira et al., 2014).

Ad oggi, numerose sono le tecniche di estrazione utilizzate per isolare i composti fenolici dai sottoprodotti. Tali tecniche si suddividono in tecniche convenzionale e tecniche innovative.

1.5.1 Tecniche convenzionali

Le tecniche di estrazione convenzionali si basano principalmente o sull'utilizzo di solventi organici e quindi la resa di estrazione dipende dal potere estrattivo del solvente utilizzato oppure sull'applicazione di calore e/o miscelazione, tecnica che, sebbene faciliti il trasferimento di massa fra le differenti fasi del sistema, comporta un consumo elevato di energia ed il rischio di degradazione dei composti termolabili (Azmir et al., 2013).

Le tecniche convenzionali comunemente utilizzate sono:

1. Estrazione Soxhlet
2. Macerazione
3. Idrodistillazione

1.5.1.1 Estrazione Soxhlet

L'estrattore Soxhlet è stato proposto per la prima volta dal chimico tedesco Franz Ritter Von Soxhlet nel 1879. Il sistema era stato progettato principalmente per l'estrazione di lipidi ma negli anni è stato ampiamente utilizzato per l'estrazione di composti bioattivi a partire da diverse matrice vegetali (Azmir et al., 2013). L'estrattore Soxhlet si basa su una estrazione in continuo che permette la separazione di molecole presenti in matrici solide o semisolide, attraverso l'utilizzo di solventi volatili. E' costituito da tre componenti fondamentali: un pallone con collo smerigliato, un estrattore ed un condensatore (Fig.15). In generale, una piccola quantità di campione in forma solida viene posta in un ditale costituito da carta filtrante, permeabile nei confronti del solvente, all'interno della camera di estrazione. L'opportuno solvente viene posto nel pallone alla base dell'estrattore. Il solvente viene portato ad ebollizione, passando così nell'estrattore e nel condensatore; il

condensato cade nuovamente nella camera di estrazione, attraversando la carta filtrante caricandosi così di soluto, e viene spillato da un condotto laterale dove si accumulano il soluto in basso e il solvente in alto. Il solvente viene fatto ricircolare da qui al pallone. Il processo viene eseguito ripetutamente fino al completamento dell'estrazione (Azmir et al., 2013).

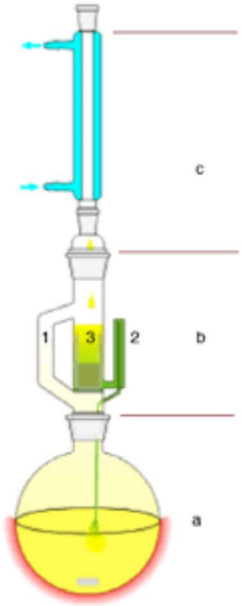


Figura 15. Estrattore Soxhlet; a) pallone con il solvente b) estrattore c) condensatore; 1) braccio laterale che permette il passaggio dei vapori del solvente al condensatore 2) sifone per lo svuotamento dell'estrattore 3) ditale contenente il composto da estrarre.

L'estrattore Soxhlet è considerato un modello di confronto per le tecniche alternative di estrazione. Rispetto ad altri tipi di estrattore, il metodo Soxhlet presenta il vantaggio di utilizzare una quantità minore di solvente, grazie al fatto che il solvente viene immesso continuamente in circolo (Azmir et al., 2013).

1.5.1.2 Macerazione

La macerazione è una delle tecniche di estrazione utilizzate da più tempo. In passato veniva utilizzata come metodo "casalingo" per la produzione di oli essenziali (Azmir et al., 2013). La macerazione consiste nel tenere a contatto, per un periodo di tempo variabile, la matrice solida o semi-solida con un solvente opportuno che può essere ad esempio acqua o etanolo. Tale operazione viene utilizzata sia su piccola scala che su scala industriale, è infatti molto utilizzata in cantina durante il processo di vinificazione per l'estrazione di composti fenolici e aromatici dal mosto.
La macerazione su piccola scala vede il susseguirsi di alcune operazioni (Azmir et al., 2013):

a. Il materiale vegetale di partenze viene ridotto in dimensioni più piccole con il fine di aumentare la superficie di scambio con il solvente;
b. Un solvente specifico, per la matrice vegetale selezionata, viene aggiunto in un serbatoio chiuso;
c. Dopo un tempo idoneo alla procedura di estrazione adottata, il liquido ottenuto viene allontanato e il residuo solido del processo, la vinaccia, viene pressata al fine di recuperare le molecole bioattive rimaste al suo interno;
d. Il liquido ottenuto e quello di pressa vengono omogenizzati e filtrati per eliminare le impurità.

1.5.1.3 Idrodistillazione

L'idrodistillazione è un metodo di estrazione tradizionale utilizzato per la produzione di oli essenziali e l'ottenimento di composti bioattivi a partire da materiale vegetale (Azmir et al., 2103). Per questo tipo di estrazione non vengono utilizzati solventi organici e il materiale vegetale, prima di essere inviato all'idrodistillazione, può essere sottoposto ad un processo di disidratazione. Vengono eseguiti tre tipi di idrodistillazione: distillazione con acqua, distillazione con acqua e vapore e

distillazione con vapore diretto (Vankar, 2004). Generalmente, nel processo di idrodistillazione, il materiale vegetale viene posto in dei contenitori specifici, a cui viene addizionata acqua in quantità sufficiente e portata ad ebollizione. In alternativa, al campione di partenza viene insufflato direttamente il vapore. Segue un raffreddamento indiretto attraverso la condensazione dell'acqua. La miscela condensata, costituita da acqua, vapore ed estratto, passa dal condensatore al separatore, dove i composti bioattivi vengono separati dall'acqua (Silva, Nelson, Drummond, Dufosse & Gloria, 2005).
I fattori maggiormente incidenti per la liberazione dei composti bioattivi dai tessuti vegetali sono l'acqua ed il vapore (Azmir et al., 2013).
L'idrodistillazione si basa su tre principi chimico-fisici: idrodiffusione, idrolisi e degradazione termica. Uno svantaggio di questo metodo sono infatti le elevate temperature a cui l'estrazione viene eseguita, che possono portare alla degradazione delle molecole bioattive presenti nel materiale vegetale di partenza. Tale problematica limita l'utilizzo di tale processo all'estrazione di composti termostabili, che possiedono una certa resistenza all'aumento di temperatura (Azmir et al., 2013).

Le tecniche di estrazione convenzionali sono quelle più utilizzate per le matrici vegetali grazie alla loro facilità di impiego, la loro buona efficienza e la loro ampia applicabilità. La resa di tali tecniche dipende però dalla scelta del solvente (Cowan, 1999). La polarità dei composti target è uno dei parametri più importanti per la scelta del solvente. Anche fattori come l'impatto ambientale, l'utilizzo di solventi meno tossici per l'ambiente e la salute umana e la sostenibilità economica, dovrebbero essere presi in considerazione nella scelta del solvente di estrazione (Azmir et al., 2103). In tabella 9 sono elencati alcuni dei composti bioattivi estraibili con solventi diversi.

Tabella 9. Esempio di alcuni composti bioattivi estratti con solventi diversi (mod. da Cowan (1999)).

Acqua	Etanolo	Metanolo	Cloroformio	Diclorometanolo	Etere	Acetone
Antocianine	Tannini	Antocianine	Terpenoidi	Terpenoidi	Alcaloidi	Flavonoidi
Tannini	Polifefenoli	Terpenoidi	Falvonoidi		Terpenoidi	
Terpenoidi	Falvonidi	Tannini				
Saponi	Terpenoidi	Flavoni				
	Alcaloidi	Polifenoli				
		Saponi				

E' evidente quanto la scelta del solvente possa influire sull'estrazione dei composti bioattivi. Librán et al. (2013) hanno studiato il recupero dei composti fenolici dalla vinaccia utilizzando come solvente di estrazione una soluzione di etanolo al 75%. A seguito di un'estrazione di 2 ore, ad un pH pari a 2, gli Autori hanno calcolato una resa in antociani del 40% rispetto alla frazione fenolica totale.

Nonostante i numerosi vantaggi, le tecniche convenzionali sono considerate ad alto impatto ambientale; pertanto delle tecniche alternative sono risultate necessarie.

1.5.2 Tecniche non convenzionali

Le tecniche di estrazione non convenzionali sono state introdotte per eliminare le problematiche delle tecniche di estrazione convenzionali quali la durata del processo, la necessità dell'impiego di un solvente costoso e altamente puro, la bassa selettività estrattiva e la decomposizione termica dei composti termolabili (Luque de Castro & Garcia-Ayuso, 1998). Alcune di queste tecniche sono considerate "*green*" in quanto conformi agli standard stabiliti dalla *Environmental Protection Agency*, USA (http://www.epa.gov/greenchemistry/pubs/about_gc.html). Nel dettaglio, questi includono una sintesi di chimica meno pericolosa attraverso la progettazione di prodotti chimici, tra cui solventi, più sicuri, efficienza energetica, uso di materie prime rinnovabili, riduzione di composti di derivazione, progettazione per prevenire la degradazione chimica o termica dei componenti bioattivi ed un' analisi di ottimizzazione dei tempi al fine di ridurre l'inquinamento e di prevenzione degli incidenti (Azmir et al., 2103).

Le tecniche non convenzionali utilizzate sono:

1. Estrazione mediante campo elettrico pulsato (PEF)
2. Estrazione mediante applicazione di scariche elettriche ad alto voltaggio (HVED)
3. Estrazione mediante riscaldamento pulsato (POH)
4. Estrazione mediante ultrasuoni (USN)
5. Estrazione microonde assistita (MAE)
6. Estrazione con fluido supercritico (SC-CO_2)
7. Estrazione mediante processo al alta pressione (HP)
8. Estrazione con solvente accelerata (ASE)
9. Estrazione assistita mediante solvente idrotropico

1.5.2.1 Estrazione mediante campo elettrico pulsato (PEF)

L'estrazione mediante campo elettrico pulsato (PEF) è un promettente metodo alternativo per il recupero dei composti biologicamente attivi a partire dai residui dell'industria alimentare (Deng et al., 2015; Galanakis, 2012; Koubaa et al., 2015). Il materiale viene posto fra due elettrodi, l'ampiezza di impulso nelle apparecchiature PEF è compresa fra 100-300 V/cm e 20-80 kV/cm (Koubaa et al., 2015). Il processo viene condotto a temperatura ambiente o a temperatura leggermente più alta per un tempo inferiore ad un secondo (µs o ms) (Barbosa-Cánovas, Pierson, Zhang, & Schaffner, 2000). Quando le cellule vegetali vengono sottoposte ad un determinato campo elettrico, le membrane cellulari si danneggiano, ciò porta alla formazione di pori temporanei o permanenti. Tale fenomeno di danneggiamento cellulare è definito "elettroporazione" (Fig.16).

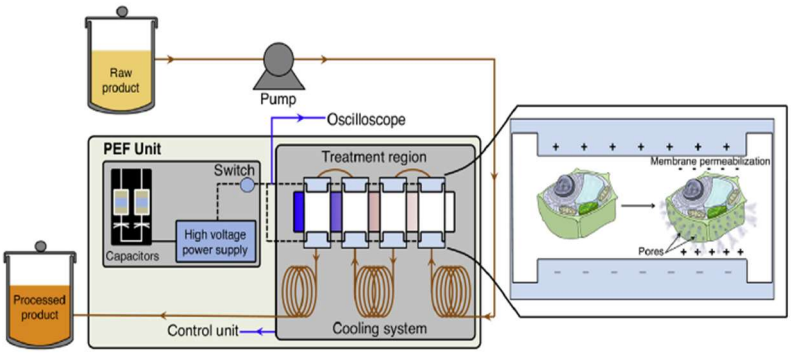


Figura 16. Rappresentazione schematica di un sistema di estrazione PEF in continuo (Barba et al., 2016)

La PEF è stata ampiamente studiata per il recupero degli antiossidanti per la valorizzazione dei residui della filiera vitivinicola. La concentrazione dei composti

antiossidanti recuperati varia in funzione della matrice vegetale di partenza e dalle condizioni di estrazione applicate (Barba et al., 2016).

La forza del campo elettrico applicato è uno dei fattori che influenza maggiormente la concentrazione dei composti bioattivi estratti. Balasa, Tiepfl & Knorr (2006) valutarono gli effetti della PEF a bassa intensità sull'estrazione della componente fenolica a partire da bacche di *Vitis vinifera*. Gli Autori osservarono che, con l'applicazione di un campo elettrico a bassa intensità (0.5 kV/cm, 50 impulsi, 0.1 kJ/kg), il contenuto totale di polifenoli aumentava del 13% rispetto al campione non trattato. Applicando un campo elettrico di forza maggiore (2.4 kV/cm, 50 impulsi, 2.3 kJ/kg), gli stessi Autori hanno ottenuto risultati ancora più promettenti, estraendo una concentrazione di polifenoli totali pari al 28%, grazie all'aumento del grado di permeabilizzazione della membrana cellulare. Nonostante i risultati ottenuti dagli Autori precedentemente citati, Barba et al. (2016) sostenevano che non sempre l'applicazione di un campo elettrico ad elevata intensità era correlato positivamente all'aumento dell'estrazione della componente fenolica, ma, che anche l'applicazione di un campo elettrico a bassa intensità, attraverso l'induzione di condizioni di stress a livello cellulare, portava alla sintesi di metaboliti secondari come i polifenoli (Barba et al., 2016).

Altri Autori hanno valutato l'utilizzo della PEF per incrementare il contenuto in antociani ed in polifenoli totali ed anche l'attività antiossidante, di estratti liquidi ottenuti da uve Cabernet Franc e Cabernet Sauvignon sa seguito di macerazione a freddo di 6 giorni a 6°C (El Darra, Grimi, Vorobiev, Maroun & Louka, 2013). Lo studio ha evidenziato che il trattamento PFE (5 kV/cm, 1 ms, 48 kJ/kg) ha condotto ad un notevole incremento in flavonoidi (quercetina ed epicatechina) e antociani totali dell'estratto liquido.

In recenti studi l'estrazione mediante campo elettrico pulsato è stata applicata ad alcuni dei sottoprodotti della filiera vitivinicola tali vinacce fermentate e raspi, osservando un buon recupero dei composti fenolici, in particolare antociani per le

vinacce fermentate e flavonoidi per i raspi (Barba, Brianceau, Turk, Boussetta & Vorobiev, 2015; Rajha, Boussetta, Louka, Maroun & Vorobiev, 2014).

1.5.2.2 Estrazione mediante applicazione di scariche elettriche alto voltaggio (HVED)

Diversi ricercatori hanno utilizzato l'estrazione HVED per recuperare composti ad alto valore aggiunto da varie matrici vegetali (Boussetta e Vorobiev, 2014). L' applicazione di un campo elettrico abbastanza intenso (fino a 40 kV e 10 kA), provoca una scarica di elettroni che dall'elettrodo principale ad alta tensione (ad ago) si propaga nel mezzo di estrazione per poi arrivare all'elettrodo a terra. L'interruzione del campo elettrico che si verifica è accompagnata da vari fenomeni fisici secondari che portano alla frammentazione della struttura delle cellule vegetali, facilitando di conseguenza il rilascio di composti intracellulari (Fig.17).
Boussetta et al (2012) hanno studiato la resa di estrazione di composti fenolici, mediante HVED su scala pilota (35 L), a partire dalle vinacce. Dopo il trattamento HVED, l'estrazione dei polifenoli totali è stata aumentata di 7 volte rispetto allo stesso campione non sottoposto al processo. Gli stessi Autori hanno cercato di riprodurre lo stesso esperimento su scala pilota. In tal caso hanno concluso che per ottenere la stessa resa percentuale in polifenoli recuperati, il consumo di energia del processo era troppo elevato (Boussetta et al., 2012).
Più tardi, Boussetta et al. (2013) hanno studiato il potenziale di HVED (40 kV) per estrarre composti fenolici a partire da vinaccioli, confrontando tale tipologia di estrazione con la PEF (8 e 20 kV / cm, 0 e 20 ms). I risultati hanno mostrato che la HVED associata ad una successiva estrazione in etanolo (30 g di etanolo/100 g di solido), hanno incrementato la resa di estrazione in polifenoli raggiungendo un massimo di 9 g di equivalente acido gallico (GAE)/100 g di sostanza secca.

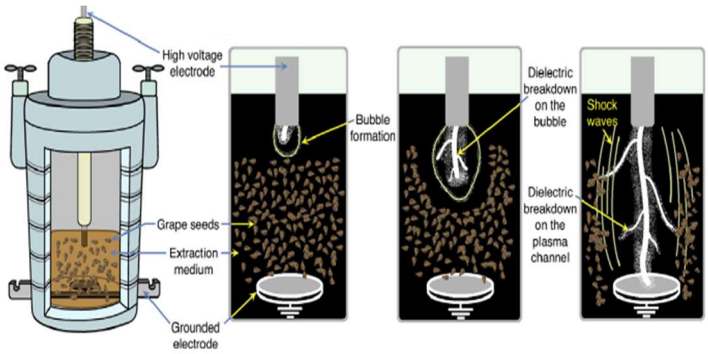


Figura 17. Rappresentazione di un sistema di estrazione HVED su scala di laboratorio (Barba et al., 2016).

1.5.2.3 Estrazione mediante riscaldamento pulsato (POH)

In alcuni casi, l'applicazione di campi elettrici moderati a temperatura ambiente non è sufficiente per danneggiare le cellule dei tessuti vegetali situate nella buccia dell'uva. Pertanto, l'applicazione di POH, che consiste nell'aumentare la temperatura mediante movimenti ionici a seguito dell'applicazione del trattamento PEF, potrebbe essere uno strumento utile per recuperare composti intracellulari a campo elettrico moderato (<1000 V/cm) e moderate temperature (20 e 50°C) (Praporscic, 2005). Il meccanismo dell'estrazione mediante riscaldamento pulsato è mostrato nella Figura 18. Su tale principio, sono stati valutati gli effetti dell'estrazione POH (20 e 800 V/cm) a diverse percentuali di etanolo in acqua (0 e 50% p/p) sul recupero di polifenoli da vinacce di uva rossa (El Darra, Grimi, Vorobiev, Louka, & Maroun, 2013). Gli Autori hanno osservato che il trattamento POH, condotto a 400 V/cm per 60 min a 50°C e con una soluzione idroalcolica al 30% di etanolo, è stato in grado di indurre la distruzione della membrana cellulare, aumentando così l'estrazione di polifenoli dalla vinaccia, ottenendo il 36% in più di recupero di polifenoli rispetto al campione non trattato.

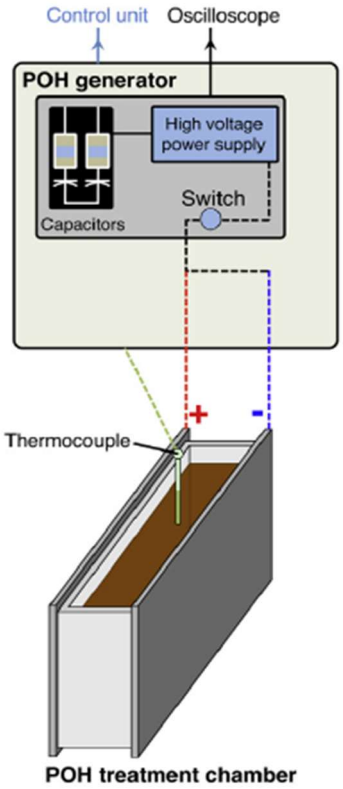


Figura 18. Rappresentazione schematica di un sistema di estrazione POH (Barba et al., 2016).

1.5.2.4 Estrazione mediante ultrasuoni (USN)

L'estrazione mediante ultrasuoni si basa sul fenomeno della cavitazione, generato da irradiazione di ultrasuoni (frequenze maggiori di 20 kHz), che provocano la rottura delle membrane biologiche, facilitando così il rilascio di composti estraibili (Fig.19). Grazie all'effetto cavitazionale, che migliora il trasferimento di calore e di massa attraverso la rottura delle pareti delle cellule vegetali, gli ultrasuoni sono recentemente sempre più utilizzati come processo autonomo o come parte della procedura graduale per l'estrazione di composti biologicamente attivi. Il trattamento con USN offre numerosi vantaggi come una maggiore penetrazione del solvente nel

materiale cellulare, tempi di lavorazione e di permanenza più brevi, rese di estrazione più elevate, basso consumo di solventi ed emulsionanti, elevata produttività, riduzione del rumore, estrazione di componenti labili alle elevate temperature, risparmio significativo nella manutenzione, minore impiego di energia necessaria per l'elaborazione del processo (Roselló-Soto et al., 2015).

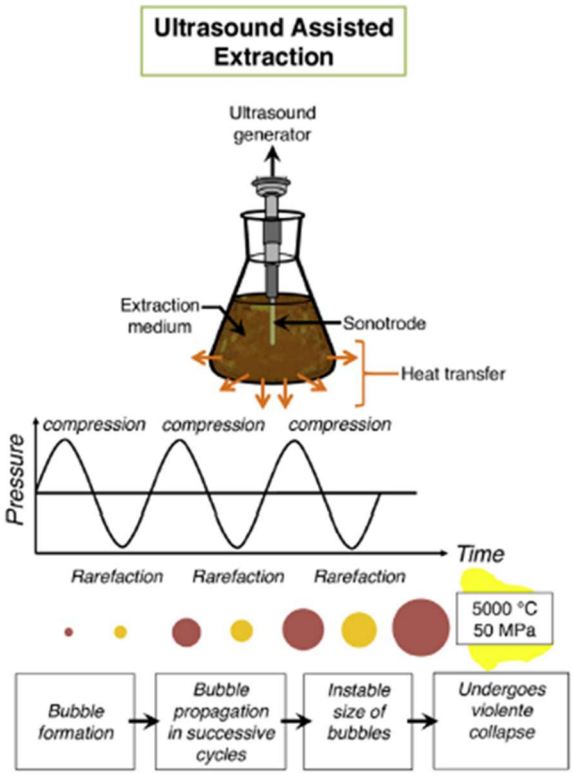


Figura 19. Principio del sistema di estrazione ad ultrasuoni assistita e fenomeno della cavitazione (Barba et al., 2016).

Molteplici sono gli studi presenti in letteratura dell'utilizzo dell'estrazione ad ultrasuoni per il recupero di composti fenolici dalla polpa della mela, mostrando promettenti risultati come processo alternativo alla procedura convenzionale (Barba et al., 2016).

Recentemente, Da Porto et al. (2013), hanno comparato l'andamento dell'estrazione convenzionale solido-liquido (Soxhlet) con l'estrazione ultrasuono assistita per il recupero dei composti fenolici dall'olio dai vinaccioli. Gli Autori hanno osservato che la resa di estrazione tra i due metodi era simile (14g/100g) solo dopo aver condotto l'estrazione con il metodo Soxhlet per 6 ore rispetto ai 30 minuti necessari della USN.

Cho, Hong, Chun, Lee & Min (2006) hanno studiato l'impatto della USN sul recupero di resveratrolo da bacche cv. Campbell e Gerbong. Essi osservarono una resa estrattiva più alta del 24% e del 28% rispettivamente comparata al tradizionale metodo di estrazione con solvente a 60°C per 30 minuti. Successivamente l'estrazione USN (1010 kJ/kg) è stata utilizzata per estrarre proteine e polifenoli a partire dai raspi, ottenendo un recupero significativo dei composti fenolici (Rajha et al., 2014).

1.5.2.5 Estrazione microonde assistita (MAE)

Tale tecnica di estrazione si base sull'utilizzo di onde elettromagnetiche che interagiscono con le molecole polari generando calore. Nello specifico, queste microonde penetrano nel prodotto, riscaldando in modo omogeneo l'acqua e la matrice inducendo un surriscaldamento dell'acqua all'interno delle cellule vegetali, che provoca una rottura delle pareti cellulari (Fig.20). I vantaggi di questa tipologia di estrazione sono la facilità di estrazione dei composti bioattivi, la riduzione della quantità e del tempo di contatto del solvente (Barba et al., 2016).

Alupului, Calinescu & Lavric (2012) hanno descritto il meccanismo di funzionamento della MAE secondo alcuni "*steps*":

a) separazione dei soluti dai siti attivi della matrice del campione con aumento di pressione e temperatura;
b) diffusione del solvente attraverso la matrice del campione;
c) rilascio dei soluti dalla matrice al solvente.

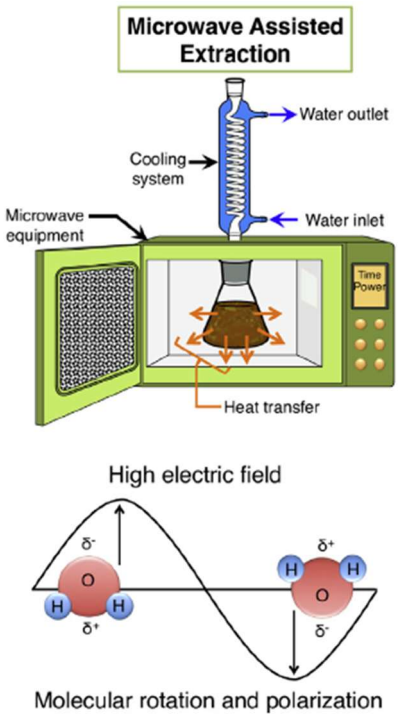


Figura 20. Estrazione mediante microonde assistita con meccanismo molecolare di rotazione (Barba et al., 2016).

Numerosi sono gli studi sulla possibilità di applicare la MAE per l'estrazione di composti bioattivi a partire dai residui della filiera vitivinicola.

Ad esempio, Liazid, Guerrero, Cantos, Palma & Barroso (2011) hanno studiato l'applicazione della MAE sull' estraibilità degli antociani dalla buccia. Comparando la MAE con una estrazione convenzionale solido-liquido, gli Autori hanno osservato una diminuzione del tempo di estrazione, da 5 ore a 5 minuti con l'applicazione dell'estrazione microonde assistita. Bittar, Perino-Issartier, Dangles & Chemat (2013) hanno invece utilizzato l'estrazione MAE per la produzione di succo d'uva ricco in composti fenolici. Gli Autori hanno infatti osservato che, con tale tecnica, il

succo d'uva conteneva livelli di polifenoli totali e di antociani totali rispettivamente pari a 21.41 ± 0.04 mg GAE/g s.s e 4.49 ± 0.01 g malvidina/g s.s.

1.5.2.6 Estrazione con liquido supercritico (SC-CO_2)

I fluidi supercritici possiedono proprietà chimico-fisiche intermedie fra un liquido ed un gas; in particolar modo proprietà solventi simili a quelle di un liquido e di trasporto tali viscosità e tensione superficiale simili a quelle di un gas. Cambiando la temperatura o la pressione, del fluido, le proprietà caratteristiche possono essere avvicinate a quelle di un liquido o a quelle di un gas. A temperatura e pressione critica, liquido e vapore formano una fase omogenea in cui hanno la stessa densità e sono indistinguibili. Il fluido più frequentemente utilizzato per i processi di estrazione supercritica è la CO_2. Ha una bassa temperatura critica (31.1°C), nessuna tossicità e sicuro da usare (Barba et al., 2016). Oltre a queste caratteristiche, i processi di estrazione con CO_2 supercritica si verificano in assenza di luce e aria, riducendo al minimo le reazioni di degradazione. Tuttavia, a causa del suo carattere non polare, per estrarre molecole polari come i polifenoli, la CO_2 viene utilizzata con solventi organici, come etanolo, metanolo e acetone. Il solvente maggiormente utilizzato, in quanto permesso nell'industria alimentare, è l'etanolo (Barba et al., 2016).

L'estrazione SFE è di fondamentale importanza anche per la purezza degli estratti che fornisce. Molti degli studi legati ai sottoprodotti della vinificazione sulla SFE riguardano il recupero del resveratrolo. Pascual-Marti, Salvador, Chafer & Berna (2001) hanno studiato ed ottimizzato le condizioni di estrazione mediante fluido supercritico (pressione da 80 a 100 bar; temperatura 40°C; concentrazione etanolo dal 5% al 15% e tempo di estrazione 5-25 minuti) per il recupero del resveratrolo dalle bucce di *V. vinifera*. Essi osservarono che le condizioni di estrazione ottimali erano raggiunte a 110 bar, con una temperatura di 40°C, con una percentuale di etanolo pari al 7.5% e con un tempo di estrazione di 15 minuti. Sotto tali condizioni

gli Autori riuscirono ad ottenere un recupero in resveratrolo pari al 100%. Casas et al. (2010) hanno studiato l'effetto dell'estrazione SC-CO_2 sul recupero di resveratrolo a partire da vinaccia, vinaccioli, bucce e raspi ottenuti dalla cultivar Palomino. Alle condizioni di estrazione di 400 bar, a 35°C e con il 5% di etanolo (v/v), gli Autori osservarono il miglior recupero in resveratrolo (49.1 mg/100 g s.s) a partire dalle bucce.

1.5.2.7 Estrazione mediante processo al alta pressione (HP)

Il processo ad alta pressione è un' altra tecnologia che ha mostrato buone prospettive di estrazione di composti antiossidanti da matrici vegetali (Barba, Terefe, Buckow, Knorr & Orlien, 2015).Un esempio di processo ad alta pressione è mostrato nella Figura 21.

Tale processo è stato ampiamente applicato per il recupero di composti fenolici a partire da vinaccia o bucce (Corrales, Butz & Tauscher, 2008; Corrales, Garcia, Butz & Tauscher, 2009; Corrales et al., 2008). Nei diversi studi, gli Autori hanno ottenuto un aumento significativo del contenuto totale in antociani dopo l'elaborazione HP rispetto ai metodi di estrazione convenzionali. Anche Casazza, Aliakbarian Sannita & Perego, (2012) hanno studiato il potenziale uso di HP, associato alle elevate temperature, per recuperare i composti fenolici dalle bucce. In questo studio, il tempo di estrazione variava da 15 a 330 minuti e la temperatura variava da 30 a 150°C. Per ogni serie di parametri, sono stati determinati il potere antiossidante, il contenuto totale di polifenoli e i flavonoidi totali. Gli Autori hanno osservato che l'utilizzo della tecnologia HP ha prodotto estratti ricchi in polifenoli e con un elevato potere antiossidante. Il maggiore recupero dei composti fenolici è stato ottenuto applicano una temperatura pari a 150°C.

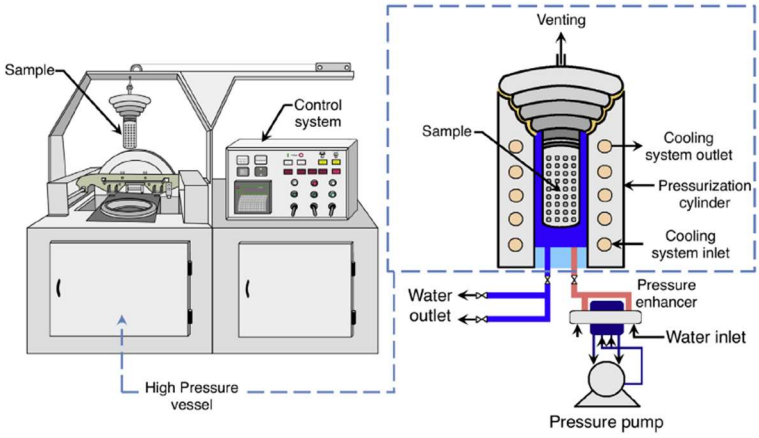


Figura 21. Rappresentazione schematica del processo di estrazione ad alta pressione per il recupero di composti bioattivi nelle matrici vegetali (Barba et al., 2016).

1.5.2.8 Estrazione con solvente accelerata (ASE)

L'estrazione con solvente accelerata è un sistema di estrazione non convenzionale che si basa sull'estrazione di molecole biologicamente attive utilizzando acqua come solvente. La principale proprietà di tale tecnica è infatti l'utilizzo di valori di temperatura e pressione oltre a 100°C e 0.1 MPa, rispettivamente (punto di ebollizione dell'acqua) e al di sotto del punto critico (374°C, 22.1 Mpa) (Barba et al., 2016). In tali condizioni, la pressione assicura che il solvente venga mantenuto allo stato liquido alla temperatura applicata e facilita inoltre l'estrazione dei composti desiderati. In tal modo si possono svolgere estrazioni più veloci impiegando contenute quantità di solvente (Barba et al., 2016). In uno studio recente effettuato da Rajha et al. (2014) è stata studiata la capacità di estrazione con solvente accelerata per il recupero di composti fenolici a partire da vinaccia sia fresca che sottoposta ad un processo di essicamento. In entrambi i campioni gli Autori hanno osservato un recupero di polifenoli elevato, 16.2 g GAE/100 g per la vinaccia fresca e 7.28 g/100 g per quella essiccata. Per l'estrazione è stata usata una miscela di etanolo/acqua al 70% a 140°C. Nello studio è stato evidenziato che la vinaccia fresca facilita

l'estrazione dei composti fenolici (2 volte maggiore rispetto al camoione essiccato e 15 volte maggiore rispetto ai metodi tradizionali). Al contrario, gli Autori, studiando l'attività antiradicalica associata al resveratrolo estratto dai campioni di vinaccia, hanno evidenziato che la tesi essiccata mostrava un'azione antiradicalica maggiore rispetto a quella fresca, con un'inibizione del 49.12% contro un 39.8%. In generale, nonostante i composti fenolici si dimostrino facilmente ossidabili alle alte temperature, la ASE si è rivelata essere una tecnica di estrazione utilizzabile a livello industriale per i recupero delle componenti bioattive dei sottoprodotti della filiera vitivinicola.

1.5.2.9 Estrazione assistita mediante solvente idrotropico

I solventi idrotropici sono sali organici altamente solubili in acqua, che possono migliorare la solubilità dei composti acquosi non solubili o poco solubili. Ad esempio, alcuni studi precedenti hanno valutato il potenziale degli agenti idrotropici nel recuperare oli essenziali e diversi composti bioattivi da materiali alimentari vegetali come *Cymbopogon flexuosus* e *Citrus aurantium* L., ottenendo risultati promettenti (Barba et al., 2016).

Per quanto riguarda i sottoprodotti della filiera vitivinicola, in un recente lavoro, Rajha, Chacar, Afif, Vorobiev, Louka & Maroun, (2015) hanno valutato il potenziale della *b*-ciclodestrina (b-CD), un solvente idrotropico, sull'estrazione di polifenoli dai germogli di vite.

A tale scopo, gli Autori hanno ottimizzato le condizioni di estrazioni tali concentrazione di b-CD, tempo e temperatura ed hanno confrontato i risultati ottenuti con quelli riscontrati dopo estrazione convenzionali con l'utilizzo di etanolo come solvente. Gli Autori hanno osservato che nelle condizioni ottimali di estrazione quali: 37.7 mg/ml di b-CD per 48 ore a 66.6°C, il recupero di polifenoli era pari a 5.8 mg di GAE/g di sostanza secca e la capacità antiossidante raggiungeva un valore di 3146

mM trolox equivalente (TE)/ml. Tali valori erano migliori rispetto a quelli osservati con l'estrazione convenzionale.

Concludendo, le tecniche di estrazione non convenzionale offrono numerosi vantaggi tra cui la riduzione dei tempi di lavorazione, l'energia consumata e l'utilizzo di solventi permettendo nello stesso tempo un aumento della resa di estrazione, avendo inoltre un impatto più sostenibile sia a livello ecologico che economico.
Inoltre, alcune tecniche non convenzionali sono in grado di estrarre selettivamente le molecole intracellulari senza danneggiare il tessuto vegetale trattato. Tuttavia, sebbene gli innumerevoli vantaggi rispetto a quelle convenzionali per il recupero di composti ad alto valore aggiunto dai sottoprodotti della filiera vitivinicola su scala di laboratorio e come impianti pilota, i processi di estrazione convenzionale descritte non sono ancora pronte per espandersi nell'industria vinicola principalmente a causa degli elevati costi di installazione e delle apparecchiature (Barba et al., 2016).

2.0 SCOPO

La vite, in particolare la specie *Vitis vinifera*, è una delle colture più diffuse nel mondo (Grimplet et al., 2007). Numerosi lavori scientifici attestano che l'uva sia ricca in composti biologicamente attivi come polifenoli, acidi fenolici, resveratrolo e glutatione, la cui biosintesi inizia prima dell'invaiatura e prosegue nel corso della maturazione (Kedage et al., 2007; Adams, 2006). Grazie alle loro proprietà antiossidanti, tali composti sono potenzialmente interessanti sia come ingredienti funzionali sia come alternativi agli antiossidanti inorganici abitualmente utilizzati negli alimenti e nel vino.

La filiera vitivinicola genera un'elevata quantità di residui di lavorazione che attualmente rappresentano un problema di sostenibilità ambientale ed economica per le aziende del settore. Per questo motivo, la ricerca e l'industria enologica stanno esplorando soluzioni per lo sviluppo di nuovi prodotti ad elevato valore aggiunto derivanti dalla valorizzazione dei residui della filiera. I residui della filiera vitivinicola sono rappresentati dai residui di potatura (sarmenti, raspi e foglie), dai residui organici della vinificazione (vinacce che comprendono vinaccioli, residui di polpa, bucce e feccia derivante da operazioni di pulizia e decantazione di mosti e vini), dalle acque reflue e dai residui inorganici dei diversi trattamenti che il vino subisce nel corso della elaborazione (ad esempio terra di diatomea, bentonite e perlite) (Oliveira et al., 2013).

Un residuo della filiera viticola scarsamente studiato è rappresentato dalle uve immature derivanti dalle operazioni di diradamento. Il diradamento è una pratica di potatura verde che consiste nell'asportazione selettiva di specifici grappoli immaturi con lo scopo di garantire l'equilibrio vegeto-produttivo della pianta. Tali uve immature non possiedono le caratteristiche idonee alla vinificazione e sono

normalmente abbandonate in campo pur contenendo un patrimonio fenolico interessante.

Pochi studi riguardanti le uve immature sono presenti in letteratura. Öncül & Karabiyikli, (2015) hanno studiato uve immature di bassa qualità utilizzate per la produzione tradizionale di salse acidule, come l'agresto, che mostrano elevata attività antiossidante. Altri Autori hanno proposto l'utilizzo di uve immature per ridurre il contenuto in alcol e pH di vini sperimentali Cabernet Sauvignon e Merlot (Kontoudakis et al., 2011). Più recentemente, Tinello & Lante (2017) hanno studiato l'utilizzo di uve immature Barbera e Merlot come additivo per controllare l'imbrunimento enzimatico di alcuni prodotti vegetali. Ed infine Dupas de Matos et al. (2019) hanno sfruttato le caratteristiche antiossidanti e di acidità di uve immature Chardonnay e Sauvignon come agente acidificante nella preparazione di cetrioli sott'olio.

Alla luce di tali premesse, questo progetto di dottorato si pone l'obiettivo generale di valorizzare le uve da diradamento estraendo da esse prodotti ad elevato valore aggiunto potenzialmente sfruttabili nell'industria alimentare.
Al fine di raggiungere lo scopo prefissato, il lavoro sperimentale è stato organizzato secondo le seguenti attività:

a) Produzione industriale di estratti ad attività antiossidante
b) Caratterizzazione chimica e fisica degli estratti ottenuti
c) Utilizzo degli estratti su bevande e diverse matrici alimentari

3.0 MATERIALI E METODI

Il piano sperimentale delle attività svolte è mostrato nella Figura 22. Sono riportati in forma schematica i materiali utilizzati ed i processi di produzione applicati secondo una codifica alfa-numerica. Nei paragrafi successivi essi saranno descritti nel dettaglio.

3.1 UVE IMMATURE (UI)

Nelle annate 2015, 2016 e 2017, le uve immature sono state sottoposte alle operazioni di diradamento dei grappoli ed utilizzate per le attività sperimentali mostrate nella Figura 22. L'epoca del diradamento è stata decisa di volta in volta in base alle esigenze delle aziende coinvolte nella sperimentazione.

Nello specifico, le uve immature Sangiovese sono state raccolte nelle annate 2015 (**UIS15**) e 2017 (**UIS17**) presso l'azienda "Tenuta dello Scompiglio", locata a Capannori (Lucca). Il campionamento è stato effettuato in un vigneto di 9 anni di età, con una superficie di 4 ettari con sistema di allevamento capovolto e sesto di impianto di 1.80 m tra le file e di 0.80 m sulla fila. Nel 2015, le uve immature sono state diradate e raccolte nella prima metà di Agosto.

Nel 2017 le uve sono state campionate a diversi stadi di maturazione. Il primo campionamento è stato effettuato il 26/07/2017 su uve immature in una fase di pre-invaiatura; il secondo campionamento è avvenuto in data 21/08/2017, momento in cui le uve sono state sottoposte al diradamento; il terzo ed ultimo campionamento ha coinciso con il momento della vendemmia in data 22/09/2017. Il campionamento è stato effettuato a filari alterni, procedendo a zig-zag in modo tale da raccogliere i campioni di uva da entrambi i lati del filare. Gli acini sono stati prelevati ad inizio, metà e fine filare, partendo dai grappoli posti nelle zone distali della pianta. La scelta degli acini è stata casuale.

Nella campagna 2016, le uve immature Merlot (**UIM16**) e Viognier (**UIV16**) sono state diradate e raccolte da vigneti siti nell'Azienda "La Torre" situata a Velletri, Roma, nella seconda metà di Agosto, in vigneti allevati a cordone speronato e sesto di impianto 2.40 m x 0.80 m.

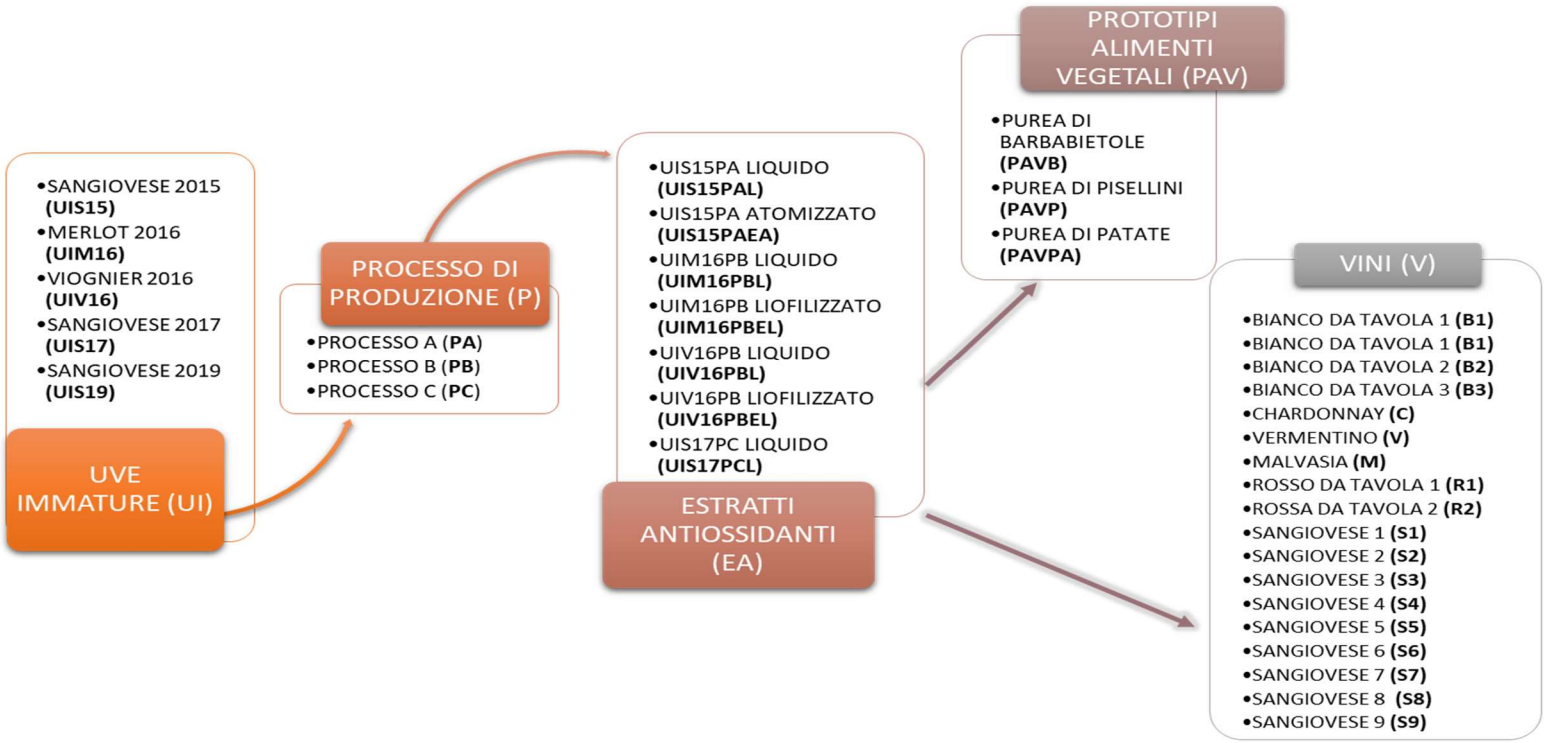


Figura 22. Piano sperimentale delle attività del progetto.

3.2 PROCESSO DI PRODUZIONE (P)

Per la produzione degli estratti a partire dalle uve immature è stato utilizzato un metodo di estrazione basato sull'utilizzo di un estrattore industriale, denominato "extraVelvet 1.0", brevettato dall'Università degli Studi di Firenze (Brevetto n° EP 2957627 - Gori, Menichetti & Fia, 2014), che è stato progettato per la conduzione di macerazioni a freddo e altre operazioni di cantina. Il sistema consiste in un serbatoio di acciaio inox di varia capacità (12.5 – 25 e 50 hl), la cui superficie esterna è ricoperta per il 75% da un rivestimento termostatato. All'interno è presente un albero motore sul quale si innestano 4-6 eliche la cui rotazione consente sia la disgregazione che il rimescolamento delle parti solide dell'uva e realizza l'omogeneizzazione del ghiaccio secco (CO_2 allo stato solido) aggiunto durante la fase di macerazione a freddo. Il sistema dispone anche di un controllo automatizzato per la programmazione della lavorazione (tempo, temperatura e cicli di rotazione) (Fig. 23)

Figura 23. Esterno ed interno del sistema di estrazione extraVelvet 1.0.

Nel corso degli anni di sperimentazione, il sistema è stato soggetto ad alcuni aggiornamenti di natura tecnica pur mantenendo inalterato il generale diagramma di flusso del processo di produzione degli estratti a partire da uve immature (Fig.24).

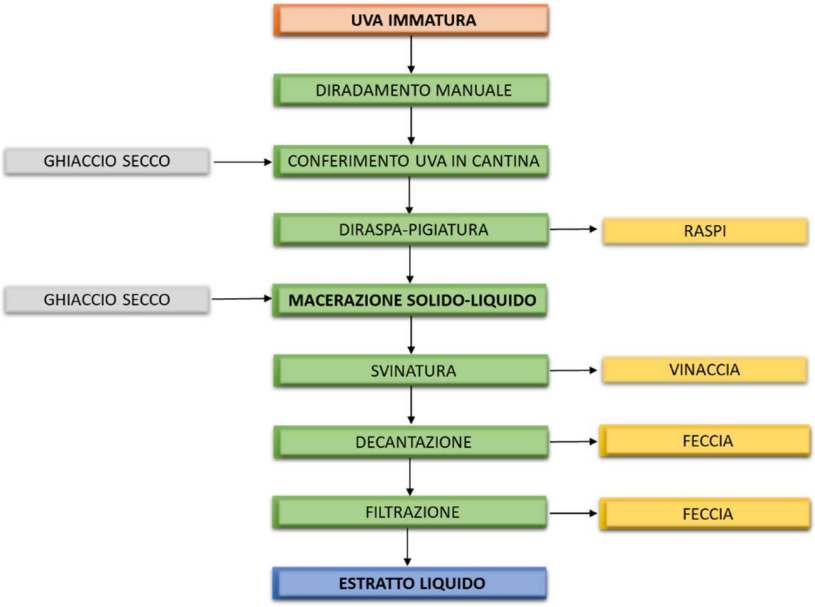


Figura 24. Diagramma di flusso delle operazioni condotte nel processo di produzione industriale (P). In arancione la materia prima utilizzata, in verde il processo di produzione applicato, in blu il prodotto finale del processo, in grigio il coadiuvante aggiunto ed in giallo i residui del processo.

Le uve immature sono state diradate e raccolte manualmente. Dopo la raccolta sono state trasportate in cantina, dove sono state sottoposte alle operazioni di diraspa-pigiatura, ottenendo i raspi come primo residuo del processo, e trasferite al sistema di estrazione. Durante la fase di estrazione è stata addizionata la CO_2 allo stato solido (ghiaccio secco), al fine di evitare fenomeni ossidativi e, nel contempo, incrementare l'estrazione della componente fenolica dalle uve. Infatti, quando l'epidermide della bacca entra in contatto con il ghiaccio secco, si verifica un parziale congelamento dell'H_2O intracellulare con un conseguente incremento del volume, dovuto al passaggio di stato dell'acqua, che provoca una lacerazione delle membrane cellulari, facilitando la diffusione di composti fenolici e di aromi nella parte liquida, presenti nella buccia e nei vinaccioli; tale fenomeno viene definito *crash cellulare* (Zinnai,

Venturi, Calamita & Andrich, 2008). Inoltre, grazie al quantitativo ingente di gas liberato, si preservano dall'ossidazione i composti fenolici, in particolare gli antociani.
Ultimata la fase di estrazione, la vinaccia, costituita da bucce e vinaccioli, è stata separata dalla parte liquida attraverso l'operazione di svinatura, a seguito della quale, il liquido è stato posto ad una fase di decantazione statica, a freddo (6°C per 48 h) al fine di eliminare i residui fecciosi che si depositano così naturalmente sul fondo. Successivamente, il liquido limpido, è stato filtrato mediante filtro di acciaio con una dimensione dei pori pari a 1 mm Ø. L'estratto liquido così ottenuto è stata trasferito in bag-in-box e stoccato a -20°C in attesa delle successive trasformazioni o per essere sottoposto alle analisi chimiche (Fig.24).

Nel corso dei tre anni, l'estrattore industriale è stato sottoposto a delle modifiche sia nella conduzione dell'estrazione che dal punto di vista impiantistico, nelle fasi riguardanti il trattamento dell'estratto liquido come la purificazione e la conservazione dell'estratto. Queste trasformazioni si traducono nei processi di produzione A, B e C come riportato nei paragrafi successivi.

3.2.1 Processo di produzione industriale A

Il processo di produzione industriale A è caratterizzato dall'uso delle conduzioni operative riportate nella Tabella 10.

Tabella 10. Operazioni e condizioni del processo di produzione industriale PA, PB, PC.

Fasi e condizioni operative	PA	PB	PC
CO_2 aggiunta	65 Kg / 6.5 q UI	125 Kg / 7.4 q UI	360 kg / 10.8 q UI
Macerazione (h)	72	72	96
T (°C) di macerazione	6	6	6
Rimescolamento e omogeneizzazione della massa	Ogni 6 h per 30 min	Ogni 6 h per 30 min	Ogni 6 h per 30 min
Svinatura	Si	Si	Si + Pressatura (0.1-1.8 bar)
Decantazione	Statica, 6°C, 48 h	Statica, 6°C, 48 h	Statica, 6°C, 48 h
Filtrazione	Ø 0.1 mm Filtro in acciaio	Ø 0.1 mm Filtro in acciaio	Ø 0.1 mm Filtro in acciaio
De-zuccheraggio per filtrazione su membrana	No	Si	No
Essiccamento	Atomizzazione	Liofilizzazione	No

Il processo **PA** è stato applicato alle **UIS15** presso l'Azienda "Tenuta dello Scompiglio". In aggiunta a quanto riportato nel diagramma di flusso in Figura 24, l'estratto liquido è stato trasformato in polvere attraverso un processo di essiccamento effettuato mediante atomizzazione presso lo stabilimento "Giotti Enrico Spa" (Scandicci, Fi).

Nel dettaglio, dopo lo scongelamento, l'estratto liquido è stato addizionato con gomma arabica (16% p/v) (Nexira Food, Rouen, Francia), supporto necessario per ottenere una polvere a causa del contenuto di zucchero (153 g/L) dell'estratto liquido. Il processo di atomizzazione è stato eseguito utilizzando una turbina industriale (Gea Niro, Milano, Italia) impostata ad una velocità di rotazione di 18.000 giri al minuto con una portata della pompa peristaltica, che controllava automaticamente la temperatura dell'aria di essiccazione, pari a 180°C (ingresso) e 80°C (uscita). L'estratto secco ottenuto è stato conservato sottovuoto in sacchetti di

polietilene e posto in un essiccatore, a temperatura ambiente, lontano da fonti di luce e calore.

3.2.2 Processo di produzione industriale B

Il processo di produzione industriale **PB** è stato applicato su **UIM16** e **UIV16** presso l'Azienda "La Torre". Le fasi e le condizioni operative del processo sono mostrate nella Tabella 10.

In aggiunta alle fasi operative riportate nel diagramma di flusso (Fig.24), nel **PB**, gli estratti liquidi Merlot e Viognier sono stati sottoposti ad un processo di eliminazione dello zuccheraggio mediante ultrafiltrazione su membrana (2500 Dalton) ed un successivo essiccamento mediante liofilizzazione, eseguita con l'aggiunta del 2% (p/v) di gomma arabica (Nexira Food, Rouden Cedex, France) come supporto. Il processo di liofilizzazione è stato effettuato presso il Laboratorio Terapeutico M.R.S.R.L (Firenze).

Gli estratti secchi ottenuti sono stati posti sottovuoto in sacchetti di polietilene, e conservati in un essiccatore contenente silice, a temperatura ambiente e al riparo da fonti luminose e di calore.

3.2.3 Processo di produzione industriale C

Il processo di produzione industriale **PC** è stato applicato sulle **UIS17** presso l'Azienda "Tenuta dello Scompiglio".

Il **PC** prevede un tempo di macerazione solido-liquido maggiore rispetto a quello applicato nel **PA** e nel **PB**; si passa infatti dalle 72 ore alle 96 ore di macerazione.

In aggiunta a quanto riportato nel diagramma di flusso nella Figura 24, la fase di svinatura è stata seguita da cicli di pressatura crescenti (0.1 - 0.3 - 0.9 - 1.5 - 1.8 bar). Ogni ciclo di pressatura è stato ripetuto 5 volte con intervallo di 1 minuto ogni 3 rotazioni. Il succo ottenuto è stato omogenizzato e sottoposto alla fasi successive di decantazione e filtrazione (Tab.10).

L'estratto liquido ottenuto non è stato sottoposto a processi trasformazione, ma congelato e stoccato presso lo stabilimento "Giotti Enrico Spa" (Scandicci, Fi).

3.3 ESTRATTI ANTIOSSANTI (EA)

Attraverso i processi di produzione industriale (**PA**, **PB**, **PC**) sono state ottenute 7 tipologie di EA provenienti da uva immatura (Fig.23). Di questi, 4 **EA** sono sotto forma liquida (**UIS15PAL, UI16MPBL, UI16VPBL, UIS17PCL**) e 3 sono sotto forma di polvere o di estratto secco (**UIS15PAEA**, **UIM16PBEL**, **UIV16PBEL**), ottenuti con l'utilizzo di gomma arabica come supporto, come precedentemente descritto.

La gomma arabica è infatti un prodotto naturale perfettamente neutro al gusto, utilizzato nelle industrie alimentari, incluso il campo enologico, come stabilizzante. Tale additivo è identificato come colloide macromolecolare costituito da un polisaccaride di peso molecolare dell'ordine di 10^6 Da che per idrolisi acida libera D-galattosio, L-arabinosio, L-ramnosio ed acido D-glucuronico (Ribéreau-Gayon, et al., 2007).

3.4 USO DEGLI ESTRATTI

Gli estratti **UIS15PAEA**, **UIM16PBEL**, **UIV16PBEL** sono stati addizionati su matrici alimentari di natura diversa. Nello specifico, l'estratto secco proveniente da **UIM16** (**UIM16PBEL**) è stato utilizzato come fortificante naturale su tre prototipi alimentari di natura vegetale; tale parte delle attività si inserisce nel Progetto di Ricerca di Rilevante Interesse Nazionale (PRIN) – Bando 2015 Prot. 20158YJW3W- " Individual differences in the acceptability of healthy foods: focus on phenol and fat content " con coordinatore il Prof. Erminio Monteleone, volto ad indagare le potenziali barriere psicologiche e biologiche all'accettabilità di alimenti fortificati di fenoli con caratteristiche sensoriali "critiche".

Gli estratti **UIS15PAEA**, **UIM16PBEL**, **UIV16PBEL** sono stati utilizzati allo scopo di preservare la stabilità e le caratteristiche organolettiche di vini di tipologia diversa.

3.4.1 Prototipi alimentari vegetali (PAV)

I **PAV** selezionati ed utilizzati per il progetto sono stati tre: una purea di barbabietole, una purea di pisellini ed una purea di patate. Tali prototipi sono stati preparati secondo le seguenti ricette:

3.4.1.1 Purea di barbabietole (PAVB)

Versare nel recipiente del frullatore un'intera confezione di barbabietole cotte al vapore pelate GHISETTI (500 gr) e frullare fino ad ottenere una passata omogenea (a velocità massima per 1 minuto interrompendo a 30 sec e mescolare - robot utilizzato: Kenwood type FDM 78 - 1000 W – 220/240 V – 50/60 Hz, contenitore basso e largo, velocità massima/8).

3.4.1.2 Purea di pisellini (PAVP)

Versare una confezione da 150 g di pisellini VALFRUTTA al vapore (90 g peso sgocciolato) in un colapasta e sciacquare per 30 sec sotto acqua corrente fredda, scolare quindi per 30 sec favorendo l'eliminazione dell'acqua muovendo delicatamente il colapasta. Versare i pisellini nel bicchiere del frullatore e frullare alla massima velocità per 2 min interrompendo ogni 30 sec (robot utilizzato: Kenwood type FDM 78 - 1000 W – 220/240 V – 50/60 Hz, contenitore basso e largo, velocità massima/8).

3.4.1.3 Purea di patate (PAVPA)

Versare una busta da 75 g di preparato per puree PFANNI in 340 g di acqua portata a 80°C e mescolare fino ad ottenere una consistenza omogenea. Fare freddare 30 min.

3.1.4.4 Funzionalizzazione dei PAV

I **PAV** sono stati addizionati con l'estratto **UIM16PBEL**. A tale scopo, le caratteristiche dei fenoli di uva immatura Merlot sono stati preliminarmente analizzati in soluzione acquosa. Sono stati preparati 9 campioni a diversa concentrazione fenolica diluendo una soluzione madre (SM) con un titolo fenolico pari a 6.81 ± 0.04 g/L di fenoli.

La soluzione madre è stata preparata sciogliendo 334 g di **UIM16PBEL** in un volume totale di 1 L di acqua distillata sotto agitazione. Allo scopo di allontanare la gomma arabica in sospensione, la SM è stata centrifugata a 1646 *g* per 10 minuti a temperatura ambiente (20°C). Il surnatante limpido così ottenuto è stato utilizzato per preparare le soluzioni alle seguenti concentrazione fenoliche : 0.14, 0.21, 0.30, 0.44, 0.59, 1.11, 1.27 e 1.93 g/L. Le soluzioni diluite sono state testate per attività antiossidante, contenuto in PFT e sottoposte ad una valutazione sensoriale. A seguito di tali valutazioni, sono state selezionate e addizionate a ciascun prototipo 5 soluzioni a diversa concentrazione fenolica (0.00 - 0.21 - 0.44 - 1.11 - 1.93 g/L). Nella Figura 25 sono schematizzate le attività svolte per la funzionalizzazione delle puree vegetali con gli estratti da uve immature Merlot 2016.

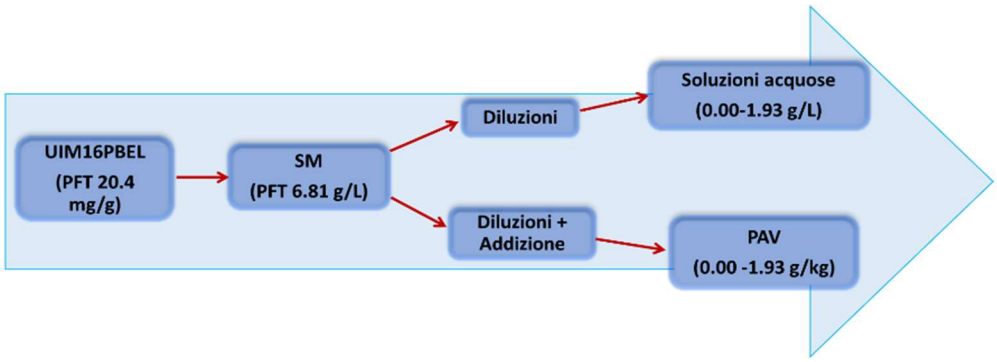


Figura 25. Piano sperimentale delle attività svolte per la funzionalizzazione dei prototipi alimentari. Fra parentesi il contenuto in polifenoli totali (PFT) dell'estratto, della soluzione madre (SM) e dei PAV fortificati.

3.4.2 Vini (V)

Le prove sono state condotte su 6 vini bianchi e su 11 vini rossi di tipologia e annata diversa. In particolare, sono stati utilizzati i seguenti prodotti: 3 vini bianchi biologici in corso di elaborazione (2018) delle varietà Chardonnay, Malvasia e Vermentino; 3 vini bianchi da tavola reperibili dalla GDO; 2 vini rossi Sangiovese tradizionali (2016); 3 vini rossi Sangiovese biologici, di cui 2 vini finiti (2016) e 1 in corso di elaborazione (2018); 3 vini rossi Sangiovese biodinamici (2016); 3 vini rossi da tavola reperibili dalla GDO (Fig.22).

3.4.2.1 Additivi Enologici (AE)

La capacità antiossidante degli estratti **UIS15PAEA**, **UIM16PBEL**, **UIV16PBEL** è stata confrontata con quella di alcuni additivi enologici tradizionali, comunemente utilizzati per le loro caratteristiche antiossidanti. Sono stati selezionati un tannino commerciale (**T**) (american untoasted, Enartis), acido ascorbico (**AA**) (LongLife, nutritional supplements, Phoenix s.r.l, Milano, Italia) e anidride solforosa (**SO2**)

sotto forma di metabisolfito di potassio. Nella Figura 26 sono rappresentate le attività svolte sui vini.

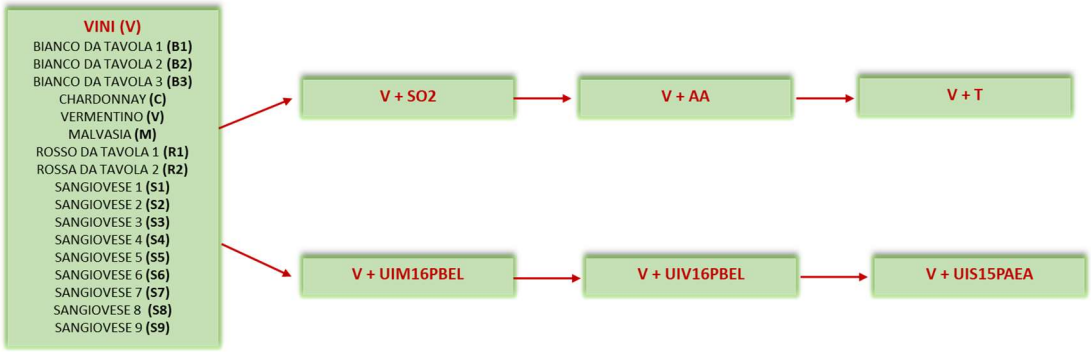


Figura 26. Piano sperimentale delle attività svolte sui campioni di vino.

3.4.2.2 Prove su vino rosso S1

Sul campione di vino rosso S1 sono state effettuate delle prove di maturazione su un volume di 100 litri in fusti di acciaio. Il campione S1, vinificato senza l'aggiunta di solfiti, conteneva 20 g/hl di chitocel (AEB group) e rappresentava la tesi tal quale del piano sperimentale. Tale tesi è stata confrontata con altre tre tesi in cui il campione S1 (+20 g/hl di chitocel) veniva addizionato con 20 g/hl di **UIM16PBEL**, 50 g/hl di **UIM16PBEL** e 50 mg/L di SO_2 (Tab.11).

Le prove sono ancora in corso di sperimentazione e saranno condotte per tempo complessivo di 6 mesi. Sulle 4 tesi, ad inizio e metà (3 mesi) sperimentazione sono state effettuate determinazioni analitiche tali analisi base, attività antiossidante, polifenoli totali, colore, test di ossidabilità e valutazioni sensoriali.

Tabella 11. Campioni di vino S1 sottoposti alle prove di maturazione.

Campione S1	Additivi aggiunti
Tq	20 g/hl chitocel
A	20 g/hl chitolcel + 20 g/hl UIM16PBEL
B	20 g/hl chitolcel + 50 g/hl UIM16PBEL
C	20 g/hl chitolcel + 50 mg/l SO_2

4.0 DETERMINAZIONI ANALITICHE

4.1 ESTRAZIONE DEI FENOLI

Sulle uve e sui prototipi alimentari vegetali è stata effettuata un'estrazione della componente fenolica utilizzando due diverse metodiche:

A) l'estrazione dei fenoli delle uve è stata condotta secondo il metodo descritto da Guerrero et al. (2009), apportando alcune modifiche. Le uve (200 bacche) sono state omogeneizzate per 30s con un omogeneizzatore Ultra-turrax (VWR International, Milano, Italia). Per l'estrazione, 10 g di campione sono stati addizionati con 10 ml di metanolo-cloridrico (1:1 v/v) e posti in agitazione per 60 min. I campioni sono stati centrifugati per 5 min, 2800 *g*, a temperatura ambiente. Il surnatante limpido è stato utilizzato per le analisi;

B) l'estrazione dei fenoli dai PAV è stata condotta secondo il metodo descritto da Turkmen, Sari, & Velioglu, (2005). Una quantità pari ad 1 g di purea è stata estratta 2 volte con 4,5 mL di soluzione acquosa di metanolo all'80%, in agitazione costante a T ambiente, per 2 h. La soluzione è stata centrifugata a 13440 *g*, per 15 minuti. Gli estratti sono stati filtrati con filtro di carta Whatman N1 e sottoposti ad analisi.

4.2 CARATTERIZZAZIONE CHIMICA

4.2.1 Analisi di base

Le analisi di base sui campioni sono state eseguite seguendo i protocolli definiti dall'Organizzazione Internazionale della Vigna e dei Vini (O.I.V). Nello specifico sono stati determinati i parametri di pH, acidità totale, zuccheri, solforosa libera, solforosa totale, grado alcolico e acidità volatile.

4.2.2 Maturità fenolica

Altri 200 acini sono stati omogeneizzati usando un Ultra-Turrax ad alta velocità a 11500 rpm, per 30 sec. Sono state estratte due aliquote (50 g) di uva omogeneizzata, a pH diverso. Alla prima aliquota, sono stati aggiunti 50 ml di soluzione di HCl 0.1 N a pH 1.0, mentre alla secondo aliquota sono stati aggiunti 50 ml di soluzione di acido tartarico (5 g di acido tartarico in 20 ml di NaOH 1 N e portato a volume totale di 1 L con acqua distillata) a pH 3.2. I campioni sono stati agitati a temperatura ambiente per 4 ore. Successivamente sono stati centrifugati (13440 *g*) a 4°C, per 10 minuti. I parametri di maturità fenolica sono stati determinati mediante analisi spettrofotometrica. La ricchezza fenolica (A280) è stata misurata alla lunghezza d'onda di 280 nm a pH 3.2 ed espressa in unità di assorbanza (AU) × fattore di diluizione. Gli antociani estraibili a pH 1.0 (ApH1.0) sono stati misurati a 520 nm e pH 1,0 ed espressi in mg di equivalenti di malvidina-3-glucoside (MALeq)/L di succo. Gli antociani estraibili a pH 3.2 (ApH3.2) sono stati misurati a 520 nm e pH 3,2 ed espressi in mg di equivalenti di malvidina-3-glucoside (MALeq)/L di succo. L'indice di maturità cellulare (EA%) è stato calcolato come EA = (ApH1 - ApH3.2) / ApH1 × 100. L'indice di maturità del seme (MP%) è stato calcolato come MP% = [A280 nm - (ApH3.2 / 1000) × 40] / A280 nm. Il contributo dei tannini della buccia alla ricchezza fenolica (dTbuccia) è stato calcolato come ApH3.2 × 40/1000 e il contributo dei tannini dei vinaccioli alla ricchezza fenolica (dTvinaccioli) è stato calcolato come A280 nm - dTskin.

4.2.3 Intensità e Tonalità Colorante

La determinazione del colore è stata effettuata leggendo l'assorbanza (A) a 420, 520 e 620 nm contro bianco costituito da sola acqua, con cuvette in quarzo (percorso ottico di 1 mm), utilizzando uno spettrofotometro Perkin Elmer Lambda 10 (Waltham, MA, USA), secondo il metodo descritto da Glories (1984).

L'intensità (IC) e la tonalità TC) colorante sono state calcolate mediante le seguenti formule:

$$IC = A\ 420_{nm} + A\ 520_{nm} + A\ 620_{nm}$$

$$TC = \frac{A\ 420nm}{A\ 520nm}$$

4.2.4 Contenuto di antociani totali

Il contenuto in antociani totali è stato analizzato secondo il metodo descritto da Di Stefano, Cravero & Gentilini (1989), mediante lettura spettrofotometrica a 540 nm. I campioni sono stati diluiti con etanolo cloridrico 0.12 M (70:29:1 v/v/v). L'antociano malvidina-3-O-glucoside è stata utilizzata come standard di riferimento ed il contenuto di antociani è stato espresso come mg di malvidina-3-O-glucoside/g di polvere o L di estratto applicando il seguente calcolo:

$$mg/L\ di\ malvidina = A\ 540_{nm} \times 16.17 \times d$$

dove 16.17 è il coefficiente di estinzione molare della malvidina monoglucoside, il valore deriva da $\frac{100*PM}{\varepsilon}$ PM = 493.

d è la diluizione del campione.

4.2.5 Contenuto dei polifenoli totali

Il contenuto in polifenoli totali è stato determinato secondo il saggio Folin-Ciocalteau (Singleton & Rossi, 1965). Il principio del metodo si basa su una reazione red-ox in ambiente alcalino durante la quale i polifenoli riducono la miscela di acido fototungstico e di acido fosfomolibdico (costituenti del reattivo di Folin-Ciocalteau) in una miscela di ossidi di tungsteno e di molibdeno di colore blu. Un aliquota di 1 ml di ogni campione, precedentemente passato su cartuccia C18 Sep-Pak per eliminare gli interferenti, è stato addizionato ad 1 ml di reattivo di Folin-Ciocalteau. Dopo un tempo di attesa pari a 3-5 minuti, sono stati aggiunti 4 ml di una soluzione di Na_2CO_3 al 10% (preparata sul momento). Dopo aver portato a volume (20-25 ml), i campioni sono stati lasciati al buio e a temperatura ambiente per 90 minuti. Dopo la reazione, l'assorbanza a 700 nm è stata letta mediante uno spettrofotometro Perkin Elmer Lambda 10 (Waltham, MA, USA).
La curva di calibrazione è stata ottenuta con soluzioni standard di (+)-catechina a concentrazione da 5 a 500 mg/L. Il contenuto in PT è stato espresso come mg di (+)-catechina equivalenti/g di polvere o L di estratto.

4.2.6 Determinazione del profilo fenolico e del glutatione mediante LC-HRMS

Il profilo fenolico e il glutatione sono stati determinati per cromatografia liquida ad alta risoluzione accoppiata alla spettrofotometria di massa (LC-HRMS) in accordo con quando descritto da Fia, Gori, Bucalossi, Borhini & Zanoni (2018).
I campioni, prima di essere analizzati, sono stati filtrati a 0.45 µm. E' stato utilizzato un cromatografo liquido Accela 1250 (Thermo Fisher Scientific) dotato di una pompa quaternaria e di un autocampionatore termostatato.. È stata utilizzata una colonna Kinetex F5 (2.1 × 100 mm 1.7 µm; Phenomenex (Torrance, California, USA)). La temperatura dell'autocampionatore è stata impostata a 10°C e la colonna a 40°C. L'eluizione a gradiente è stata eseguita con una soluzione acqua/acido

formico 0.05%/ammonio 5 mM (solvente A) ed una soluzione di metanolo/acido formico 0.05%/ammonio 5 mM (solvente B) ad una portata costante di 400 µL/min; il volume di iniezione era di 3 µL. È stato utilizzato un gradiente lineare crescente di solvente B. Uno spettrometro di massa LTQ OrbitrapExactive (Thermo Fisher Scientific) dotato di una sorgente di ionizzazione a elettrospray (ESI) in modalità negativa è stato utilizzato per acquisire spettri di massa in un esperimento MS2 indipendente dai dati MS. I parametri di funzionamento erano i seguenti: voltaggio della sorgente, 4 kV; sheath gas, 35 (arbitrary units); auxiliary gas, 10 (arbitrary units); sweep gas, 0 (arbitrary units); temperatura del capillare, 300°C, livello di S-lens radio frequency (RF), 60 e automatic gain control (AGC) target, 1 × 106 per la modalità MS e 2 × 105 per la modalità MS2. I campioni sono stati inizialmente analizzati in modalità MS completa con la risoluzione impostata su 70000, mentre le analisi successive sono state eseguite in modalità dd-MS2 con la risoluzione impostata su 17500. L'intervallo di massa era compreso tra 150 e 1000 m/z. L'analisi quantitativa è stata eseguita utilizzando il software TraceFinder ™ 4.1 (Thermo Fisher Scientific) con un metodo standard esterno, utilizzando una regressione lineare da 0.05 a 1 g/L di cinque soluzioni standard dei composti in esame. Per gli acidi cutarico e fertarico, a causa della mancanza di materiali di riferimento, sono stati utilizzati come standard acidi liberi corrispondenti (acidi cumarico e ferulico). I campioni al di fuori dell'intervallo di calibrazione sono stati diluiti in una soluzione di acqua/etanolo al 12%. Per tutti i campioni, il recupero e gli effetti della matrice sono stati controllati con aggiunte standard e diluizioni consecutive. L'analisi è stata effettuata in triplo. Tutte le prove cromatografiche sono state raccolte nella stessa sessione di lavoro e la risultante deviazione standard relativa (RSD) era inferiore al 10%.

4.2.7 Determinazione del profilo delle vitamine idrosolubili mediante LC-HRMS

Le vitamine idrosolubili sono state determinate per cromatografia liquida ad alta risoluzione accoppiata alla spettrofotometria di massa (LC-HRMS) (Owen, Lee, & Grissom, 2011). I campioni sono stati filtrati 0.45 µm e successivamente analizzati. Per le analisi è stato utilizzato un cromatografo liquido Accela (Accela 1250, Thermo Scientific) dotato di una pompa quaternaria e di un autocampionatore termostatato. È stata utilizzata una colonna Acquity BEH C18 (2.1 x 100 mm 1.7 µm; Waters). La temperatura dell'autocampionatore è stata impostata a 10°C e la colonna a 30°C. L'eluizione a gradiente è stata eseguita con una soluzione acqua/acido formico allo 0.05% (solvente A) e con una soluzione metanolo/acido formico allo 0.05%/formiato di ammonio 5 mM (solvente B) a una portata costante di 400 µL/min; il volume di iniezione era di 10 µL. È stato utilizzato un gradiente lineare crescente di solvente B. La separazione è stata effettuata in 12 minuti nelle seguenti condizioni: 0 min, 2% B; 7 min, 20% B; 9 min, 20% B; e da 10 minuti a 12 minuti, 2% B (modificato da Owen *et al*., 2011). Uno spettrometro di massa LTQ Orbitrap Exactive (Thermo Scientific) dotato di una sorgente ESI in modalità positiva è stato utilizzato per acquisire spettri di massa in un esperimento MS2 completamente dipendente dai dati MS. I parametri operativi erano i seguenti: voltaggio della sorgente, 3.5 kV; sheat gas, 40 (arbitrary units); auxiliary gas, 20 (arbitrary units); sweep gas, 0 (unità arbitrarie); temperatura capillare, 300°C, livello di S-lens radio frequency (RF), 70 e automatic gain control (AGC)target , 1 x 106 per la modalità MS e 1 x 105 per la modalità MS2. I campioni sono stati prima analizzati in modalità MS completa con la risoluzione impostata su 70000, mentre le analisi successive sono state eseguite in modalità dd-MS2 con la risoluzione impostata su 17500. È stata utilizzata una larghezza di isolamento di 2 amu e i precursori sono stati frammentati dall'energia di collisione normalizzata di 30. Il tempo di iniezione massimo è stato impostato su 200 ms con un microscan sia per la modalità MS che per la modalità MSn. La gamma di massa era compresa tra 150 e 1000 m/z. L'analisi quantitativa è stata eseguita da

Thermo Scientific ™ TraceFinder ™ 4.1. software con metodo standard esterno, che utilizza una regressione lineare di cinque soluzioni standard di una miscela di tutte le vitamine B e J da 0.05 a 1 g/L; mentre la curva di calibrazione della vitamina C variava da 1 a 5 g/L.

4.2.8 Attività antiossidante

Il potere antiossidante è stato determinato mediante il test DPPH (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995). Il radicale 2,2-difenil-1-picrylhydracil (DPPH) è stato uno dei primi radicali sintetici utilizzati nello studio dell'attività antiossidante dei composti fenolici. Questo metodo è ampiamente utilizzato per la valutazione dell'attività antiossidante negli alimenti e negli estratti vegetali e si basa sulla riduzione del radicale stabile $DPPH^{\bullet}$, di colore violaceo che vira perdendo il suo colore mentre reagisce con i composti antiossidanti del campione, producendo una diminuzione dell'assorbanza a 515 nm (riduzione dell'antiossidante).
Nello specifico, una soluzione madre di $DPPH^{\bullet}$ (6×10^{-5} M) è stata preparata in metanolo. Per la reazione, 0.1 mL di campione sono stati addizionati a 3.9 mL della soluzione madre di $DPPH^{\bullet}$; per il bianco, 0.1 mL di campione sono stati addizionati a 3.9 mL di metanolo. Tutti i campioni sono stati incubati al buio, a 30°C per 30 minuti. Dopo incubazione, il decremento dell'assorbanza a 515 nm è stato determinato per via spettrofotometrica. I risultati sono stati espressi come µmol Trolox equivalenti (TEAC)/g di polvere o L di estratto. Per la retta di taratura, soluzioni di Trolox da 10 a 600 µmol/L sono state preparate giornalmente in etanolo puro.

4.2.9 Test di ossidabilità POM-Test

La stabilità dei vini bianchi nei confronti dell'ossidazione è stata valutata tramite POM-Test (Muller-Spath, 1992).

Il metodo prevede l'aggiunta di 0.2 mL di H_2O_2 al 3% (v/v) a 50 mL di vino e incubazione del campione a 60°C per 60 minuti. Il livello di ossidazione del vino bianco è stato determinato misurando l'incremento di assorbanza a 420 nm e calcolato mediante la seguente formula:

Vini Bianchi: ox % = [((A420nm ox-A420 tq))/(A420 nm tq)]* 100

4.2.10 Test di ossidabilità IOA-Test

La stabilità dei vini rossi nei confronti dell'ossidazione è stata valutata tramite IOA-Test (Comuzzo et al., 2015). Il metodo prevede l'aggiunta di 0.2 mL di H2O2 al 3% (v/v) a 50 mL di vino e incubazione del campione a 60°C per 60 minuti.

Il livello di ossidazione del vino rosso è stato determinato misurando la diminuzione di assorbanza a 520 nm e calcolato mediante la seguente formula:

Vini Rossi: ox % = [((A520nm tq-A520 ox))/(A520 nm tq)]* 100

4.3 CARATTERIZZAZIONE FISICA

4.3.1 Attività dell'acqua

La misura dell'attività dell'acqua è stata effettuata sul campione tal quale mediante igrometro Rotronic Hygroskop DT (Michell Italia Srl, Milan, Italy) a 25°C, fino al raggiungimento della stabilità.

4.3.2 Umidità

Il contenuto di umidità delle polveri è stato determinato gravimetricamente mediante essiccamento in un stufa, a 70°C, fino al raggiungimento del peso costante (A.O.A.C., 1995).

4.3.3 Solubilità

La solubilità in acqua degli estratti è stata determinata mediante il metodo descritto da Cano-Chauca, Stringheta, Ramos & Vidal, (2005). Il campione (1 g, peso secco) è stato addizionato a 100 mL di acqua distillata ed omogenizzato ad alta velocità per 5 minuti. La soluzione ottenuta è stata centrifugata a 3000 g per 5 minuti. Un'aliquota di 25 ml del surnatante è stata trasferita in piastre Petri precedentemente pesate e immediatamente essiccata in stufa a 105°C per 5 ore. La solubilità è stata espressa in % come differenza di peso.

4.3.4 Igroscopicità

L'igroscopicità è stata valutata secondo il metodo descritto da Callahan et al. (1982) con alcune modifiche. Il campione (1 g, peso secco) è stato posto all'interno di una piastra petri (peso noto) e messo in essiccatore contenente una soluzione satura di sale con una umidità relativa dall'8 al 84% per 21 giorni a 25°C fino al

raggiungimento del peso costante. L'igroscopicità è stata espressa come g di umidità adsorbita/100 g di peso secco (g/100g).

4.4 VALUTAZIONI SENSORIALI

PAV: Sono stati reclutati due gruppi di soggetti per valutare l'estratto **UIM16PBEL** nelle 9 soluzioni acquose a diversa concentrazione fenolica (gruppo 1: n = 29; 59% femmine; età media 27.5 ± 7.1) e i prototipi alimentari funzionalizzati (gruppo 2: n = 27; 70% femmine; età media 31.5 ± 9.4). L'assenza di gravidanza, allergie o intolleranze alimentari sono stati utilizzati come criterio di esclusione. Lo studio ha previsto due sessioni di assaggio ognuna della durata di circa 1 ora in due giorni diversi.

All'inizio della prima sessione, i soggetti hanno dato il loro consenso informato secondo i principi della Dichiarazione di Helsinki e sono stati presentati all'organizzazione generale dell'esperimento. Successivamente i soggetti sono stati istruiti all'uso della gLMS (generalized Labelled Magnitude Scale) (0: nessuna sensazione-100: la sensazione più forte immaginabile di qualsiasi tipo) (Bartoshuk, 2000; Green et al., 2007). Nello specifico ai soggetti partecipanti è stato detto che il vertice della scala rappresentava la sensazione più intensa che avrebbero mai potuto immaginare di provare. Quindi, sono stati addestrati a riconoscere e valutare l'intensità percepita delle sensazioni target nell'intervallo "moderato / forte" sul gLMS di: amaro (caffeina 3.00 g/kg), acidità (acido citrico 4.00 g/kg), salato (NaCl 15 g/kg) e astringenza (solfato di potassio e alluminio 0.8 g/kg) (Monteleone et al., 2017). A fine formazione, i soggetti del gruppo 1 hanno valutato i 9 campioni in soluzione acquosa dell'estratto **UIM16PBEL**, mentre i soggetti del gruppo 2 hanno valutato una serie di campioni di un prototipo alimentare vegetale (5 campioni). Gli altri due prototipi sono stati assaggiati e valutati nella seconda sessione (5 campioni ciascuno).

I campioni di **UM16PBEL** a diversa concentrazione fenolica (7 mL) ed i prototipi alimentari (6 g) sono stati presentati in bicchieri di plastica da 80 cc identificati da un codice a tre cifre. Ai soggetti del gruppo 1, i 9 campioni, sono stati presentati in 3 sub-set da tre campioni ognuno. I campioni sono stati presentati ai soggetti in ordine casuale. Le tre serie di prototipi funzionalizzate sono state presentate ai soggetti del gruppo 2 in due sub-set: il primo da tre campioni ed il secondo da due. A tutti i soggetti sono state presentate le tre serie di alimenti nello stesso ordine, mentre i campioni all'interno di ciascuna serie sono stati presentati in ordine casuale. I soggetti hanno avuto una pausa di 3 minuti tra i sottoinsiemi e una pausa di 10 minuti tra i sottoinsiemi.

Durante la valutazione, i soggetti sono stati istruiti a portare in bocca l'intero contenuto del bicchiere, aspettare 10 *s*, sputare e quindi valutare l'intensità delle sensazioni percepite. Per i campioni **PAV** i soggetti sono stati istruiti a prelevare un cucchiaio del campione, attendere 10 *s*, quindi deglutire e valutare l'intensità delle stesse sensazioni target tranne la salinità. L'ordine di valutazione dei gusti è stato randomizzato. Allo scopo di consentire il completo sviluppo dell'intensità, l'astringenza è stata valutata come ultimo attributo.

Le valutazioni sono state eseguite in cabina, luce rossa e "nose clips", in due sessioni. L'ordine di valutazione dei campioni è stato randomizzato e bilanciato all'interno della serie e l'ordine delle serie bilanciato. Ogni campione è stato valutato una sola volta. Fra un campione ed il successivo i soggetti hanno seguito una procedura di pulizia della bocca con acqua e cracker per 1.5 minuti. I dati sono stati raccolti mediante il software Fizz (ver. 2.47.B, Byosystemes, Counternon, France).

VINI: Sui campioni **S1** (Tq, A, B, C, Tab.11) è stato effettuato un test triangolare di differenza. Il metodo triangolare (Jellinek, 1985) permette di determinare la presenza di una differenza sensoriale percepibile tra due prodotti ma non consente di conoscere per quali caratteristiche i due prodotti differiscono.

Per l'esecuzione del test, a ciascun componente del panel è stata presentata una terna di campioni diversamente codificati, informandoli che uno dei tre era diverso e chiedendo di identificarlo. Per principio del test, la scelta del campione diverso è "forzata", dunque i giudici dovevano fornire una risposta.
I giudici hanno testato i campioni secondo l'ordine specificato nella scheda di valutazione che accompagnava i campioni (da sinistra verso destra), potendo ripetere gli assaggi.
L'ordine di presentazione è stato randomizzato e bilanciato all'interno del panel.

4.5 ANALISI STATISTICA

L'analisi della varianza è stata condotta applicando una "Multifactor ANOVA" con il softwer StatGraphics Centurion (versione XV; Statpoint Technologies, Inc:; Warrenton, USA). Per la misura della significatività statistica è stato calcolato un P-value per ogni fattore.
L'analisi delle componenti principali (PCA) è stata effettuata con il softwer StatGraphics Centurion (versione XV; Statpoint Technologies, Inc:; Warrenton, USA).
Per la curva di adsorbimento, i dati di attività dell'acqua e di umidità relativa sono stati elaborati usando il software Table Curve 2D Version 4 (Systos Software Inc., Richmaond, CA).
Sono stati utilizzati modelli ANOVA a due vie per valutare l'effetto della concentrazione fenolica e dell'attività antiossidante nelle soluzioni acquose di **UIM16PBEL** a diversa concentrazione fenolica e per valutare l'effetto sia della quantità di fenoli aggiunti che sul recupero dei fenoli **UIM16PBEL** dai prototipi alimentari vegetali. I fenoli **UIM16PBEL** recuperati (% di recupero) dai campioni **PAV** sono stati calcolati come la differenza tra il contenuto di fenoli totale del prototipo funzionalizzato e quello dell'alimento non funzionalizzato, ed espressi come percentuale dei fenoli aggiunti. Sono stati usati modelli misti ANOVA a due

vie (fattore fisso: concentrazione di fenoli totali; fattore casuale: soggetti) per valutare l'effetto della concentrazione di fenolo sull'intensità percepita delle sensazioni target nelle soluzioni acquose con **UIM16PBEL** e nei campioni di prototipi di alimenti. Sono stati usati modelli misti a tre vie (fattori fissi: matrice alimentare e concentrazione di fenolo; fattore casuale: soggetti) con interazioni per valutare l'effetto della matrice alimentare sull'intensità percepita delle sensazioni target . Per l'analisi dei dati è stato utilizzato il pacchetto software statistico XLSTAT, versione 19.02 (Addinsoft). Un valore p di 0.05 è stato considerato come soglia per la significatività statistica.

L'elaborazione dei dati del test triangolare è stata effettuata confrontando il numero di risposte corrette con il valore riportato in una tabella (Roessler et al., 1978) di probabilità a doppia entrata che, in corrispondenza del numero di giudici che hanno effettuato il test o del numero dei giudizi (numero di giudici per il numero di repliche) per i diversi livelli di significatività, indica il numero minimo di risposte corrette. Se il numero di risposte corrette era uguale o superiore al valore tabulato, considerato che nel test triangolare la probabilità che il giudice indovini per caso il campione diverso è del 33.3%, si poteva affermare la presenza di una differenza significativa tra i due prodotti esaminati.

5.0 RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1 CARATTERIZZAZIONE UVE

5.1.1 Maturità fenolica

Nel corso della campagna vendemmiale 2017, le uve Sangiovese sono state raccolte ed analizzate a differenti stadi di sviluppo. Il contenuto in zuccheri, il pH, l'acidità titolabile ed i parametri di maturità fenolica delle uve sono mostrati nella Tabella 12.

Tabella 12. Composizione delle uve Sangiovese a 3 diversi stadi di sviluppo.

Parametri	Sigla (Unità di misura)	26 Luglio	21 Agosto	22 Settembre
pH	pH (unità di pH)	2.9 ± 0.1	3.3 ± 0.1	3.3 ± 0.1
Acidità titolabile	AT (g/L)	19.3 ± 0.1	5.3 ± 0.1	4.4 ± 0.1
Zuccheri	Z (g/L)	122.1 ± 0.2	143.0 ± 0.3	217.0 ± 0.2
Rapporto vinaccia/succo	V/S (g/L)	116.4 ± 0.4	112.2 ± 0.5	144.6 ± 0.2
Antociani potenziali	AP (mg/L)	51.8 ± 0.2	1035.8 ± 0.6	1307.3 ± 0.4
Antociani estraibili	AE (mg/L malvidina)	40.6 ± 0.3	513.5 ± 0.5	678.8 ± 0.7
Estraibilità antociani	EA%	21.6 ± 0.1	50.4 ± 0.3	48.1 ± 0.2
Ricchezza fenolica tecnologica	RPT	55.1 ± 0.3	23.1 ± 0.2	38.2 ± 0.3
Maturità vinaccioli	MP %	97.1 ± 0.5	11.1 ± 0.1	28.9 ± 0.4
Tannini della buccia	DTpell%	1.6 ± 0.1	20.5 ± 0.4	27.2 ± 0.2
Tannini dei vinaccioli	DTpep%	53.5 ± 0.4	2.6 ± 0.1	11.0 ± 0.1

I dati sono riportati come la media di 3 repliche ± la deviazione standard.

Durante lo sviluppo della bacca si è verificato un incremento del contenuto zuccherino, seguito da un abbassamento dell'acidità totale ed un aumento del valore del pH, andamento che riflette una normale evoluzione delle fasi di sviluppo dell'acino (Ribèreau-Gayon et al., 2007). L'andamento dei parametri di base osservato durante lo sviluppo delle uve Sangiovese, era coerente con quanto riportato da Mulero, Pardo & Zafrilla (2010), i quali studiarono le caratteristiche di

uve a bacca rossa (cv. Monastrell) durante l'ultimo mese di maturazione. Gli Autori osservarono infatti valori di pH pari a 3.60, 3.55 e 3.70 e valori di acidità titolabile pari a 8.16, 7.03 e 6.58 g/L di acido tartarico, in uve campionate rispettivamente il 28 Agosto, l' 11 Settembre e il 25 Settembre del 2002.

Il concetto di maturità fenolica cerca di prendere in considerazione il tenore globale delle sostanze fenoliche presenti nell'uva, ma anche la loro struttura e la loro attitudine ad essere estratte durante il processo di vinificazione (Glories, 1999). La determinazione del contenuto di antociani e tannini dell'uva nel corso della maturazione permette di seguire l'evoluzione di queste molecole e di classificare le uve secondo la loro ricchezza fenolica. L'uva possiede dunque, a seconda delle condizioni di maturazione e della varietà, un potenziale di estrazione e un' "estraibilità" variabile (Glories, 1999). Nelle uve **UIS17**, campionate a 3 diversi stadi di sviluppo, il rapporto vinaccia/succo (V/S) determinato nell'ultimo prelievo era pari a 144.6 g/L. Tale valore fornisce informazioni sullo stato di diluizione delle parti solide nel succo d'uva e rientrava nell'intervallo 100-300 g/L descritto in letteratura per le uve rosse a maturità completa e può variare a seconda del vitigno, della zona e delle condizioni climatiche (Ribèreau-Gayon et al., 2007). Il leggero decremento riscontrato nel secondo prelievo (21 Agosto) potrebbe essere attribuito alla parziale disidratazione dell'uva. Infatti, la scarsissima piovosità ed il caldo eccezionale della stagione 2017, possono aver determinato uno scarso accumulo di succo durante la fase di crescita erbacea della bacca. Per quanto riguarda l'estraibilità degli antociani, questa è in funzione dello stato di maturazione delle uve che condiziona il livello di degradazione della buccia (Glories, 1999). L'utilizzo dei due pH è la base del metodo di analisi utilizzato. L'ambiente acido permette di demolire le membrane proteofosfolipidiche, rompendo i legami proteici, e di conseguenza di liberare completamente il contenuto vacuolare. Tutti gli antociani sono così estratti e solubilizzati a pH 1. L'estrazione a pH 3.2 è confrontabile con una vinificazione. Se le membrane cellulari non sono porose gli antociani diffondono poco, se invece esse sono già parzialmente idrolizzate dagli enzimi endogeni delle uve, gli antociani

fuoriescono dal vacuolo e l'estrazione tende ad essere simile a quella effettuata con pH 1. La variazione tra gli antociani estraibili a pH 1 e a pH 3.2 fornisce una misura della fragilità delle membrane nei confronti dell'estrazione dei pigmenti (Glories, 1999).

Durante lo sviluppo delle uve Sangiovese, si è assistito ad un incremento sia degli antociani potenziali (AP, estratti a pH 1.0) che di quelli estraibili (AE, estratti a pH 3.2). L'aumento dei due parametri riscontrato nelle uve Sangiovese è coerente con il normale accumulo degli antociani nella bacca durante la maturazione dell'uva, e riflette la fisiologica degradazione delle strutture cellulari che contengono tali composti (Saint-Cricq de Gaulejac et al., 1998). Tuttavia, lo scarto fra i valori di antociani potenziali ed antociani estraibili mette in evidenza una difficoltà di estrazione degli antociani fino al momento della raccolta, indicando una scarsa maturazione cellulare delle uve Sangiovese analizzate. L'indice di maturità cellulare si aggirava infatti intorno a 50, valore piuttosto elevato, confermando che gli antociani non erano facilmente estraibili dalle pareti cellulari della bacca. Valori di EA% < 30 indicano una spiccata estraibilità degli antociani, indicando che tanto minore è il valore dell'indice EA%, tanto maggiore è l'estraibilità degli antociani (Saint-Cricq de Gaulejac et al., 1998; Canuti, Picchi, Zanoni, Fia & Bertuccioli, 2017). Parallelamente all'accumulo e all'estrazione degli antociani, si assiste ad una evoluzione dei tannini, la cui concentrazione risulta già importante al momento dell'invaiatura (Glories, 1999). La concentrazione dei tannini estratti dai vinaccioli tende a diminuire nel corso della maturazione dell'uva. Questa diminuzione è più o meno importante in funzione delle condizioni di maturazione dell'uva e pertanto dell'annata e sembra essere collegata ad un accumulo degli antociani nelle bucce (Glories, 1999). I dati ottenuti sembrano seguire quanto descritto in letteratura. L'indice di maturità dei vinaccioli (MP%) delle uve Sangiovese (Tab.13) era infatti molto alto (97.1%) il 26 Luglio, quando le bacche erano ancora immature indicando un grande potenziale di tannini dei vinaccioli ancora verdi e immaturi a questo stadio di sviluppo. In questa fase dello sviluppo dell'uva, il contributo dei tannini dei

vinaccioli (DTpep) alla ricchezza fenolica del succo era molto più alto di quello dei tannini della pelle (DTpell). Il valore MP% diminuiva durante la maturazione delle uve arrivando ad un valore % pari a 28.9 a maturità completa. Dall'invaiatura alla maturazione il tannino della buccia ha contribuito molto di più dei tannini dei vinaccioli alla ricchezza fenolica del succo (Tab.13).

Alcuni Autori studiando cultivar a bacca rossa provenienti da zone diverse della Roja (cv. Tempranillo) e dalla zona di Bordeaux (cv. Merlot), osservarono delle variazioni nella % di antociani estraibili e antociani potenziali tra cultivar diverse, a parità di sviluppo della bacca e di zona di coltivazione. Tale differenza è stata osservata, dagli stessi Autori, anche all'interno della stessa cultivar in relazione alle diverse fasi di sviluppo e la zona di produzione delle uve (Saint-Cricq de Gauleiac et al., 1998).

Bautista-Ortin et al. (2003) osservarono che il grado di maturazione della bacca, non influiva solamente sul contenuto fenolico della varietà, ma anche sul loro grado di estrazione e conseguentemente sulla quantità di composti fenolici presenti nel vino a seguito del processo di vinificazione.

5.1.2 Composti antiossidanti delle bacche

Nell'annata 2017, I polifenoli totali determinati al reattivo di Folin-Ciocalteau e l'attività antiossidante delle uve Sangiovese (**UIS17**) sono mostrate nella Figura 27. All'invaiatura, il 21 Agosto, il contenuto di polifenoli totali era pari a 1232 mg di CATeq/kg di uva, valore significativamente superiore a quello (1090 mg di CATeq/kg di uva) del campione raccolto il 22 Settembre. L'attività antiossidante (13313 μmol TEAC/kg di uva) rilevata nelle uve alla fase di invaiatura era significativamente superiore rispetto a quella (9276 μmol TEAC/kg di uva) osservata alla raccolta (22 Settembre).

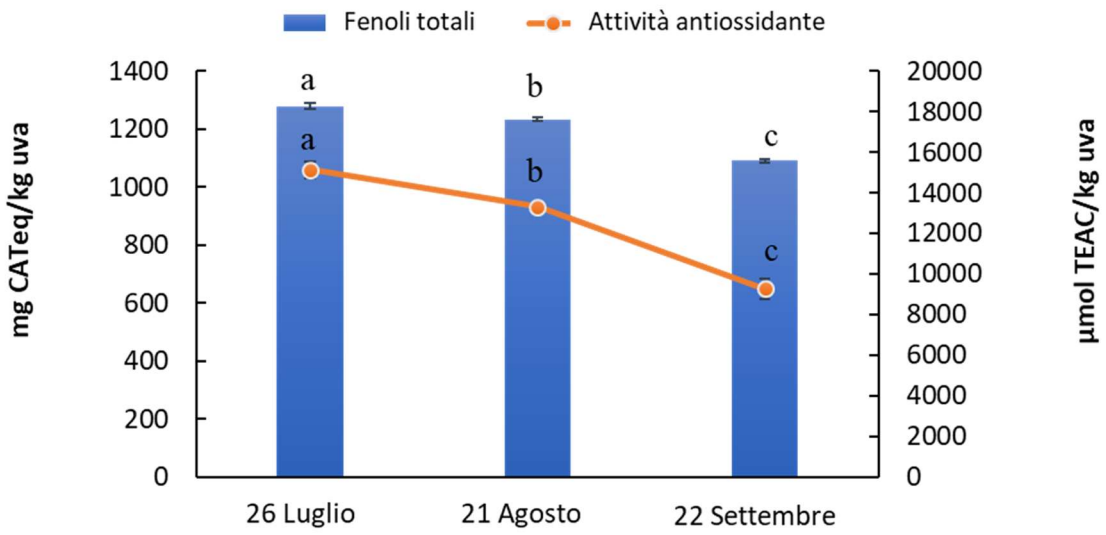


Figura 27. Attività antiossidante e polifenoli totali nelle uve Sangiovese (2017) a tre fasi di sviluppo (26 Luglio, 21 Agosto, 22 Settembre).

Lo stadio di sviluppo della bacca ha influenzato sia il contenuto fenolico totale che l'attività antiossidante. Il contenuto fenolico totale e l'attività antiossidante dell'uva sono infatti significativamente diminuiti ad ogni campionamento.

Anche Mulero et al. (2010) osservarono variazioni dell'attività antiossidante delle uve (cv. Monastrell) nel corso della maturazione. Gli Autori evidenziarono un decremento significativo del valore dell'attività antiossidante durante l'ultimo mese di maturazione della bacca (Agosto-Settembre) che passava da 5.50 mmol Trolox/g di uva a 4.7 mmol Trolx/g di uva a fine maturazione.

E' noto che diversi fattori come la varietà, la maturità della bacca e i fattori ambientali possano influire sia qualitativamente che quantitativamente sul contenuto fenolico totale della bacca e conseguentemente sulle loro proprietà nutrizionali (Garrido & Borges, 2013; Adams, 2006). Inoltre, Jakobek (2015) afferma che l'attività antiossidante di una qualsiasi matrice vegetale è il risultato dell'effetto sinergico o di antagonismo delle interazioni tra i differenti composti fenolici, sia tra loro, che con gli altri componenti della matrice tali proteine, carboidrati o lipidi.

Infatti, in relazione alla matrice di riferimento, tali nutrienti si trovano nell'ambiente circostante dei composti fenolici, con cui possono entrare in contatto ed interagire con loro. In effetti, molti di questi nutrienti hanno una struttura porosa molto complessa che intrappola i polifenoli e, di conseguenza, modifica la loro biodisponibilità (Jakobek, 2015).

Il profilo fenolico delle uve è mostrato nella Tabella 13. Gli acidi fenolici maggiormente presenti nelle uve ai diversi stadi di sviluppo erano gli acidi fertarcio e caftarico, nonostante la loro significativa riduzione durante le 3 fasi di sviluppo della bacca. Variazione significativa della classe degli acidi fenolici è stata evidenziata anche da Mulero et al. (2010) in bacche Monastrell in corso di maturazione. I valori osservati nel nostro studio indicano una composizione in acidi fenolici delle uve **UIS17** maggiore rispetto a quello riscontrato dagli Autori.
I flavan-3-oli erano i fenoli più abbondanti nelle bacche verdi (26 Luglio) e la (+)-catechina era il principale flavan-3-olo. Durante lo sviluppo delle bacche è stata osservata una riduzione significativa di flavan-3-oli e procianidine (B1 e B2). In particolare, il 26 Luglio la quantità di flavan-3-oli era circa dieci volte superiore rispetto a quella osservata il 21 Agosto ed aveva raggiunto livelli molto bassi il 22 Settembre. Il 21 Agosto, è stato rilevato il più alto contenuto di flavonoli. La quercetina 3-*O*-glucuronide e la quercetina 3-*O*-esoside erano i due principali flavonoli dell'uva in ogni fase di sviluppo. Diverse evoluzioni sono state osservate tra i flavonoli. In particolare, la quercetina aumentava significativamente solo all'ultimo campionamento. La miricetina si è mantenuta stabile su tre campioni, mentre la rutina è aumentata significativamente al secondo campione e poi è diminuita. La quercetina 3-*O*-esoside è aumentata significativamente dal primo al secondo campione, mentre la quercetina 3-*O*-glucuronide e il campferolo 3-*O*-glucoside erano al massimo livello il 21 Agosto. Nelle uve, il glutatione era presente nella forma ridotta (GSH), legata (acido 2-S-glutationil caftarico) e ossidata (GSSG).

Tabella 13. Profilo fenolico delle **UIS17** ai 3 diversi stadi di sviluppo.

Composti	26 Luglio	21 Agosto	22 Settembre
		(mg/kg UI)	
Acidi fenolici			
Acido caffeico	nd	nd	nd
Acido caftarico	41.5 ± 0.9 [c]	6.2 ± 0.1 [b]	4.8 ± 0.0 [a]
Acido cumarico	nd	nd	nd
Acido cutarico	9.5 ± 0.1 [c]	1.1 ± 0.0 [a]	1.6 ± 0.3 [b]
Acido fertarico	57.4 ± 0.7 [c]	45.4 ± 0.6 [b]	31.4 ± 0.8 [a]
Acido ferulico	0.1 ± 0.0	nd	nd
Acido gallico	nd	nd	0.3 ± 0.0
Flavonoli			
Quercetina	0.1 ± 0.0 [a]	0.1 ± 0.0 [b]	0.7 ± 0.1 [c]
Quercetina 3-*O*-esoside	6.0 ± 0.5 [a]	22.0 ± 1.5 [b]	20.1 ± 5.6 [b]
Quercetina 3-*O*-glucoronide	31.7 ± 2.2 [b]	72.7 ± 4.9 [c]	27.6 ± 1.7 [a]
Rutina	1.2 ± 0.1 [b]	1.7 ± 0.0 [c]	0.7 ± 0.1 [a]
Isoramnetina	nd	nd	nd
Campferolo	nd	nd	0.1 ± 0.0
Campferolo 3-O-glucoside	1.2 ± 0.2 [a]	5.5 ± 0.3 [c]	3.8 ± 0.2 [b]
Miricetina	0.1 ± 0.0 [a]	0.1 ± 0.0 [a]	0.1 ± 0.0 [a]
Miricetina-esoside	nd	nd	nd
Piceatannolo	nd	nd	nd
Flavan-3-oli			
(-)-Epicatechina	56.3 ± 4.3 [b]	6.8 ± 0.3 [a]	1.5 ± 0.0 [a]
(+)-Catechina	628.4 ± 42.8 [b]	76.4 ± 2.1 [a]	24.4 ± 0.3 [a]
Epicatechina-*O*-gallato	46.0 ± 3.7 [c]	5.0 ± 0.4 [b]	0.5 ± 0.1 [a]
Procianidine			
Procianidina B 1	13.0 ± 1.1 [c]	5.9 ± 0.3 [b]	2.4 ± 0.1 [a]
Procianidina B 2	15.5 ± 1.1 [c]	10.1 ± 0.4 [b]	5.0 ± 0.1 [a]
GSH (libero, legato e forma ossidata)			
Glutatione	1.1 ± 0.1 [a]	0.8 ± 0.0 [a]	0.8 ± 0.0 [a]
Acido 2-S-glutationil caftarico (GRP)	4.0 ± 0.3 [b]	2.8 ± 0.2 [a]	5.7 ± 0.4 [c]
Glutatione GSSG	1.0 ± 0.0 [a]	0.9 ± 0.0 [a]	0.9 ± 0.0 [a]
Stilbeni			
Resveratrolo	nd	nd	nd

I dati sono riportati come la media ± la deviazione standard. Lettere diverse rappresentano valori i significativamente differenti [(a,b,c)]. **UIS17**, uve immature Sangiovese 2017.

Sono disponibili pochissimi studi sull'evoluzione dei polifenoli del Sangiovese durante la maturazione (Canuti et al., 2018). I nostri risultati sono coerenti con quelli ottenuti da altri Autori che hanno osservato una concentrazione massima di tannini estraibili (flavan-3-oli e procianidine) nei vinaccioli e nelle bucce di alcune varietà a bacca rossa (Cabernet Sauvignon, Syrah e Pinot Noir) e bianca (cv Sémillon e Ugni Blanc) prima dell'invaiatura (De Freitas & Glories, 1999; Harbertson, Kennedy & Adams, 2002). Questi Autori hanno osservato che nelle prime fasi dello sviluppo, la concentrazione dei tannini dei vinaccioli era maggiore della concentrazione dei tannini della buccia delle uve Cabernet Sauvignon e Syrah (Harbertson et al., 2002). Altri Autori hanno osservato che il principale costituente della classe dei flavan-3-oli era la (+)-catechina e la sua concentrazione diminuiva con il progredire dello sviluppo delle uve Sémillon (Freitas & Glories, 1999). L'evoluzione delle catechine e delle procianidine oligomere di uve Touriga Francesca e Castelão Francês è stata studiata da Jordão, Ricardo-da-Silva e Laureano, (2001). Partendo dalla fase di invaiatura, le procianidine oligomere, sia dei vinaccioli che delle bucce, diminuivano durante la maturazione, principalmente nella fase iniziale dell'evoluzione, mentre la concentrazione di (+)-catechina ed (-)-epicatechina, provenienti dai vinaccioli, aumentava durante le prime fasi di maturazione, per poi subire un forte decremento e stabilizzazione fino ad arrivare alla maturazione completa. Una simile evoluzione del flavan-3-olo monomerico è stata osservata in diverse varietà di uve rosse e bianche (Fernandez de Simon, Perez-Ilzarbe, Hernandez, Gomez-Cordoves & Estrella, 1992; Oszmianski, Romeyer, Sapis & Macheix, 1986). La cultivar Gamay ha mostrato il più alto contenuto in procianidine nelle prime fasi di sviluppo, seguito da una diminuzione nelle ultime fasi della maturazione (Czochanska, Foo e Porter, 1979). Tuttavia, la diversa evoluzione delle procianidine (B1, B2 e B4) è riportato da altri Autori che hanno osservato un aumento di questi composti durante la maturazione (Lee & Jaworski, 1989; Oszmianski et al., 1986).

Liang et al (2012) studiarono l'evoluzione dei composti fenolici, in particolare dei flavonoli, di 7 cultivar diverse. Tali Autori dimostrarono che il contenuto fenolico delle bacche è strettamente influenzato dai fattori climatici; osservarono infatti che il contenuto di quercetina, campferolo e dei loro derivati, variava tra due annate e tra diverse cultivar a bacca rossa. È noto inoltre che la concentrazione di quercetina, sia in forma libera che legata, sia direttamente influenzata dall'esposizione solare dei grappoli (Price, Breen, Valladao & Watson, 1995).

La forma più abbondante di glutatione nelle **UIS17** era l'acido 2-S-glutationil caftarico (GRP). È noto che il GRP si forma immediatamente dopo la raccolta delle uve, quando gli *o*-chinoni, derivanti dall'ossidazione enzimatica degli acidi fenolici, si trovano in presenza di GSH (Motta, Guaita, Petrozziello, Panero, & Bosso, 2014). Tuttavia, il livello di glutatione rilevato nelle uve Sangiovese era piuttosto basso rispetto a quello osservato per altre cultivar a bacca rossa raccolte a maturità completa (Cheynier, Soquet & Moutounet, 1989; Pons, Lavigne, Darriet e Dubourdieu, 2015).

5.1.3 Profilo delle vitamine idrosolubili

Il profilo delle vitamine idrosolubili delle uve Sangiovese (**UIS17**) a tre diversi stadi di sviluppo è mostrato nella Figura 28.

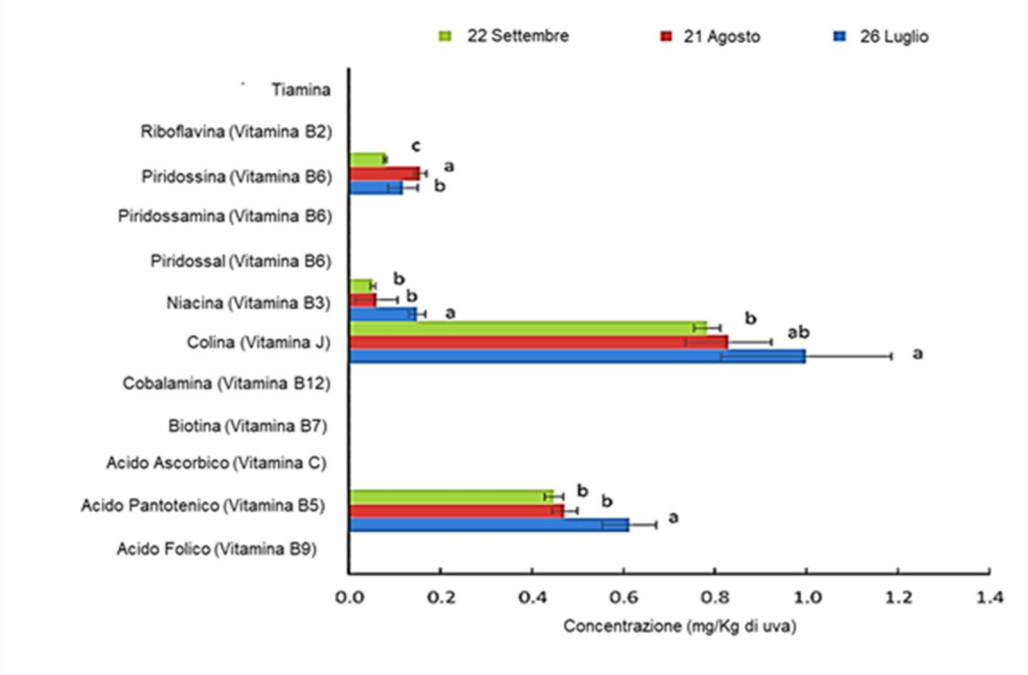


Figura 28. Profilo delle vitamine idrosolubili delle uve a tre stadi di sviluppo delle bacche (26 Luglio, 21 Agosto, 22 Settembre).

Nelle uve sono state rilevate quattro vitamine: niacina (vitamina B3), acido pantotenico (vitamina B5), piridossina (vitamina B6) e colina (vitamina J). La vitamina J è risultata la più abbondante in ogni fase di sviluppo dell'uva. Durante lo sviluppo dell'uva, il contenuto totale di vitamine è diminuito da 1880 a 1363 µg/kg di uva. Solo il contenuto di piridossina era significativamente più elevato al momento dell'invaiatura (21 Agosto) rispetto a quello osservato il 26 Luglio e il 22 Settembre. L'acido ascorbico (vitamina C), la tiamina (vitamina B1) e la riboflavina (vitamina B2) non sono state rilevate nelle uve Sangiovese. L'acido ascorbico viene rapidamente ossidato dopo la pigiatura dell'uva, la tiamina viene degradata dalla

reazione con SO_2 o l'esposizione al calore e la riboflavina viene ossidata dall'esposizione alla luce. In letteratura sono mancanti le informazioni sulla composizione delle vitamine idrosolubili dell'uva Sangiovese durante lo sviluppo delle bacche, tuttavia alcuni Autori hanno descritto il profilo vitaminico di alcune cultivar sia a bacca rossa che bianca. Tra le vitamine idrosolubili dell'uva, l'acido pantotenico, la piridossina e la niacina sono state descritte in diverse cultivar a bacca bianca (cv Chardonnay e Riesling) (Hagen et al., 2008) mentre non sono disponibili dati sulla colina. Hagen et al. (2008) hanno analizzato il profilo delle vitamine idrosolubili sia sulle uve immature che a maturazione ultimata ed hanno osservato che la concentrazione di acido pantotenico e di biotina non variava significativamente in funzione dello stadio di sviluppo delle uve, ma sostenevano che il fattore che incideva maggiormente sul profilo delle vitamine idrosolubili era la cultivar. La presenza di vitamine idrosolubili nelle uve è stata ampiamente discussa da Andrade et al. (2019), i quali descrissero la presenza di acido pantotenico, vitamina B6, vitamina C, riboflavina e tiamina in cultivar a bacca rossa della specie *Vitis vinifera* ed hanno concluso, studiando l'attività antiossidante delle uve, che le vitamine idrosolubili contribuiscono all'attività antiossidante delle uve e dei suoi sottoprodotti.

Riassumendo tutte le informazioni riguardanti i dati discussi, il contento in composti bioattivi delle uve Sangiovese ai diversi stati di sviluppo è stato utilizzato per eseguire un'analisi delle componenti principali (PCA) (Fig. 29). PC1 e PC2 spiegano oltre il 90% della variabilità totale tra i campioni. I campioni si sono raggruppati in base alla fase di sviluppo dell'uva. Le uve immature raccolte il 26 Luglio mostravano un contenuto maggiore in vitamine, acidi idrossicinnamici, flavanoli, acidità titolabile e glutatione rispetto agli altri campioni. I campioni raccolti durante l'invaiatura (21 Agosto) mostravano un maggiore contenuto in flavanoli e piridossina (vitamina B6) mentre le uve raccolte al momento della vendemmia (22 Settembre)

erano caratterizzate da un pH ed un contenuto di zucchero maggiori, anche il glutatione nella sua forma ossidata era presente in concentrazione maggiore.

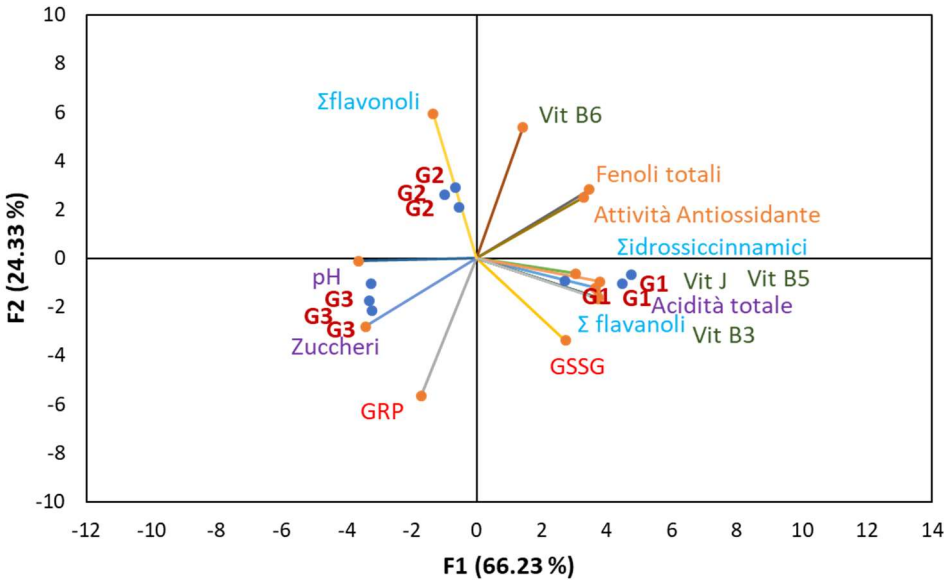


Figura 29. PCA delle uve a diversi stadi di sviluppo della bacca (G1 = 26 Luglio, G2 = 21 Agosto, G3 = 22 Settembre).

5.2 PRODUZIONE E CARATTERIZZAZIONE DEGLI ESTRATTI LIQUIDI

5.2.1 Produzione e caratterizzazione degli estratti liquidi da uve immature sangiovese

Nell'annate 2015 e 2017, presso l'Azienda "Tenuta dello Scompiglio", mediante il processo di produzione industriale **PA** e **PC**, sono stati prodotti un estratto liquido a partire da uve immature Sangiovese, **UIS15PAL** e **UIS17PCL**.

5.2.1.1 Fase di estrazione

Al fine di osservare delle possibili variazioni durante la fase di estrazione dei processi di produzione **PA** e **PC,** per l'ottenimento degli estratti liquidi provenienti dalle **UIS15** e **UIS17**, sono state monitorate l''evoluzione dei polifenoli totali e degli antociani; il loro andamento è mostrato nella Figura 30.

Il rilascio dei composti antiossidanti dalle parti solide delle uve **UIS15** e **UIS17** durante l'estrazione solido-liquido sono state monitorate per un periodo di 72 e 96 ore, rispettivamente.

In entrambi i processi, l'evoluzione dei composti fenolici estratti dalle uve rifletteva un tipico fenomeno di estrazione solido-liquido, si è assistito infatti ad una quasi istantanea dissoluzione dei soluti "liberi" dalla superficie della bacca all'interno del succo (Zanoni, Siliani, Canuti, Rosi & Bertuccioli, 2010). Per il campione **UIS15PAL**, sia i polifenoli totali che gli antociani sono stati rapidamente estratti dalle uve. Confrontando il contenuto di PFT e antociani dopo 24 ore con quelli ottenuti al termine della lavorazione, circa il 92% dei polifenoli e il 78% degli antociani sono stati estratti dopo solo 24 ore. A 72 ore, quando l'estrazione è stata interrotta, la concentrazione di antociani (197 mg/L) nell'estratto liquido ha mostrato un leggero aumento mentre quella dei fenoli totali (822 mg/L) era stabile.

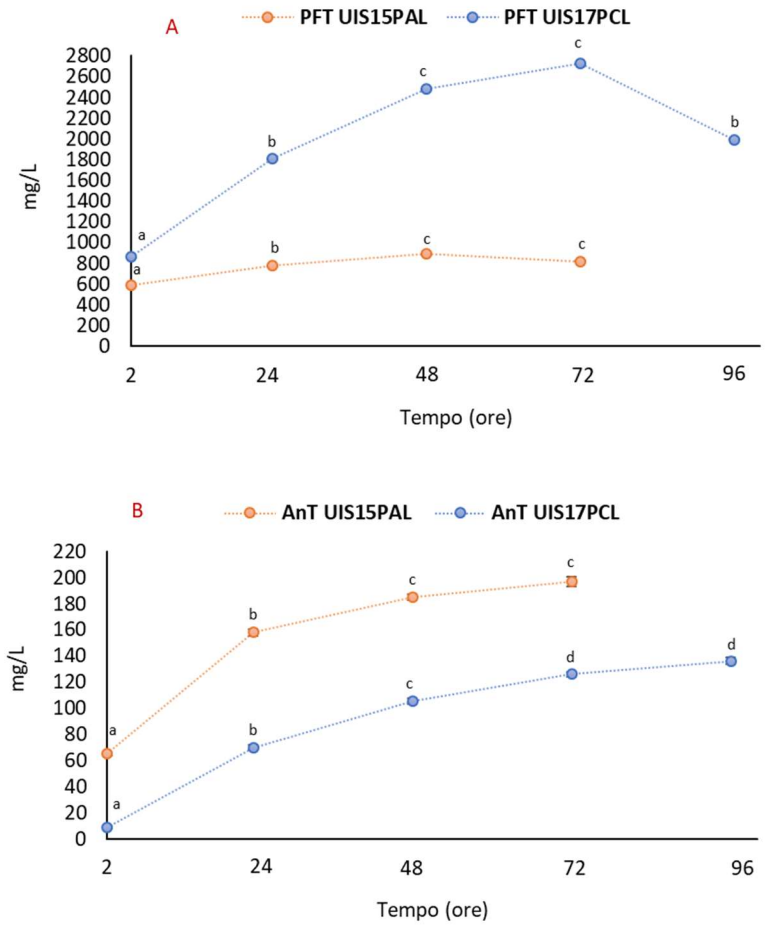


Figura 30. Evoluzione dei polifenoli totali (PFT, A) e degli antociani (AnT, B) durante la fase di estrazione del processo **PA** (2015) e del processo **PC** (2017) per la produzione degli estratti liquidi **UIS15PAL** e **UIS15PCL.** I dati sono riportati come la media ± la deviazione standard. Lettere diverse indicano valori significativamente differenti [a,b,c,d].

Durante l'estrazione nel processo **PC**, il contenuto in polifenoli totali è aumentato significativamente ad ogni campionamento fino a 48 ore dall'inizio dell'estrazione. A 72 ore, l'estrazione dei polifenoli è rallentata e la loro concentrazione ha raggiunto il livello massimo di 2730 mg/L di (+)-catechina. All'ultimo campione (96 ore), i PFT del succo sono diminuiti fino a 1994 mg/L, rispecchiando il rallentamento

dell'estrazione dei polifenoli totali osservato nel processo **PA** dopo 72 ore di estrazione solido-liquido (Fig.30A). Così come nel **PA**, anche nel **PC** il contenuto di antociani incrementava significativamente durante l'estrazione solido-liquido raggiungendo una concentrazione finale pari a 133 mg/L di malvidina 3-*O*-glucoside dopo 96 ore (Fig.30B).

La tecnica della macerazione a freddo (CM) è ampiamente utilizzata nella vinificazione allo scopo di migliorare l'estrazione dei composti fenolici in mezzi acquosi, a bassa temperatura. In queste condizioni, l'inizio della fermentazione e degli enzimi ossidasici sono inibiti (Aleixandre-Tudo & duToit, 2018). In entrambi i processi **PA** e **PC**, l'utilizzo della CO_2 solida ha consentito il rapido abbassamento della temperatura (6°C), contrastando così l'avvio di fermentazioni indesiderate. Durante tutte le fasi di estrazione è stata monitorata giornalmente la temperatura. Dall'andamento nella Figura 31, è possibile osservare che il sistema industriale extraVelvet, in tali condizioni operative, permetteva il mantenimento della temperatura ad un valore prossimo ai 6°C.

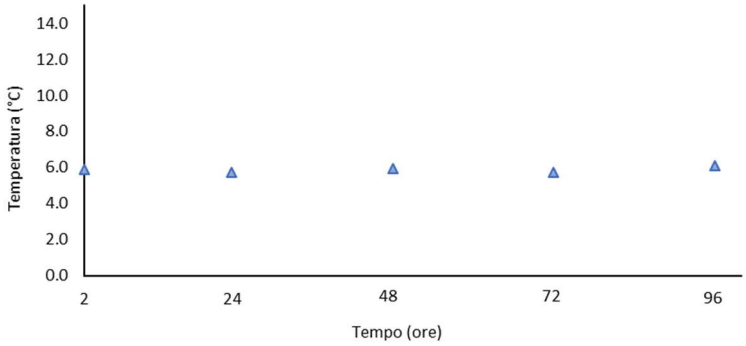


Figura 31. Andamento della temperatura (°C) durante le fasi di estrazione nel processo di produzione **PC**.

L'effetto della tecnica di macerazione a freddo sulla concentrazione dei composti fenolici nell'estratto liquido è variabile in funzione delle condizioni del processo, ovvero tempo, temperatura e tipo di criogeno. Inoltre, è possibile che le caratteristiche dell'uva come il livello di maturità e il contenuto fenolico influenzino l'evoluzione dell'estrazione dei fenoli e la loro concentrazione finale (Aleixandre-Tudo & duToit, 2018). In teoria, più prolungato è il periodo di contatto tra il succo e le bucce dell'uva, maggiore sarà la quantità di composti fenolici estratta nel succo. Tuttavia, la precipitazione, la degradazione e il riassorbimento dei fenoli sulla buccia dell'uva possono influenzare la concentrazione finale di questi composti nel succo (Aleixandre-Tudo & duToit, 2018).

Nonostante il simile andamento degli antociani e dei polifenoli totali durante l'estrazione solido-liquido nei due processi **PA** e **PC**, l'incremento di tali composti è stato più significativo nel processo **PC**; gli antociani sono passati da un valore iniziale di 8.69 mg/L a 136.31 mg/L e il contenuto in polifenoli totali ha raggiunto il valore di 2730 mg/L partendo da una concentrazione pari a 864 mg/L.

Probabilmente la diversa quantità di ghiaccio secco utilizzata nei due processi ha influito sulla resa di estrazione della componente fenolica. Zinnai et al. (2008), studiarono l'effetto della criomacerazione nella vinificazione di uve Sangiovese utilizzando come criogeni CO_2 solida e azoto. Nel loro studio gli Autori evidenziarono che a seguito del *crash* cellulare, si liberavano in fase liquida i componenti più pregiati delle uve, tra cui i composti fenolici che, nelle tesi criomacerate, si accumulavano in soluzione protetti dall'atmosfera inerte assicurata dal passaggio in fase vapore del criogeno impiegato in questa fase, giustificando così il significativo aumento percentuale della componente fenolica rispetto alla tesi non addizionata con il criogeno. Nel processo **PA** sono stati utilizzati infatti 65 kg di ghiaccio secco su un totale di 6.5 q di **UIS15** a confronto dei 360 kg utilizzati nell'estrazione delle **UIS17** per un quantitativo totale di uva pari a 10.8 q. Probabilmente anche le caratteristiche delle uve di partenza hanno influenzato la quantità di PFT e antociani estratti nel processo di estrazione.

La posizione del vigneto e il sito specifico sono molto importanti. Nei climi secchi l'irrigazione generalmente aumenta il vigore della vite, la dimensione e la resa delle bacche (Roggero, Coen & Ragonnet, 1986). All'interno della stessa varietà, l'annata, l'andamento climatico, il tipo di suolo, la localizzazione geografica del vigneto, la qualità e la maturità della bacca, sono tutti fattori che possono influenzare la concentrazione fenolica (Sellappan, Akoh, & Krewer, 2002).

Nel corso del processo di estrazione delle **UIS17**, sono stati monitorati anche i parametri del colore, dell'attività antiossidante, del profilo fenolico e delle vitamine idrosolubili del succo.

L'intensità del colore aumentava significativamente ad ogni campionamento mentre la tonalità, inizialmente molto elevata, diminuiva a un valore inferiore ad 1.0 dopo 24 ore per poi rimanere stabile (Fig.32). I valori di assorbanza del colore indicavano che l'estratto liquido era adeguatamente protetto dalla degradazione durante l'estrazione. In effetti, un aumento di tonalità indica un tono di colore arancione/marrone dei pigmenti probabilmente dovuto a fenomeni di ossidazione. È noto che l'aggiunta di ghiaccio secco contribuisce all'inibizione degli enzimi polifenolossidasi dell'uva e la sua sublimazione durante l'estrazione crea un'atmosfera satura di CO_2 che protegge i composti fenolici dall'ossidazione chimica (Gambacorta et al., 2011; Gil-Muñoz et al., 2009).

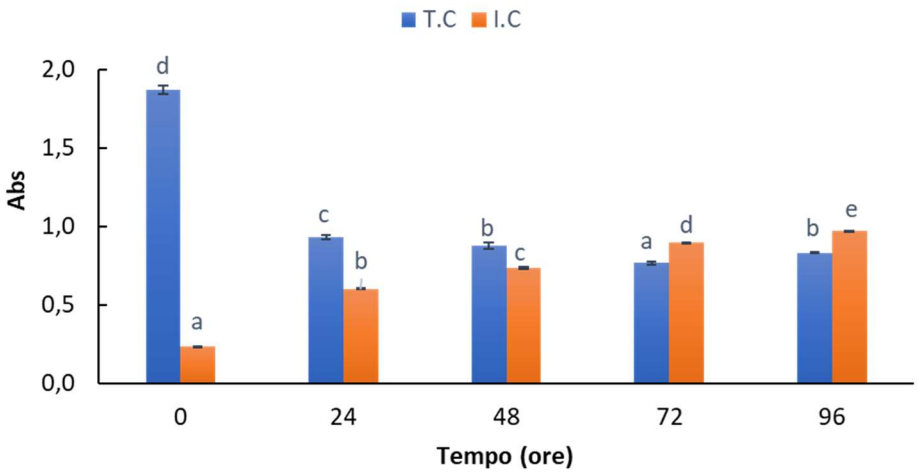


Figura 32. Evoluzione del colore del succo Sangiovese 2017 nel corso dell'estrazione. Le barre indicano la deviazione standard. Lettere diverse indicano valori significativamente differenti [a,b,c,d,e].

L'attività antiossidante del succo durante le fasi di estrazione è aumentata in modo significativo dopo 24 e 72 ore, raggiungendo una concentrazione finale, dopo le 96 ore, pari a 4739 µmol di TEAC/L (Fig.33).

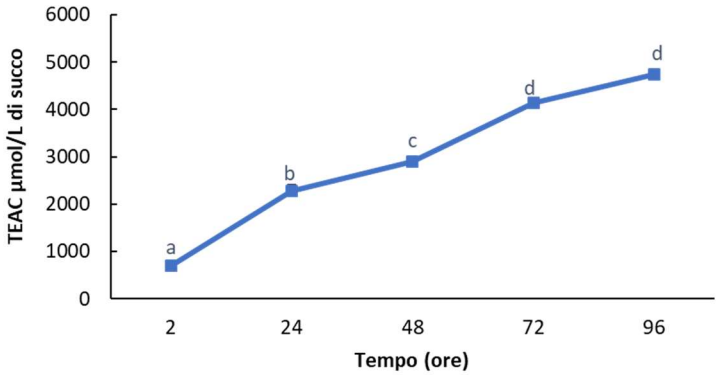


Figura 33. Attività antiossidante durante il processo di estrazione. Le barre rappresentano la deviazione standard. Lettere diverse indicano valori significativamente differenti [a,b,c,d,].

Risultati simili di attività antiossidante sono stati osservati da Granato et al. (2014), studiando le caratteristiche chimico/fisiche di 31 succhi ottenuti da uve (*Vitis lambrusca*) proveniente da Italia, Spagna, Francia, Inghilterra, Olanda, Germania, Austria e Turchia. Gli Autori riportarono infatti un valore di attività antiossidante medio, misurato con il metodo FRAP, pari a 5.75 mmol TE (Trolox equivalente)/L.

La composizione fenolica del succo **UIS17PCL** durante l'estrazione è mostrata nella Tabella 14. Ad ogni campionamento, la concentrazione di ciascun composto fenolico ha mostrato un aumento significativo ad eccezione della quercetina e della miricetina. All'inizio della fase di estrazione, gli acidi fenolici ed i flavonoli erano i principali composti fenolici rilevati nel succo. La classe dei flavan-3-oli e delle procianidine hanno mostrato un ritardo di estrazione e la loro concentrazione inizialmente era molto bassa; la (-)-epicatechina e procianidina B1 erano rilevabili dopo le 24 ore di estrazione, mentre l'epicatechina-*O*-gallato è stata rilevata solo dopo 48 ore. Dopo 96 ore di estrazione, le classi fenoliche più concentrate nel succo erano gli acidi fenolici ed i flavan-3-oli. L'acido fertarico, la (+)-catechina e la quercetina-3-*O*-glucuronide erano i composti fenolici più abbondanti nell'estratto liquido **UIS17PCL** (Tab.14). Il glutatione era presente nell'estratto liquido finale sotto forma di acido 2-S-glutationil-caftarico.
Correlazioni positive sono state osservate tra alcuni composti fenolici e l'attività antiossidante; nello specifico la correlazione positiva più alta è stata trovata tra l'attività antiossidante e la procianidina B1 (r = 0.9938), seguita dalla procianidina B2 (r = 0.9889), dal campferolo-3-*O*-glucoside (r = 0.9946) ed infine dalla quercetina-3-O-esoside (r = 0.947). Mulero et al. (2010) osservarono, in vini provenienti da uve a bacca rossa cv Monastrell, che l'attività antiossidante era correlata positivamente con alcuni dei composti fenolici identificati, tra cui antociani e flavonoli. Gli Autori evidenziarono anche una debole correlazione tra l'attività antiossidante e i derivati degli acidi idrossicinnamici presenti nel vino, a favore delle

forme libere degli acidi corrispondenti. Tra gli stilbeni, il *trans*-resveratrolo mostrava una correlazione con l'attività antiossidante pari a $r^2 = 0.74$.

Tabella 14. Composizione fenolica durante il processo di estrazione **PC** delle **UIS17** e dell'estratto liquido finale **UIS17PCL**

Composti	2 h	48 h	96 h	UIS17PCL
	Concentrazione (mg/L di succo)			
Acid fenolici				
Acido caffeico	nd	nd	nd	nd
Acido caftarico	0.30 ± 0.05 [d]	10.19 ± 0.18 [c]	36.62 ± 0.41 [b]	135.3 ± 3.36 [a]
Acido cumarico	nd	nd	nd	nd
Acido cutarico	0.09 ± 0.01 [d]	2.85 ± 0.07 [c]	8.41 ± 0.06 [b]	33.06 ± 0.96 [a]
Acido ferulico	nd	nd	nd	nd
Acido fertarico	31.63 ± 1.98 [d]	59.00 ± 2.89 [c]	86.65 ± 4.49 [a]	74.41 ± 3.49 [b]
Acido gallico	nd	nd	nd	0.06 ± 0.00
Flavonoli				
Quercetina	0.06 ± 0.06 [a]	0.05 ± 0.00 [a]	0.06 ± 0.00 [a]	0.05 ± 0.00 [a]
Quercetina-*O*-esoside	0.72 ± 0.18 [c]	4.89 ± 0.37 [b]	12.86 ± 0.09 [a]	12.33 ± 0.46 [b]
Quercetina-3-*O*-glucuronide	1.59 ± 0.20 [d]	8.99 ± 0.75 [c]	32.51 ± 0.60 [a]	23.54 ± 0.69 [b]
Rutina	0.17 ± 0.04 [c]	0.61 ± 0.05 [b]	0.83 ± 0.03 [a]	0.86 ± 0.03 [a]
Isoramnetina	nd	nd	nd	nd
Campferolo	nd	nd	nd	nd
Campferolo-3-*O*-glucoside	0.34 ± 0.01 [c]	1.03 ± 0.04 [b]	2.64 ± 0.05 [a]	2.43 ± 0.14 [a]
Miricetina	0.05 ± 0.00 [a]	0.05 ± 0.00 [a]	0.05 ± 0.00 [a]	0.04 ± 0.02 [a]
Miricetina-esoside	nd	nd	nd	nd
Piceatannolo	nd	nd	nd	nd
Flavan-3-oli				
(+)-Catechina	0.10 ± 0.03 [d]	17.96 ± 0.12 [c]	80.20 ± 1.18 [b]	156.31±1.29 [a]
(-)-Epicatechina	nd	0.49 ± 0.09 [c]	7.35 ± 0.18 [b]	17.21 ± 0.42 [a]
Epicatechina-*O*-gallato	nd	nd	0.12 ± 0.01 [a]	0.15 ± 0.01 [a]
Procianidine				
Procianidina B 1	nd	3.04 ± 0.05 [c]	9.22 ± 0.08 [b]	10.30 ± 0.15 [a]
Procianidina B2	0.19 ± 0.05 [d]	6.79 ± 0.05 [c]	9.22 ± 0.08 [b]	17.71 ± 0.15 [a]
Stilbeni				
Resveratrolo	0.00 ± 0.00 [a]	0.00 ± 0.00 [a]	0.00 ± 0.00 [a]	0.01 ± 0.00 [a]
GSH (forma libera. legata e ossidata)				
Glutatione	nd	nd	nd	nd
Acido-2-S-glutationilcaftarico	1.97 ± 0.16 [c]	6.23 ± 0.81 [b]	7.48 ± 0.92 [a]	6.39 ± 0.75 [b]
Glutatione GSSG	1.08 ± 0.06 [ab]	1.03 ± 0.05 [b]	1.18 ± 0.08 [a]	1.14 ± 0.09 [ab]
Totale	35.2	115.9	286.7	482.7

I valori sono espressi come media ± la deviazione standard. Lettere diverse indicano valori significativamente differenti (a,b,c,d); nd, non rilevati.

La composizione fenolica del succo **UIS17PCL** rispecchiava quella precedentemente evidenziata nel succo **UIS15PAL** (Tab.15).

Tabella 15. Profilo fenolico del succo **UIS15PAL** ad inizio e fine estrazione

Composti	2 h	72 h	UIS15PAL
	Concentrazione (mg/L di succo)		
Acid fenolici			
Acido caffeico	0.06 ± 0.01 [a]	0.43 ± 0.16 [b]	nd
Acido caftarico	50.0 ± 6.6 [c]	27.5 ± 1.7 [a]	37.08 ± 16.66 [b]
Acido cumarico	0.03 ± 0.00	nd	nd
Acido cutarico	15.9 ± 1.8 [b]	9.4 ± 0.1 [a]	9.41 ± 0.13 [a]
Acido ferulico	1.7 ± 0.4 [b]	0.14 ± 0.00 [a]	0.14 ± 0.00 [a]
Acido fertarico	16.8 ± 3.1 [a]	30.1 ± 3.3 [b]	30.06 ± 0.13 [b]
Acido gallico	0.05 ± 0.01 [a]	9.4 ± 2.1 [b]	12.32 ± 5.22 [b]
Flavonoli			
Quercetina	0.07 ± 0.00 [a]	0.29 ± 0.01 [b]	0.29 ± 0.01 [b]
Quercetina-*O*-esoside	0.13 ± 0.02 [a]	19.8 ± 0.8 [b]	19.8 ± 0.14 [b]
Quercetina-3-*O*-glucuronide	0.38 ± 0.07 [a]	27.0 ± 1.2 [b]	27.04 ± 1.17 [b]
Rutina	0.17 ± 0.04 [a]	0.40 ± 0.03 [b]	0.40 ± 0.03 [a]
Isoramnetina	0.04 ± 0.00 [a]	nd	nd
Campferolo	0.02 ± 0.00 [a]	nd	nd
Campferolo-3-*O*-glucoside	nd	0.03 ± 0.00 [b]	nd
Miricetina	nd	nd	0.04 ± 0.02 [a]
Miricetina-esoside	nd	nd	nd
Piceatannolo	nd	nd	nd
Flavan-3-oli			
(+)-Catechina	0.24 ± 0.02 [a]	39.5 ± 1.6 [b]	39.53 ± 1.61 [b]
(-)-Epicatechina	6.3 ± 0.2 [a]	38.4 ± 0.1 [b]	38.43 ± 1.31 [b]
Epicatechina-*O*-gallato	nd	nd	nd
Procianidine			
Procianidina B 1	0.81 ± 0.11 [a]	23.9 ± 0.9 [b]	23.9 ± 0.9 [b]
Procianidina B2	0.15 ± 0.00 [a]	2.0 ± 0.1 [b]	2.0 ± 0.1 [b]
Stilbeni			
Resveratrolo	0.01 ± 0.00 [a]	0.00 ± 0.00 [a]	0.01 ± 0.00 [a]
Totale	92.86	228.29	241.12

I valori sono espressi come media ± la deviazione standard. Lettere diverse indicano valori significativamente diversi [(a,b,c)]

Anche per l'estrazione del succo **UIS15PAL** i composti fenolici maggiormente presenti facevano parte delle classi degli acidi fenolici e dei flavan-3-oli. Ad inizio estrazione l'acido caftarico, l'acido cutarico e l' acido fertarico erano gli acidi fenolici più concentrati nel succo. Durante l'estrazione si è osservato un decremento significativo di tali composti.

L'estratto liquido **UIS15PAL** era caratterizzato da acido caftarico, acido fertarico, acido cutarico, acido gallico, quercetina nelle sue forme legate, (+)-catechina ed (-)-epicatechina e dalle procianidine B1 e B2.

La composizione fenolica dei succhi provenienti da uve immature Sangiovese rispecchiava quella caratterizzata da altri Autori (Mattivi, Guzzon, Vrhosek, Stefanini e Velasco, 2006). Tali Autori determinarono la composizione in flavonoidi e antociani di 91 cultivar (*Vitis vinifera*) diverse ed in ognuna di esse osservarono che la dinamica dell'estrazione dei composti fenolici era influenzata dalla localizzazione dei composti fenolici stessi nelle diverse parti della bacca. Gli Autori conclusero che gli acidi fenolici ed i flavonoli erano le classi fenoliche maggiormente concentrate nella polpa dell'uva e più facilmente estraibili e che i flavan-3-oli e le procianidine erano invece concentrate principalmente nelle parti solide (vinaccioli e buccia) delle bacche, richiedendo un tempo di estrazione più prolungato (Mattivi et al., 2006).

Se per il **PA**, la variazione della componente fenolica tra il succo a fine estrazione e l'estratto liquido finale **UIS15PAL** non era significativamente rilevabile, nel **PC**, l'estratto liquido **UIS17PCL** mostrava delle differenze significative rispetto al succo a fine delle 96 ore. Queste variazioni erano imputabili alle trasformazioni post-estrazione a cui il succo è stato sottoposto.

Dopo la fase di estrazione, la vinaccia fresca è stata pressata per aumentare l'estrazione dei composti bioattivi dalla buccia dell'uva. L'operazione di pressatura è avvenuta mediante una pressa pneumatica attraverso 3 rotazioni per ogni ciclo di pressatura. In totale sono stati effettuati 5 cicli di pressatura da 0.1 – 0.3 – 0.9 – 1.5 e 1.8 bar. Successivamente alla pressatura, il succo è stato decantato per 48 ore a 6°C

ed infine filtrato con un filtro in acciaio (Ø 1 mm). Immediatamente dopo ogni operazione, sono stati prelevati campioni di succo per valutarne la composizione (Tab.16).

Dopo la pressatura, il contenuto dei fenoli totali (PFT) è aumentato significativamente dal 1990 a 2790 mg/L e l'attività antiossidante da 4738 a 8103 µmol TEAC/L. Il contenuto dei PFT, l'attività antiossidante e gli antociani totali erano stabili dopo la decantazione mentre l'intensità del colore diminuiva e la tonalità del colore aumentava. Una significativa riduzione del contenuto dei PFT è stata osservata dopo la filtrazione mentre l'attività antiossidante era stabile fino alla fine del processo.

Tabella 16. Parametri del succo **UIS17PCL** nelle fasi post-estrazione.

Parametri UIS17PCL	Post-pressatura	Post-decantazione	Post-filtrazione
PFT (mg/L)	2.79 ± 0.07	2.82 ± 0.03	2.52 ± 0.04
Attività Antiossidante (µmol/L)	8103 ± 792.9	8130 ± 225.2	8277 ± 731.5
Intensità colorante	0.91 ± 0.00	0.89 ± 0.00	0.77 ± 0.00
Tonalità colorante	0.75 ± 0.00	0.83 ± 0.00	0.73 ± 0.00
Antociani totali (mg/L)	142.30 ± 16.81	129.36 ± 3.54	132.88 ± 3.94

I dati sono riportati come media ± la deviazione standard.

Così come per le **UIS17**, anche nel succo in fase di estrazione e sull'estratto liquido finale è stato monitorato il profilo delle vitamine idrosolubili (Fig.34).

Nel succo sono state rilevate 4 vitamine idrosolubili: acido pantotenico (vitamina B5), colina (vitamina J), niacina (vitamina B3) e priridossina (vitamina B6). Al primo campionamento, l'acido pantotenico, la colina, la niacina e la piridossina erano già presenti nel succo. Durante l'estrazione solido-liquido, le vitamine B5 e J

risultavano più abbondanti rispetto alle vitamine B3 e B6. Il contenuto di acido pantotenico e colina aumentava significativamente mentre il contenuto di niacina e piridossina era stabile. L'acido ascorbico (vitamina C), la tiamina (vitamina B1) e la riboflavina (vitamina B2) non erano rilevabili nel succo indicando che la bassa temperatura e l'aggiunta di ghiaccio secco non permettevano di preservare queste vitamine facilmente degradabili una volta estratte nel succo.

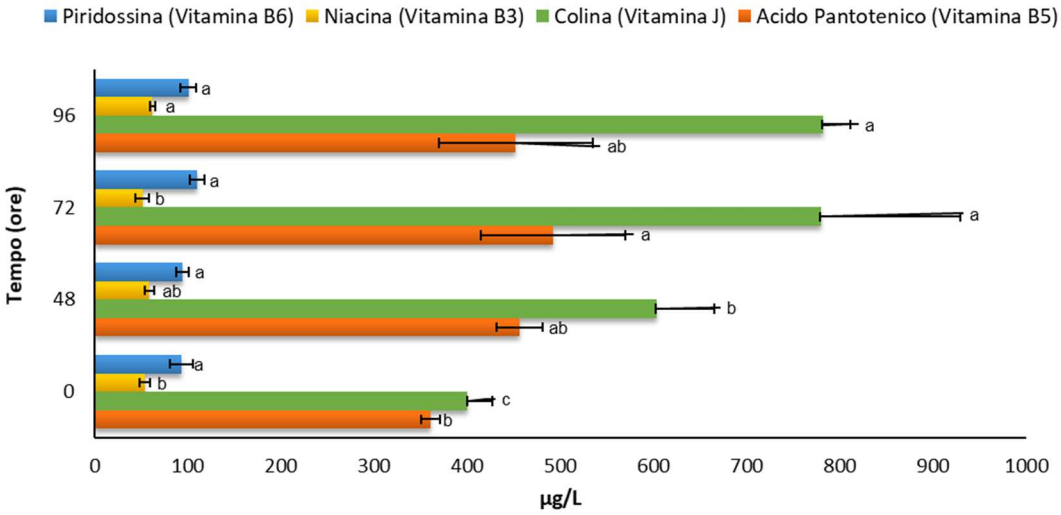


Figura 34 . Profilo delle vitamine idrosolubili durante la produzione dell'estratto **UIS17PCL**. I valori sono riportati come la media ± la deviazione standard. Le barre rappresentano l'errore standard. Lettere differenti indicano valori significativamente differenti [(a,b,c)] .

5.2.1.2 Caratteristiche degli estratti a fine lavorazione

I parametri analitici degli estratti liquidi a fine della lavorazione sono mostrati nella Tabella 17.

Tabella 17. Parametri di base, attività antiossidante e PFT degli **UIS15PAL** e **UIS17PCL.**

	Acidità totale (g/L)	pH	Zucchero (g/L)	DPPH (µmol/L)	PFT (mg/L)
UIS15PAL	11.09 ± 0.01	2.97 ± 0.01	153.1 ± 12	5345.8 ± 119.3	1214.6 ± 37.8
UIS17PCL	6.03 ± 0.05	3.05 ± 0.01	143.3 ± 8.2	8277.2 ± 5.9	2520.2 ± 4.3

I dati sono riportati come media ± la deviazione standard.

Tali valori di pH, acidità e contenuto zuccherino sono compatibili con le caratteristiche di uve immature, raccolte all'invaiatura. Le uve immature sono infatti caratterizzate da valori di acidità elevati e pH più bassi. Mulero et al. (2010) studiarono le caratteristiche di uve (cv Monastrell), raccolte nell'ultimo mese di sviluppo della bacca (Agosto-Settembre), osservando dati paragonabili a quelli riscontrati per le **UIS17**. Altri Autori hanno utilizzato delle uve immature, provenienti da zone diverse della Turchia, per la produzione su scala di laboratorio di un succo acido denominato "agresto" (Oncul & Karabiyikli, 2015). Tali Autori analizzarono i parametri di base delle uve e osservarono valori di pH tra 2.14 e 2.74, dati correlati con i valori di acidità titolabile che variava da 3.33 a 7.09 (%).
Mulero et al. (2010) studiarono anche parametri dei vini ottenuti dalle uve (cv Monastrell) e osservarono valori di attività antiossidante pari ad un valore medio di 6.5 mM Trolox/ml ed un contenuto di PFT medio pari a 527.3 mg/l, valore inferiore a quanto determinato negli estratti provenienti dalle uve immature Sangiovese.

5.2.2 Caratterizzazione di estratti liquidi proveniente da uve immature Merlot e Viognier

Nell'annata 2016, presso l'Azienda "La Torre", mediante il processo di produzione industriale B, sono stati prodotti due estratti liquidi a partire da uve immature Merlot e Viognier, **UIM16PBL** e **UIV16PBL**. Alla fine della lavorazione, il succo è stato svinato, decantato, filtrato e sottoposto ad un processo di ultrafiltrazione allo scopo di eliminare gli zuccheri.
I parametri analitici di **UIM16PBL** e **UIV16PBL** sono riportati nella Tabella 18.

Tabella 18. Analisi di base, polifenoli totali (PFT) e attività antiossidante (DPPH) negli estratti **UIM16PBL** e **UIV16PBL**.

	Acidità totale (g/L)	pH	Acidità volatile (g/L)	Zucchero (g/L)	DPPH (µmol/L)	PFT (mg/L)
UIM16PBL	3.11 ± 0.01	3.34 ± 0.01	0.44 ± 0.02	< 1	3094.7 ± 267.9	752.4 ± 42.1
UIV16PBL	2.60 ± 0.05	3.61 ± 0.01	0.65 ± 0.02	< 1	1112.2 ± 5.9	345.9 ± 14.4

I dati sono riportati come la media ± la deviazione standard.

A differenza dei valori dei parametri analitici determinati negli estratti liquidi **UIS15PAL** e **UIS17PCL**, coerenti alle caratteristiche delle uve immature di provenienza, i risultati delle analisi mostrate nella Tabella 18, mostrano un acidità titolabile molto bassa ed un pH più alto.
Tali caratteristiche potrebbero essere imputate al processo di de-zuccheraggio. L'ultrafiltrazione si basa sull'applicazione di una differenza di pressione a monte e a valle del mezzo filtrante per ottenere il passaggio del liquido da trattare. La pressione transmembrana è associata alla perdita di carico che subisce il fluido attraversante la membrana: tanto più le dimensioni dei pori della membrana sono ridotte, tanto più sarà elevata la perdita di carico da superare.
L'estratto liquido Merlot e Viognier sono stati inviati ad una membrana, costituente il mezzo filtrante (2500 Dalton); gli estratti liquidi sono passati attraverso la

membrana e sono stati raccolti a valle con il nome di filtrato o permeato (estratto liquido senza zucchero). I solidi sospesi sono trattenuti sulla superficie della membrana e costituiscono il retentato. E' probabile che il retentato fosse ricco oltre che di zuccheri, anche di acidi inorganici e composti fenolici. L'utilizzo dell'ultrafiltrazione è molto diffuso in diversi settori industriali tra cui anche il settore alimentare. E' utilizzata per eliminare batteri, virus e proteine del latte ad esempio. Nel settore enologico l'ultrafiltrazione è stata utilizzata per la stabilizzazione microbica (Catarruzza, Peri, Rossi, 1987) o più recentemente per diminuire il grado alcolico dei vini (Catarino & Mendes, 2011).
Cataruzza et al. (1987) con l'applicazione dell'ultrafiltrazione apportarono ad un vino rosso una diminuzione del 20% del contenuto i polifenoli rispetto al valore precedente al trattamento.

Riassumendo nelle annate 2015, 2016 e 2017, attraverso dei processi industriali **PA**, **PB** e **PC** sono stati prodotti degli estratti liquidi a partire da uve immature Sangiovese, Merlot e Viognier (**UIS15PAL**, **UIM16PBL**, **UIV16PBL** e **UIS17PCL**). Nonostante le differenze del processo di produzione a cui le uve sono state sottoposte, tutti gli estratti liquidi ottenuti erano caratterizzati da composti bioattivi a carattere antiossidante. Le caratteristiche dei polifenoli totali (PFT) e dell'attività antiossidante (DPPH) dei 4 estratti liquidi sono mostrate nella Tabella 19.

Tabella 19. Contenuto di polifenoli totali (PFT) e attività antiossidante (DPPH) dei 4 estratti liquidi

	UIS15PAL	UIM16PBL	UIV16PBL	UIS17PCL
DPPH (µmol/L)	5345.8 ± 119.3	3094.7 ± 267.9	1112.2 ± 5.9	8277.1 ± 731.5
PFT (mg/L)	1214.6 ± 37.8	752.4 ± 42.1	345.9 ± 14.4	2520.2 ± 4.3

I dati sono espressi come media ± la deviazione standard.

Pochi sono i lavori disponibili in letteratura che trattano delle caratterizzazione chimica di estratti liquidi proveniente da uve immature.

Uno degli usi più antichi e comuni delle uve immature è stato quello di trasformarle in un succo d'uva a carattere acido, denominato "agresto". Oncul & Karabiykly (2015) hanno studiato le proprietà chimico/fisiche e l'attività antiossidante di due prodotti derivanti uve immature provenienti da zone diverse della Turchia. Gli Autori hanno prodotto su scala di laboratorio due tipologie di succo d'uva ed hanno osservato valori medi di pH pari a 2.41, 0.97 di attività dell'acqua, 3.83% di acidità titolabile, 6.72 g/L di zuccheri e un contenuto in polifenoli totale pari a 473.96 mg/L. L'attività antiossidante era stata misurata mediante metodi FRAP e ABTS test; valori medi di 0.010 – 0.231 – 0.035 – 0.885 µmol TE/L sono stati osservati. Oncul & Karabiykly (2015) evidenziarono variazioni nei risultati in funzione della fase di maturazione delle uve, alla qualità delle uve, al genotipo e alle condizioni ambientali. Kontoudakis et al. (2011) hanno utilizzato uve da diradamento, cv. Grenache, per la produzione di un vino finale a basso contenuto di alcol e con un pH acido.

Tinello & Lante (2017) hanno studiato l'attività antiossidante e antiossidasica di uve immature (cv. Barbera e Merlot) provenienti da operazioni da diradamento. Nell'estratto liquido sono stati studiati la capacità inibitoria dell'attività enzimatica di un tirosinasi commerciale (TYR), l'effetto sbiancante e la capacità antiossidante tramite test del DPPH, a confronto con il composto di riferimento per l'azione anti-imbrunimento ed il contenuto di acido ascorbico. I risultati dello studio hanno

evidenziato che l'estratto ottenuto dalla uve da diradamento esplicava non solo un'azione antiossidasica ma anche buone proprietà antiossidanti e di sbiancamento. E' stato rilevato un effetto della cultivar sulla capacità antiossidasica. L'estratto ottenuto da uve immature Merlot mostrava infatti un'attività anti-imbrunimento maggiore rispetto a quella misurata nell'estratto ottenuto da uve immature Barbera (Tinello & Lante, 2017).

Tinello et al. (2018) hanno utilizzato un estratto liquido ottenuto da uve diradate (cv. Merlot) per prevenire i meccanismi di ossidazione nella produzione di rondelle (*chips*) di mela (Malus domestica cv. Golden Delicius). L'azione dell'estratto da uve immature era stata confrontata con l'azione antiossidante dell'acido ascorbico, del metabisolfito di potassio e acido citrico. Gli Autori studiarono il profilo fenolico delle *chips* di mela trattate con i diversi additivi e osservarono che l'incremento maggiore, rispetto al controllo, si era riscontrato nei campioni trattati con l'estratto da uve immature.

Dupas de Matos et al. (2019) hanno utilizzato un succo d'uva proveniente da uve immature cv. Chardonnay e Sauvignon, come agente acidificante per la preparazione su scala industriale di cetrioli sott'aceto. Gli Autori osservarono che il pH dei cetrioli sott'aceto trattati con il succo d'uva acerba mostravano un pH significativamente più basso, rispetto al campione non trattato. Tali risultati erano in linea con la concentrazione degli acidi organici presenti nei campioni, le concentrazioni di acido malico e tartarico erano significativamente più alte nei campioni trattati con il succo d'uva acerba. Tali risultati erano dovuti all'elevata quantità di acido malico e tartarico presente nelle uve acerbe (Iland, Dry, Proffitt e Tyerman, 2011).

5.3 CARATTERIZZAZIONE CHIMCA E FISICA DEGLI ESTRATTI SECCHI

Gli estratti secchi Merlot (**UIM16PBEL**), Viognier (**UIM16PBEL**) e Sangiovese (**UIS15PAEA**), ottenuti rispettivamente con i processi di produzione **PB** e **PA**, sono stati caratterizzati dal punto di vista chimico e fisico. Per le analisi si base, il contenuto in polifenoli totali e l'attività antiossidante, 1 g di ciascun estratto è stato sciolto in acqua ottenendo una soluzione al 10%. I risultati delle analisi del pH, acidità totale, zuccheri, polifenoli totali e attività antiossidante sono mostrati nella Tabella 20.

Tabella 20. pH, acidità totale, zuccheri, polifenoli totali e attività antiossidante degli estratti secchi Merlot, Viognier e Sangiovese

Campioni	pH	Acidità totale (mg/g)	Zuccheri (mg/g)	Polifenoli totali (mg/g)	Attività antiossidante (µmol TEAC/g)
UIS15PAEA	3.68 ± 0.01	26.1 ± 0.4	1530 ± 95	5.09 ± 0.14	24.4 ± 0.51
UIM16PBEL	3.21 ± 0.02	76.2 ± 2.6	< 1	20.4 ± 0.94	33.8 ± 1.82
UIV16PBEL	4.53 ± 0.15	29.3 ± 0.1	< 1	12.9 ± 0.08	16.0 ± 0.32

I dati sono riportati come la media ± la deviazione standard.

Gli estratti **UIM16PBEL** e **UIV16PBEL** mostravano un pH inferiore ed una concentrazioni di acidi titolabili maggiore rispetto all'estratto **UIS15PAEA**. Anche il contenuto in polifenoli totali degli estratti **UIM16PBEL** e **UIV16PBEL** era maggiore rispetto a quello misurato nell'estratto **UIS15PAEA**. L'attività antiossidante dell'estratto **UIS15PAEA** risultava superiore rispetto a quella determinata nell'estratto **UIV16PBEL** ed inferiore a quella relativa al campione **UIM16PBEL**. Tali differenze sono probabilmente imputabili alla specifica

composizione fenolica di ciascun estratto, ma anche al tipo di essiccamento a cui l'estratto liquido è stato sottoposto; il Merlot ed Il Viognier sono stati infatti sottoposti ad un processo di liofilizzazione con l'aggiunta di gomma arabica al 2%, mentre il Sangiovese è stato atomizzato con il 16% di gomma arabica.
Kuck & Noreña (2015) hanno studiato le caratteristiche chimico/fisiche di estratti secchi ottenuti dalla buccia di uve a bacca rossa, cultivar Bardo (*Vitis lambrusca*). Nello studio, gli Autori hanno confrontato le caratteristiche di estratti ottenuti attraverso liofilizzazione e atomizzazione utilizzando come agenti incapsulanti gomma arabica, polidestrine e gomma di guar a diverse combinazioni.
Il contenuto in polifenoli totali di un estratto liofilizzato con l'aggiunta di gomma arabica al 10% e di un estratto atomizzato con il 10% di gomma arabica aggiunta era rispettivamente pari a 22.61 mg/g e 25.06 mg/g. Tali risultati sono confrontabili con quelli ottenuti per l'estratto **UIM16PBEL** il cui contenuto in PFT era pari a 20.4 mg/g. L'attività antiossidante osservata da Kuck & Noreña (2015) sugli stessi estratti era rispettivamente pari a 58.20 µmol/g e 60.13 µmol/g, valore superiore rispetto a quelli riscontrati negli estratti da noi prodotti.

Anche nel loro lavoro, Kuck & Noreña (2015) osservarono una perdita significativa nel contenuto fenolico totale degli estratti secchi rispetto all'estratto liquido originale. Tali perdite potrebbero essere imputate al processo di essiccamento. Durante il processo di atomizzazione, l'esposizione alle elevate temperature e all'ossigeno potrebbe indurre reazioni di degradazione delle componenti fenoliche causandone una notevole perdita. La liofilizzazione prevede tre fasi principali: un essiccamento primario o sublimazione sottovuoto, un essiccamento secondario o evaporazione sotto vuoto e la rottura del vuoto, attraverso le quali l'estratto liquido viene ridotto in polvere. Durante questi passaggi possono verificarsi reazioni di degradazione dovute principalmente ai processi fisici dove viene indotto il passaggio di stato dell'estratto liquido (Kuck & Noreña, 2015). van Golde, van der Westelaken, Bouma e van de Wiel (2004) utilizzando un processo di essiccamento per ottenere

vini liofilizzati, osservarono una perdita del contenuto fenolico inziale pari al 70%. Nel caso del processo di atomizzazione, le microparticelle formatosi vanno in contro ad una rapida evaporazione dell'acqua, dovuta alle elevate temperature, provocando un rilascio delle componenti bioattive destinate all'incapsulamento e conseguentemente una loro perdita (Ramírez, Giraldo e Orrego, 2015).

I profili fenolici degli estratti secchi ottenuti da uve immature Merlot, Viognier e Sangiovese sono mostrati nella Figura 35. In tutti i campioni, gli acidi fenolici erano più concentrati rispetto alle altre classi fenoliche, in particolare gli estratti erano ricchi in acido ferulico, acido cutarico , acido fertarico e acido caftarico. L'estratto **UIS15PAEA** era più ricco in (-)-epicatechina, (+)-catechina e in procianidina B2 rispetto ai campioni **UIM16PBEL** e **UIV16PBEL** (Fig.35A). Per la classe dei flavonoli, la quercetina-3-*O*-glucuronide e la quercetina-3-*O*-esoside erano maggiormente presenti nel campione **UIS15PAEA**; l'estratto **UIV16PBEL** era più ricco in quercetina e in quercetina-3-*O*-esoside rispetto al campione **UIM16PBEL,** il quale mostrava una concentrazione di quercetina-3-*O*-glucuronide maggiore rispetto al **UIV16PBEL**. L'estratto **UIM16PBEL** era il più ricco in resveratrolo (Fig.35B).

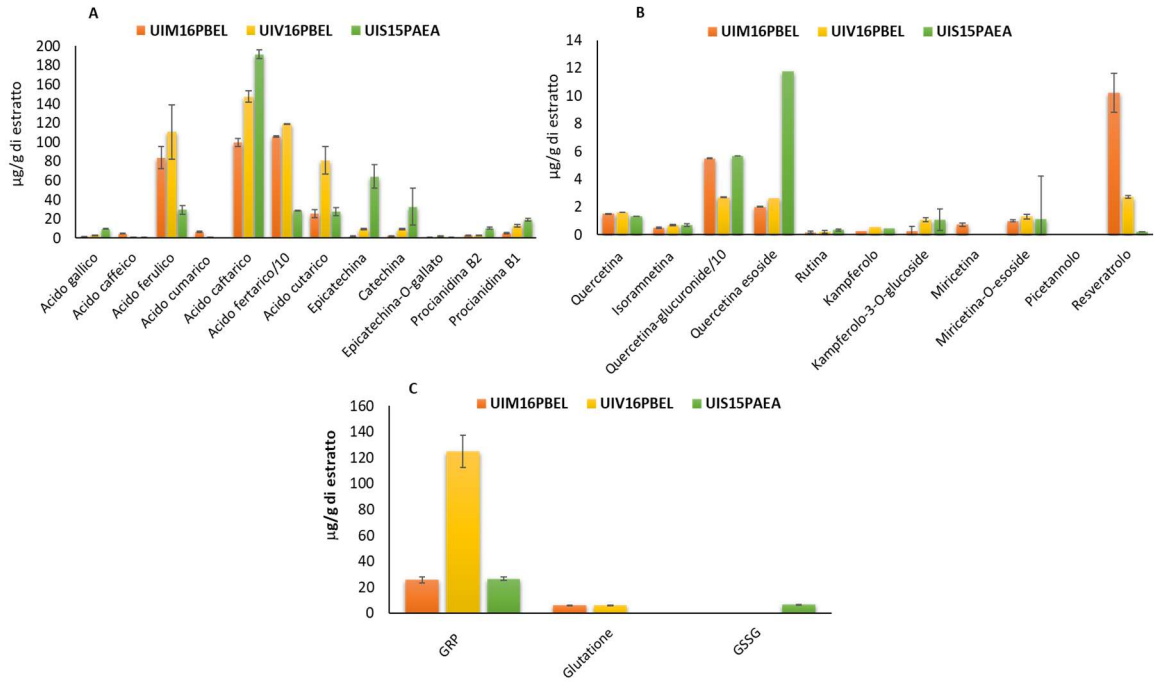


Figura 35. Profilo degli acidi fenolici, flavanoli e procianidine (A), flavonoli e stilbeni (B) e glutatione (C) degli estratti **UIM16PBEL**, **UIV16PBEL** e **UIS15PAEA**. Le barre rappresentano la deviazione standard.

Negli estratti era presente il glutatione sia sotto forma libera (GSH) che di acido 2-S-glutationil caftarico (GRP). Gli estratti secchi Merlot e Viognier mostravano una maggior concentrazione di glutatione libero rispetto all'estratto secco Sangiovese (Fig.35C).

L'estratto secco **UIM16PBEL** è stato sottoposto anche ad una caratterizzazione fisica che ha consentito di determinare i seguenti parametri: solubilità, umidità, attività dell'acqua a 25°C e igroscopicità. La solubilità dell'estratto era pari a 88.1 ± 1.2%. Kuck & Noreña (2016) hanno osservato valori di solubilità tra 86% e 88% in estratti fenolici ottenuti da buccia di uva, liofilizzati con gomma arabica, gomma di guar parzialmente idrolizzatae polidestrine come supporto. Il contenuto di umidità a 25°C era pari a 8.1 ± 0.3% e l'attività dell'acqua si attestava a 38.7 ± 0.1%. Kuck & Noreña (2016) hanno osservato valori di umidità simili in estratti secchi, sia liofilizzati che atomizzati, ottenuti dalla buccia di cultivar a bacca rossa (cv. Bordo, *Vitis lambrusca*). Gli Autori determinarono infatti un contenuto di umidità dal 7.65% all' 8.06%, rispettivamente nell'estratto liofilizzato con il 5% di gomma arabica e nell'estratto atomizzato con l'aggiunta del 10% di gomma arabica.
I dati di solubilità, umidità ed attività dell'acqua a 25°C ottenuti nel nostro studio, indicano una stabilità dell'estratto **UIM16PBEL** nei confronti delle reazioni di degradazione enzimatiche e non-enzimatiche.

L' isoterma di adsorbimento dell'estratto secco a 25°C è mostrata nella Figura 36.

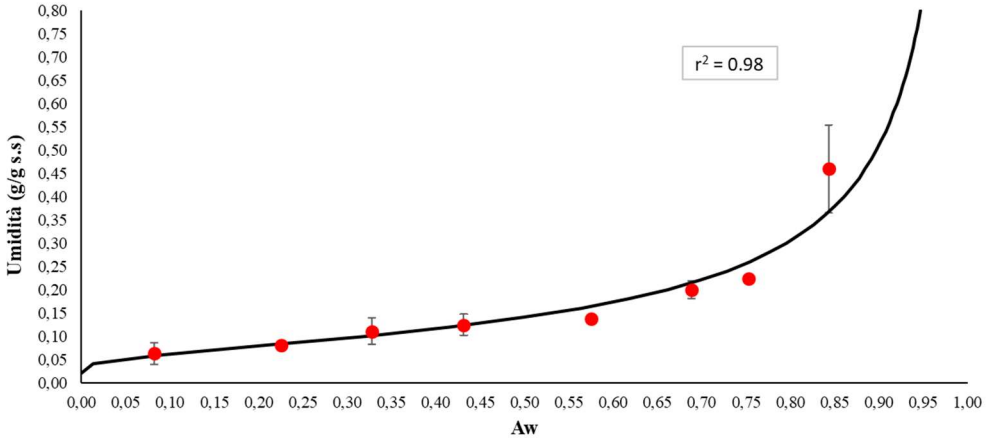


Figura 36. Isoterma di adsorbimento dell'estratto secco a 25°C; dati sperimentali (●); modello di Halsey (-).

L'isoterma di adsorbimento è stata ottenuta seguendo il modello di Halsey (Xiong, Narasimhan & Okos, 1992) :

$$\boldsymbol{A_w = exp\left(-\frac{B}{n_s{}^A}\right)} \qquad (r^2 = 0.98)$$

dove:

Aw = attività dell'acqua

n_s (g acqua/g peso secco), A = 0.039 and B = 1.461.

L'estratto mostrava un comportamento simile all'isoterma di adsorbimento di una soluzione acquosa salina o di zuccheri semplici (Iglesias & Chirife, 1982). Dal grafico è possibile osservare che l'estratto mostrava un basso comportamento igroscopico fino al raggiungimento del volare di Aw pari a 0.80, mentre da Aw = 0.85 sembra essere molto igroscopico (Fig.36). Questo significa che, durante la conservazione, l'estratto deve essere ben protetto dall'ambiente allo scopo di evitare adsorbimento di acqua e conseguentemente un rapido incremento dell'attività dell'acqua che porterebbe ad un elevato rischio di degradazione chimica e biologica dell'estratto stesso.

Al fine di utilizzare gli estratti secchi come ingredienti ad elevato valore aggiunto per la funzionalizzazione di diverse matrici vegetali e per preservare la stabilità e le caratteristiche organolettiche dei vini, è stata valutata la loro stabilità nel tempo.
La conservazione di tutti gli estratti essiccati ottenuti nelle diverse annate è avvenuta al riparo dalla luce e fonti di calore, a temperatura ambiente, in un essiccatore contenente silice. Durante la conservazione, la stabilità degli estratti è stata valutata in termini di polifenoli totali e attività antiossidante. Il contenuto fenolico totale e l'attività antiossidante degli estratti **UIS15PAEA**, **UIM16PBEL**, **UIV16PBEL** sono stati valutati per 9 mesi (Tab.21).

Tabella 21. Contenuto in polifenoli totali (PFT) e attività antiossidante degli estratti **UIS15PAEA**, **UIM16PBEL**, **UIV16PBEL** ad inizio (t0) e fine (t9) delle prove di conservabilità.

	UIS15PAEA		UIM16PBEL		UIV16PBEL	
	t_0	t_9	t_0	t_9	t_0	t_9
PFT (mg/g)	5.09 ± 0.14	5.01 ± 0.41	20.40 ± 0.94	20.38 ± 0.31	12.94 ± 0.08	12.77 ± 0.48
DPPH (µmol TEAC/g)	24.41 ± 0.81	13.28 ± 0.11	33.80 ±1.82	33.61 ± 1.24	16.05 ± 0.32	13.97 ± 0.22

I dati sono rappresentati come la media ± la deviazione standard.

I risultati indicano che l'estratto **UIM16PBEL** manteneva il 100% ed il 99.4% del valore inziale della concentrazione fenolica e dell'attività antiossidante, rispettivamente.
Il contenuto in PFT e l'attività antiossidante dell'estratto **UIV16PBEL** dopo i 9 mesi di conservazione erano pari a 12.77 mg/g e 13.97 µmol TEAC/g mantenendo rispettivamente il 98.7% e il 87.04% del valore inziale dei PFT e dell'attività antiossidante.

L’estratto **UIS15PAEA** nel corso della conservazione ha perso il 45.59% dell’attività antiossidante e il 1.57% della concentrazione fenolica rispetto al valore iniziale.

Nelle condizioni precedentemente descritte, al riparo da fonti di calore e di luce, l’estratto secco che mostrava la migliore stabilità e conservabilità era l’**UIM16PBEL**.

5.4 PROTOTIPI ALIMENTI VEGETALI (PAV) : STUDIO DELLE PROPRIETÀ FUNZIONALI E SENSORIALI DEI FENOLI ESTRATTI DA UVA IMMATURA

Le attività inerenti questa parte dello studio sono state condotta nell'ambito del progetto PRIN 2015 – "Individual differences in the acceptability of health foods: focus on phenol and fat content" e riguardano la caratterizzazione di fenoli estratti da uva immatura utilizzati per arricchire in fenoli tre alimenti di origine vegetale. In particolare, nello studio è stato utilizzato l'estratto di uve immature della varietà Merlot (2016) (**UIM16PBEL)** e tre prototipi di alimenti vegetali, purea di barbabietola (**PAVB**), purea di pisellini (**PAVP**) e purea di patate (**PAVPA**), caratterizzati da una diversa composizione in macromolecole e un diverso sapore originale. Lo studio è stato condotto al fine di valutare le caratteristiche chimiche degli alimenti funzionalizzati e l'impatto dei fenoli aggiunti sulle caratteristiche sensoriali dei nuovi prodotti. Le attività sperimentali volte alla caratterizzazione sensoriale dei fenoli e dei prototipi sono state condotte nel laboratorio di analisi sensoriale "Sensorylab" dell'Università di Firenze.

5.4.1 Fenoli da uve immature in soluzione acquosa

5.4.1.1 Caratterizzazione chimica e sensoriale

Le caratteristiche dei fenoli di uva immatura Merlot sono stati preliminarmente analizzati in soluzione acquosa. Il contenuto fenolico della soluzione madre era pari a 6.81 ± 0.04 g/L. Soluzioni dall'estratto di **UIM16PBEL** a livelli crescenti di concentrazione fenolica (0.14, 0.21, 0.30, 0.44, 0.59, 1.11, 1.27 e .193 g/L) sono state testate per l'attività antiossidante. La concentrazione fenolica dell'estratto in soluzione influenzava l'attività antiossidante delle soluzioni acquose ($p \leq 0.001$) che aumentava significativamente all'aumentare della concentrazione fenolica mentre le repliche non erano significative ($p < 0.05$). È stata trovata una relazione

positivamente significativa (R^2 = 0.9569) tra il contenuto totale di fenoli e l'attività antiossidante delle soluzioni acquose di **UIM16PBEL**; ogni incremento della concentrazione fenolica delle soluzioni acquose dell'estratto **UIM16** corrispondeva ad un incremento della loro attività (Fig.37). Risultati simili sono stati ottenuti da Paixão, Perestrelo, Marques & Camara, (2007), studiando la relazione tra attività antiossidante e contenuto in fenoli totali di diversi vini rossi. La concentrazione fenolica dei vini rossi studiati variava da 1.7 a 1.8 g/L di acido gallico e gli stessi autori hanno evidenziato una correlazione significativa (R^2 = 0.964) tra il contenuto fenolico totale e la capacità antiossidante dei vini.

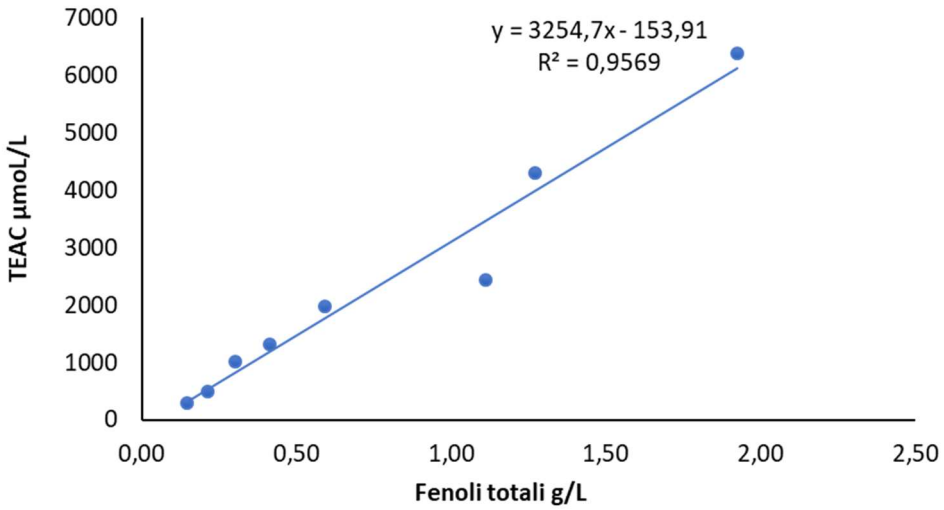


Figura 37. Relazione tra i polifenoli totali e l'attività antiossidante di **UIM16PBEL** in soluzioni acquose. I dati sono riportati come la media ± la deviazione standard; (n = 3)

L'andamento delle sensazioni target di amaro, acido, salato e astringente in funzione della concentrazione fenolica in soluzione acquosa è mostrato nella Figura 38.

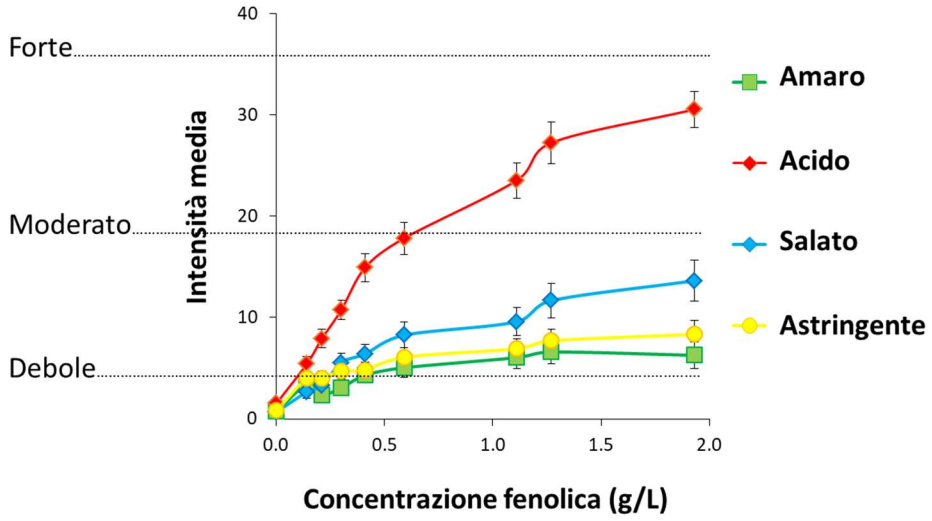


Figura 38. Intensità media delle sensazioni target nelle soluzioni acquose dell'estratto **UIM16**. Le barre rappresentano le deviazioni standard.

I risultati ottenuti indicavano un aumento delle intensità delle sensazioni target in funzione della concentrazione fenolica . Significativi aumenti di intensità sono stati osservati nei campioni con l'aggiunta dell'estratto rispetto al campione senza aggiunte (0.00 g/L) (Tab.22). Secondo i valori F, l'effetto più consistente si osservava per il gusto acido che tendeva ad aumentare all'aumentare della concentrazione fenolica con il campione a concentrazione più alta che presentava un'intensità prossima a forte (Fig.38). Anche il salato aumentava e si stabilizzava ad un'intensità compresa fra "debole" e "moderato" a partire dal campione a concentrazione fenolica pari a 1.11 g/L. L'amaro e l'astringenza, pur risentendo della

concentrazione fenolica, rappresentavano sensazioni marginali percepite ad intensità "debole".

Tabella 22. Anova a 2 vie modello mixed (soggetti fattore random): effetto della concentrazione fenolica sull'intensità delle sensazioni target nelle soluzioni di **UIM16PBEL.** Valori medi di intensità, valori di F e P.

			Concentrazione (g/L)								
	F	**p**	**0.00**	**0.14**	**0.21**	**0.30**	**0.41**	**0.59**	**1.11**	**1.27**	**1.93**
Amaro	13.170	p<0.0001	0.74 f	3.36 de	2.38 e	3.07 de	4.31 cd	5.05 bc	6.05 ab	6.60 a	6.28 ab
Acido	120.140	p<0.0001	1.52 h	5.41 g	7.91 g	10.76 f	14.95 e	17.83 d	23.55 c	27.26 b	30.55 a
Salato	26.244	p<0.0001	0.67 h	2.64 gh	3.26 fg	5.55 ef	6.41 de	8.26 cd	9.59 bc	11.67 ab	13.64 a
Astringente	13.043	p<0.0001	0.81 e	4.00 d	4.05 d	4.71 cd	4.84 cd	6.09 bc	6.93 ab	7.71 ab	8.34 a

Lettere diverse indicano valori significativamente diversi [a,b,c,d,e].

L'estratto **UIM16PBEL** contribuiva ad un significativo aumento dell'intensità del gusto "acido", che passava da una intensità debole nel prodotto al quale non era stato aggiunto estratto, ad una intensità compresa tra moderato e forte nel prodotto con l'aggiunta massima di estratto (1.93 g/L).

In base ai risultati ottenuti, le concentrazioni fenoliche pari a 0.21 – 0.44 – 1.11 – 1.93 g/L sono state scelte per la funzionalizzazione dei prototipi alimenti vegetali (**PAV**) in quanto capaci di generare un aumento significativo delle sensazioni target.

5.4.2 Fenoli da uva immatura in prototipi di alimenti vegetali (PAV)

5.4.2.1 Caratterizzazione chimica

La concentrazione fenolica dei **PAV** prima e dopo l'aggiunta dei fenoli derivanti da **UIM16PBEL** è mostrata nella Figura 39. I **PAV** non funzionalizzati mostravano un contenuto fenolico diverso, il più elevato è stato rilevato nella purea di barbabietola (**PAVB**), seguita dalla purea di pisellini (**PAVP**) ed in fine da quella di patate (**PAVPA**).

Un incremento significativo del contenuto fenolico è stato osservato negli estratti **PAV** ad ogni incremento della quantità di fenoli aggiunti alle puree vegetali.

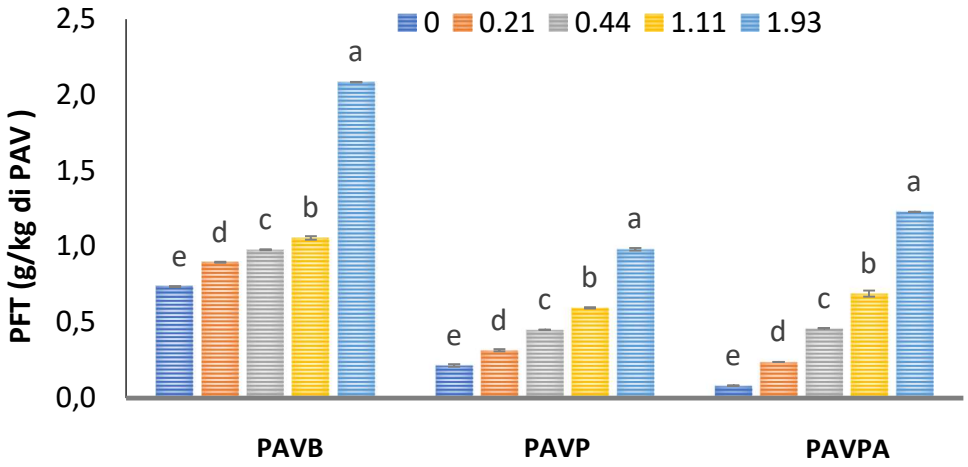


Figura 39. Polifenoli totali (PFT) dosati nei PAV funzionalizzati con dosi crescenti (0.00 – 0.21 – 0.44 – 1.11 – 1.93 g/kg di purea, peso fresco) di fenoli d'uva immatura. Le barre rappresentano le deviazioni standard. Lettere differenti indicano valori significativamente differenti ($p < 0.001$).

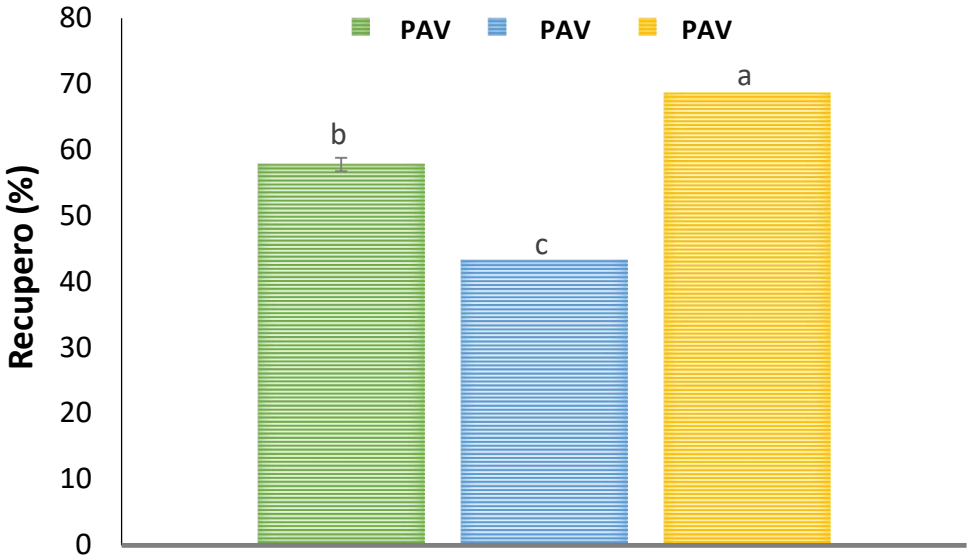


Figura 40. Valori medi di recupero (%) dei fenoli da **PAVB**, **PAVP** e **PAVPA** funzionalizzati con dosi crescenti (0.21 – 0.44 – 1.11 e 1.93 g/kg di purea, peso fresco) di fenoli d'uva immatura. Le barre rappresentano la deviazione standard. Lettere differenti indicano valori significativamente differenti ($p \leq 0.001$).

I fenoli recuperati (recupero %) dai **PAV** funzionalizzati sono stati calcolati come la differenza fra il contenuto in fenoli totali nelle puree funzionalizzate ed il contenuto in fenoli totali nelle puree non funzionalizzate ed espressi come percentuale dei fenoli aggiunti. Il recupero percentuale dei fenoli variava significativamente in funzione del tipo di purea vegetale e della quantità di fenoli d'uva immatura aggiunti. Il valore medio di recupero percentuale dei fenoli dai tre **PAV** è mostrato nella Figura 40. Il valore medio più elevato è stato osservato nella purea di patate (68,7%) mentre quello più basso è stato osservato nella purea di pisellini (43.3%), la purea di barbabietola ha mostrato un recupero intermedio fra gli altri due (57.8%).

I prototipi funzionalizzati con la dose più elevata (1.93 g/kg) di fenoli di **UI** sono stati caratterizzati per il profilo fenolico tramite LC-HRMS. Gli estratti **PAV** contenevano quasi tutti i composti identificati nell'estratto d'uva immatura Merlot

(**UIM16PBEL**) tranne il kampferolo-3-*O*-glucoside, la quercetina-3-*O*-glucoside e l' acido 2-S-glutationil caftarico (Tab.23). Tra gli acidi fenolici, l'acido fertarico era il composto fenolico più abbondante mentre l'acido ferulico non era rilevabile negli estratti **PAV**. La quercetina era il composto maggiormente presente in tutti gli estratti **PAV** all'interno della classe dei flavonoidi, mentre per i flavan-3-oli la (+)-catechina si trovava in concentrazione maggiore rispetto alla (-)-epicatechina. Tra le procianidine, la B2 prevaleva sulla B1 in tutti gli estratti **PAV**. Per quanto riguarda la classe degli stilbeni, gli estratti dei prototipi vegetali mostravano una concentrazione del tran-resveratrolo circa 10 volte inferiore a quella osservata nell'estratto **UIM16PBEL** (Tab.23).

Tabella 23. Profilo fenolico dell'estratto da uva immatura Merlot (**UIM16PBEL**) e dei **PAV** fortificati con la massima concentrazione dell'estratto (1.93 g/kg).

Composti	mg/kg			
	UIM16PBEL	PAVB + UIM16PBEL	PAVB + UIM16PBEL	PAVB + UIM16PBEL
Acidi fenolici				
Acido caffeico	11.0 ± 0.4	1.04 ± 0.07 ^{c}	1.55 ± 0.14 ^{a}	1.28 ± 0.14 ^{b}
Acido caftarico	52.0 ± 2.0	3.44 ± 0.10 ^{a}	3.54 ± 0.28 ^{a}	3.71 ± 0.19 ^{a}
Acido cumarico	19.6 ± 0.6	1.80 ± 0.13 ^{b}	2.30 ± 0.12 ^{a}	1.79 ± 0.14 ^{b}
Acido cutarico	34.3 ± 1.1	2.31 ± 0.17 ^{a}	2.03 ± 0.18 ^{ab}	1.81 ± 0.15 ^{b}
Acido fertarico	704 ± 33	48.7 ± 1.2 ^{a}	35.7 ± 6.5 ^{b}	36.5 ± 4.0 ^{b}
Acido ferulico	4.63 ± 0.59	2.51 ± 0.04 ^{a}	0.44 ± 0.03 ^{b}	nd
Acido gallico	1.63 ± 0.03	0.03 ± 0.01 ^{b}	0.24 ± 0.02 ^{a}	0.05 ± 0.01 ^{b}
Flavonoidi				
Isoramnetina	1.41 ± 0.03	0.05 ± 0.01 ^{b}	0.09 ± 0.01 ^{a}	0.06 ± 0.02 ^{b}
Kampferolo	0.78 ± 0.04	0.06 ± 0.01 ^{a}	0.06 ± 0.01 ^{a}	0.07 ± 0.01 ^{a}
Kampferolo-3-O-glucoside	0.54 ± 0.03	nd	nd	nd
Miricetina	3.79 ± 0.11	0.39 ± 0.03 ^{b}	0.47 ± 0.04 ^{a}	0.45 ± 0.03 ^{ab}
Quercetina	14.0 ± 0.4	1.26 ± 0.11 ^{b}	1.48 ± 0.13 ^{ab}	1.57 ± 0.14 ^{a}
Quercetina-3-O-esoside	1.32 ± 0.08	nd	nd	nd
Flavan-3-oli				
(+)-Catechina	13.6 ± 0.8	1.23 ± 0.07 ^{c}	2.28 ± 0.12 ^{a}	1.51 ± 0.11 ^{b}
(-)-Epicatechina	8.23 ± 0.29	0.70 ± 0.03 ^{c}	1.09 ± 0.08 ^{a}	0.83 ± 0.05 ^{b}
Prociandine				
Procianidina B1	4.55 ± 0.19	0.44 ± 0.04 ^{b}	0.56 ± 0.04 ^{a}	0.47 ± 0.06 ^{ab}
Procianidina B2	9.74 ± 0.37	1.13 ± 0.05 ^{c}	1.66 ± 0.05 ^{a}	1.33 ± 0.07 ^{b}
Stilbeni				
Trans-resveratrolo	31.3 ± 1.6	2.18 ± 0.13 ^{b}	3.33 ± 0.48 ^{a}	2.36 ± 0.36 ^{b}
Acido-2-S-glutationil caftarico	16.8 ± 0.6	nd	nd	nd

I dati sono mostrati come la media di tre repliche ± la deviazione standard.

L'abbondanza relativa di ciascuna classe fenolica dei prototipi vegetali e dell'estratto da uve immature, è stata confrontata e riportata nella Figura 41. La purea di barbabietola mostrava una composizione molto simile a quella dell'estratto **UIM16PBEL** mentre i profili fenolici delle puree di pisellini e di patata mostravano alcune differenze; gli acidi fenolici rappresentavano la classe di fenoli più abbondante nell'estratto di uva immatura (90.3%), percentuale riscontrata elevata anche nella purea di barbabietola (88.9%), mentre nelle puree di pisellini e di patate la percentuale degli acidi fenolici diminuiva a valori di 80.6% e 83.9%, rispettivamente.

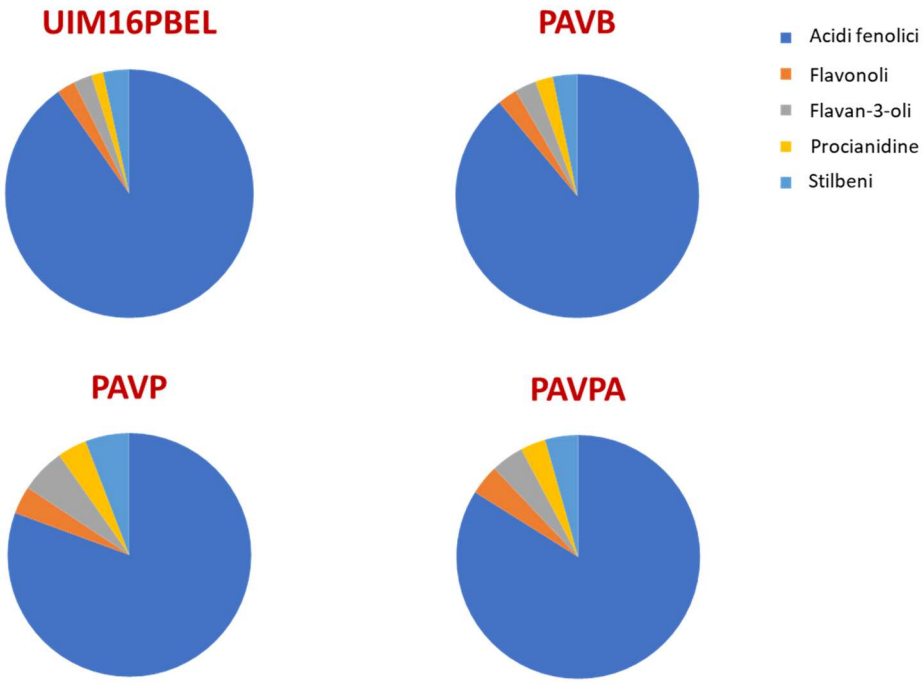


Figura 41 Percentuale di ciascuna classe fenolica identificata negli estratti da **UIM16** e nei **PAV** funzionalizzati con la massima concentrazione di estratto (1.93 g/kg).

L'attività antiossidante valutata sugli estratti **PAV** delle puree funzionalizzate con dosi crescenti (0.00 – 0.21 – 0.44 – 1.11 e 1.93 g/kg) di fenoli d'uva è mostrata nella Figura 42. I campioni **PAVB** e **PAVP** mostravano valori di attività antiossidante simili mentre tale attività era molto bassa nel **PAVPA**. Un incremento significativo dell'attività antiossidante è stato osservato nella purea di barbabietola ad ogni incremento della quantità di fenoli aggiunti. L'incremento di attività antiossidante nella purea di patata è risultato significativo a partire da 0.44 g/kg di fenoli aggiunti mentre non sono state osservate differenze significative fra l'attività antiossidante della purea di pisellini funzionalizzata con 0.44 e 1.11 g/kg di fenoli. A parità di fenoli aggiunti, l'attività antiossidante era significativamente più elevata nel **PAVB** rispetto a quella osservata nei **PAVP** e **PAVPA** (Fig.42).

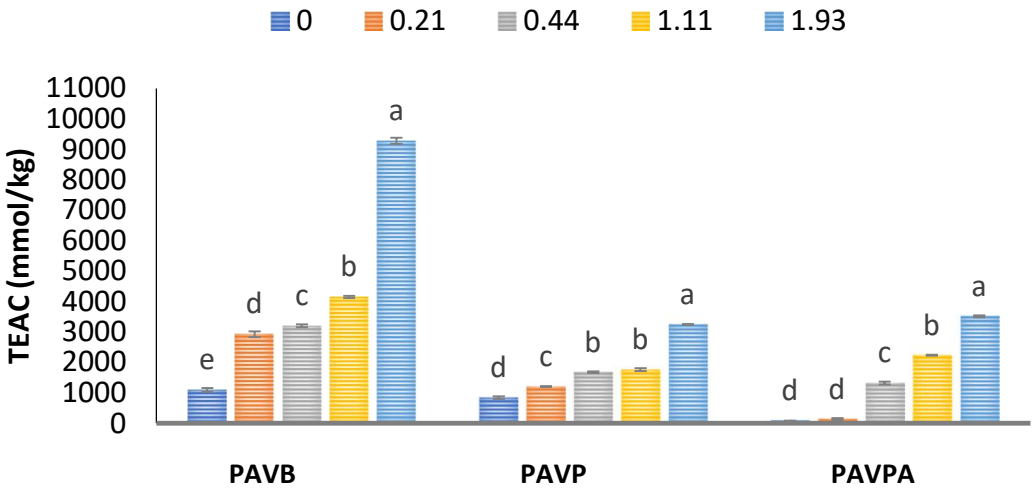


Figura 42. Attività antiossidante dosata negli estratti **UIM16** e dei **PAV** funzionalizzati con dosi crescenti (0.00 – 0.21 – 0.44 – 1.11 – 1.93 g/kg di purea, peso fresco) di fenoli di **UI**. Le barre rappresentano le deviazioni standard. Lettere diverse indicano valori significativamente differenti ($p \leq 0.001$).

Il recupero dei fenoli dai **PAV** è stato significativamente influenzato dalla loro composizione. Dalla figura X emerge chiaramente la differenza nella reattività tra i fenoli delle **UIM16** e le diverse matrici alimentari. La minore quantità di fenoli è stata recuperata dal prototipo **PAVP** ricco di proteine. E' noto infatti che i polifenoli possono interagire con le proteine sia attraverso interazioni reversibili, come legami ad idrogeno, forze di van der Waals e/o legami idrofobici, sia irreversibilmente attraverso legami covalenti. Trombley, Loegel, Danielson & Hagerman (2011) sostenevano che la biodisponibilità e la bioattività dei polifenoli, provenienti da matrici vegetali, come le piante, fossero influenzate dalle interazioni covalenti tra fenoli e proteine. Ozdal, Capanoglu & Altay (2013) sostenevano infatti che le interazioni tra composti fenolici e proteine portavano a dei cambiamenti nelle proprietà strutturali, funzionali e nutrizionali di entrambi i composti. Le interazioni fra proteine e polifenoli sono influenzate da molti fattori tra cui, pH, temperatura, tipologia e concentrazione della proteina, tipo e struttura della molecola fenolica (Ozdal et al., 2013). Altre caratteristiche delle macromolecolequali peso molecolare, metilazione, idrossilazione, glicosilazione e idrogenazione dei composti fenolici, svolgono un ruolo importante nell'interazione fenolo/proteina. Tsai & She (2006) hanno studiato le interazioni fenolo/proteina sulla matrice piselli. Tali Autori hanno osservato che tra la classe degli acidi fenolici, gli acidi idrossicinnamici davano origine a legami fenolo/proteina più stabili rispetto agli acidi idrossibenzoici e che, tra i primi, l'acido cumarico mostrava il legame più forte con le proteine dei piselli. Rawel, Czajka, Rohn & Kroll (2002) hanno evidenziato, conducendo esperimenti in vitro sulle leguminose, che le regioni delle proteine ricche di prolina, rappresentavano i siti preferenziali per le interazioni fenolo vegetale/proteina alimentare.

Le percentuali piuttosto elevate di fenoli **UIM16** recuperate, principalmente in **PAVB** e **PAVPA**, hanno suggerito il verificarsi di interazioni chimiche deboli tra i fenoli dell'uva immatura e i costituenti dei prototipi alimentari. Questi risultati, associati al significativo aumento dell'attività antiossidante rilevata nei prototipi

alimentari funzionalizzati dopo l'aggiunta di fenoli **UIM16**, indicano che la maggior parte della potenziale attività biologica ed estraibilità dei fenoli **UIM16** siano state mantenute dopo la funzionalizzazione.
I composti fenolici possono formare dei legami con l'amido e altri polisaccaridi. Pérez-Jiménez, Díaz-Rubio & Saura-Calixto (2013) hanno definito "NEPPs" quella frazione di polifenoli non più estraibili a seguito delle associazioni fenolo/polisaccaridi. Gli effetti delle interazioni fenolo/carboidrati sulla bio-attività dei composti fenolici dipendono dalle caratteristiche chimiche di entrambe le molecole (fenolo – carboidrato) (Zhang et al., 2014). Altri Autori hanno valutato il ruolo della gomma arabica e di altri carboidrati nella formazione del legame tra le proteine ed i tannini (Gonçalves, Mateus, & de Freitas, 2011; Soares, Mateus, & de Freitas, 2007). L'interazione fenolo/proteine era già stata precedentemente studiato, analizzando l'effetto di carboidrati di natura diversa sulla formazione di complessi polifenoli/proteine. Nello specifico, L'acido poligalatturonico, la gomma arabica e la pectina prevenivano sia l'associazione della procianidina B3 con la tripsina sia le interazioni tra le proteine salivari con le procianidine dei vinaccioli.

L'attività antiossidante dei fenoli **UIM16** è stata influenzata dalla composizione dell'alimento vegetale. Il più alto livello di attività antiossidante è stato riscontrato nella purea di barbabietola, matrice ricca di carboidrati e avente un pH acido.
E' noto che la capacità anti-radicalica dei fenoli dipende da diversi fattori: la loro concentrazione, la loro struttura e le caratteristiche fisico/chimiche del solvente. Tuttavia, la capacità dei fenoli di ridurre le specie reattive dell'ossigeno, come i radicali perossile e idrossile, è ancora lontana dall'essere completamente compresa. Il ruolo dell'acidità nella cinetica delle reazioni fenolo/radicali liberi è stato precedentemente studiato da Musialik, Kuzmicz, Pawcowski e Litwinienko (2009). In generale, è noto che i flavonoidi deprotonati sono donatori di elettroni più potenti ed hanno una capacità di "*scavenging*" migliore delle molecole neutre. Valgimigli et al. (2009), studiando la cinetica di reazione tra fenoli e radicali liberi, descrissero

una inaspettata accelerazione della reazione tra composti fenolici e radicali liberi, in ambiente acido dunque, le migliori prestazioni, in termini di attività antiossidante, della **PAVB** funzionalizzata, potrebbero essere il risultato del basso valore di pH.

5.4.2.2. Caratterizzazione sensoriale

L'intensità delle altre sensazioni target è stata influenzata sia dall'aumento della concentrazione fenolica che, in misura minore, dalla macro-composizione della matrice vegetale. Tutte le sensazioni erano appena rilevabili nel **PAVB** senza aggiunta di estratto, mentre nel resto dei campioni, l'acidità è aumentata da debole a forte, la dolcezza ha mostrato una riduzione significativa da moderata a debole, mentre il salato, l'astringenza e l'amaro sono aumentate leggermente da appena rilevabile da debole (Fig.43). La variazione di intensità della sensazione target nel **PAVP** in funzione della concentrazione fenolica era simile a quella osservata nella purea di barbabietola (Fig.44). L'aumento dell'acidità da appena rilevabile a moderata era associato a una significativa diminuzione della sensazione dolce, da moderata a debole, mentre il resto delle sensazioni veniva percepito a intensità debole o addirittura inferiore. Nel campione di **PAVPA** senza fenoli aggiunti, tutte le sensazioni sono state valutate a un'intensità appena rilevabile/debole, mentre un aumento significativo è stato osservato per la sensazione di acidità appena rilevabile a forte all'aumentare della concentrazione di fenolo aggiunta (Fig.45).
L'amaro, l'astringenza e il salato non sono state ulteriormente studiate poiché queste sensazioni sono state marginalmente influenzate dall'aggiunta di fenoli e percepite ad un'intensità debole nell'intero intervallo di concentrazioni.

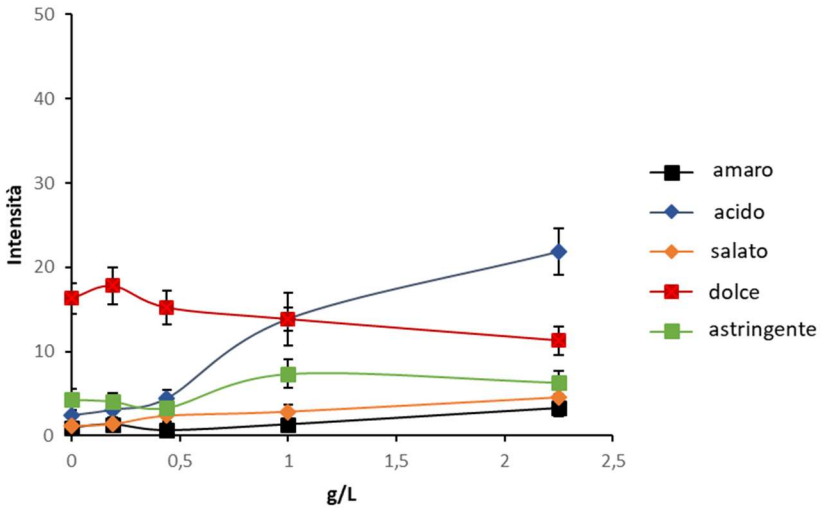


Figura 43. Intensità media delle sensazioni target nel **PAVB** con diverse concentrazioni di fenoli da **UIM16**. Le barre rappresentano le deviazioni standard.

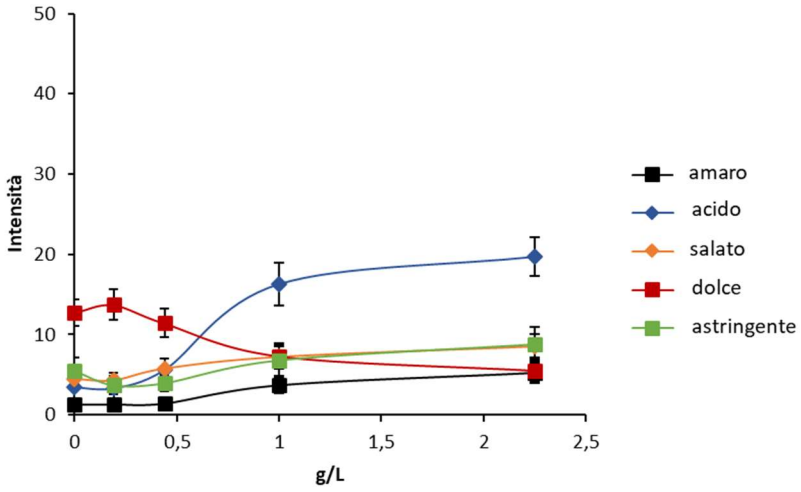


Figura 44 Intensità media delle sensazioni target nel **PAVP** con diverse concentrazioni di fenoli da **UIM16**. Le barre rappresentano le deviazioni standard.

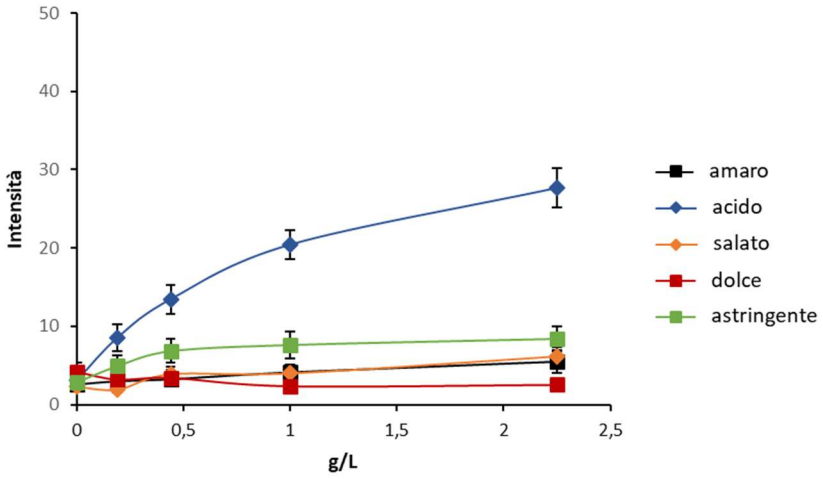


Figura 45 Intensità media delle sensazioni target nel **PAVPA** con diverse concentrazioni di fenoli da **UIM16**. Le barre rappresentano le deviazioni standard.

L'intensità percepita di acidità e sensazione dolce dei tre prototipi a diversi livelli di concentrazione di fenoli aggiunti di **UIM16PBEL** è stata confrontata per esplorare ulteriormente l'effetto della macro-composizione della matrice vegetale nel modulare le sensazioni indotte dai fenoli di uva immatura Merlot. Differenze significative sono state trovate confrontando l'acidità delle tre matrici a concentrazioni di fenolo di 0.41, 1.11 e 1.93 g/L. La massima intensità di acidità è stata valutata nel **PAVPA** mentre non sono state riscontrate differenze significative tra **PAVB** e **PAVP** (Fig.46A). La dolcezza è stata valutata come più intensa in **PAVB** e **PAVP** rispetto al **PAVPA** nell'intervallo di concentrazione da 0.0 a 0.41 g/kg di fenoli addizionati. Ai massimi livelli di concentrazione, il gusto dolce è stato percepito alla massima intensità nella **PAVPA** (Fig. 46B).

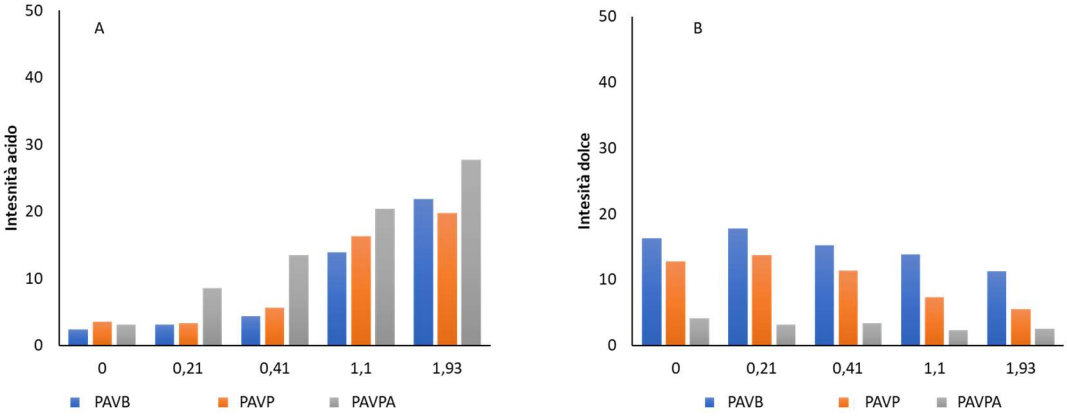


Figura 46. Effetto della matrice vegetale sull'intensità percepita delle sensazioni di acido e dolce dei **PAV** funzionalizzati con diverse concentrazioni di estratto **UIM16PBEL**.

Una variazione significativa di tutte le sensazioni target è stata osservata in tutti e tre i prototipi vegetali considerati (Tab.24).

Tabella 24 Anova a due vie modello mixed (soggetti fattore random): effetto della concentrazione fenolica sull'intensità delle sensazioni target nei prototipi alimenti vegetali fortificati con estratto **UIM16PBEL**. Valori medi di intensità, valore di F e p.

			Concentrazione (g di fenoli /kg di purea)				
			0.00	**0.21**	**0.41**	**1.11**	**1.93**
	F	**p**					
Amaro							
PAVB	4.92	0.0011	0.97 b	1.34 b	0.62 b	1.34 b	3.31 a
PAVP	6.78	< 0.0001	1.28 b	1.31 b	1.41 b	3.72 a	5.28 a
PAVPA	2.53	0.0445	2.61 b	3.00 b	3.25 b	4.11 ab	5.46 a
Acidità							
PAVB	26.22	< 0.0001	2.38 c	3.07 c	4.41 c	13.86 b	21.86 a
PAVP	39.02	< 0.0001	3.48 b	3.34 b	5.62 b	16.31 a	19.72 a
PAVPA	48.39	< 0.0001	3.07 e	8.54 d	13.46 c	20.43 b	27.68 a
Salato							
PAVB	4.85	0.0012	1.17 b	1.38 b	2.38 b	2.86 ab	4.55 a
PAVP	3.63	0.0081	4.52 c	4.31 c	5.79 bc	7.24 ab	8.55 a
PAVPA	5.78	0.0003	2.29 bc	1.96 c	3.89 bc	4.00 b	6.14 a
Dolce							
PAVB	3.07	0.0194	16.31 a	17.79 a	15.21 ab	13.83 ab	11.28 b
PAVP	10.01	< 0.0001	12.72 a	13.69 a	11.41 a	7.31 b	5.52 b
PAVPA	1.56	0.1865	4.18	3.21	3.43	2.36	2.54
Astringenza							
PAVB	4.64	0.0017	4.31 bc	4.07 c	3.31 c	7.38 a	6.34 ab
PAVP	4.16	0.0035	5.48 bc	3.72 c	3.97 bc	6.76 ab	8.72 a
PAVPA	6.01	0.0001	2.86 c	4.93 bc	6.86 ab	7.64 a	8.43 a

Lettere diverse indicano valori significativamente diversi [a,b,c,d,e].

I valori F indicavano che il gusto amaro e quello salato unitamente alla sensazione di astringenza presentavano un aumento significativo dell'intensità percepita con l'aumento della concentrazione fenolica aggiunta, ma rappresentavano delle sensazioni marginali in tutti e tre i **PAV** nei quali erano percepite ad un livello compreso fra debole a meno che moderato. L'aumento della concentrazione di fenolica dovuta dall'aggiunta dell'estratto **UIM16PBEL** ha indotto il più forte effetto sull'acidità in tutti e tre i prototipi alimentari.

In generale, i dati di intensità indicavano un impatto significativo dell'aggiunta di estratti **UIM16PBEL** sulle proprietà sensoriali dei tre alimenti vegetali, e in particolare sulla percezione dell'acidità, in funzione della concentrazione di fenoli aggiunta. La naturale dolcezza della purea di barbabietole e piselli è stata ridotta dai fenoli addizionati a causa dell'interazione intermodale tra le sensazioni di acido e amaro, che ha indotto la soppressione della sensazione dolce percepita all'aumentare dell'intensità dell'acidità. L'intensità di amaro, salato e astringenza sono state significativamente modificate dall'estratto di **UIM16PBEL**, ma l'entità di questi effetti appare marginale poiché queste sensazioni sono percepite ad un'intensità debole nell'intero intervallo di concentrazioni.

Le diverse composizioni delle matrici vegetali influenzavano il contributo dei fenoli **UIM16PBEL** all'acidità. Inoltre, la gamma di intensità crescente osservata differiva tra le serie di campioni indicando che la loro macro-composizione svolgeva un ruolo attivo nella modulazione dell'impatto sensoriale dei fenoli estratti dalle uve immature Merlot.

5.5 AZIONE ANTIOSSIDANTE SUI VINI

E' noto che l'ossidazione del vino può avvenire attraverso meccanismi di ossidazione enzimatica e meccanismi di ossidazione non enzimatica. L'ossidazione enzimatica si verifica quasi interamente nel mosto d'uva ed è in gran parte correlata al contenuto di acidi idrossicinnamici sotto forma esterificata con l'acido tartarico come l'acido caffeil tartarico e l'acido p-cumaril tartarico e flavan-3-oli. L'ossidazione di tipo non enzimatico, prevale durante il processo di vinificazione e prosegue durante l'affinamento/maturazione del vino e riguarda principalmente l'ossidazione dei polifenoli contenenti un catecolo o un gruppo galloile. Queste reazioni fenoliche, sia enzimatiche che non enzimatiche, danno luogo a sottoprodotti chiamati chinoni, di colore bruno. Tuttavia, nell'ossidazione non enzimatica, i composti fenolici non reagiscono direttamente con l'ossigeno ma con le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sotto forma di radicale libero, dando origine ad una serie di reazioni a catena che portano alla formazione di perossido di idrogeno (Oliveira et al., 2011).

Nonostante i meccanismi coinvolti nel processo di ossidazione del vino siano stati ampiamente studiati, la protezione del vino dall'ossidazione rimane ad oggi uno degli argomenti critici nel settore enologico (Comuzzo et al., 2015).

E' noto che l'anidride solforosa (SO_2) sia l'additivo enologico maggiormente impiegato per proteggere il vino dalle ossidazioni e da altre tipologie di alterazioni. La SO_2 ha infatti molteplici proprietà: antiossidante, antiossidasica, antimicrobica e lisciviante. Tuttavia, il suo uso durante le varie fasi del processo di vinificazione è rigorosamente controllato, poiché dosi elevate possono causare alterazioni organolettiche nel prodotto finale e, in particolare, a causa del suo potenziale in termini di tossicità e di allergene (Comuzzo et a., 2015). Nasce quindi un grande interesse nella ricerca di altri conservanti naturali e di tecnologie innovative, con un minor impatto sulla salute umana, che possano sostituire o almeno integrare l'azione della SO_2 (González-Rompinelli et al., 2013). In alternativa, sono stati considerati

trattamenti fisici come campi elettronici pulsati, irradiazione UV e ultrasuoni, (Fredericks, du Toit, & Krügel, 2011; Lustrato et al., 2010), nonché l'aggiunta di composti come le batteriocine , dimetil dicarbonato (DMDC) e lisozima (Santos, Nunes, Saraiva & Coimbra, 2012). Più recentemente, García-Ruiz et al. (2012) hanno dimostrato che alcuni estratti fenolici, provenienti da differenti specie vegetali (54), erano in grado di inibire scala di laboratorio, la crescita dei batteri lattici e di ritardare la fermentazione malolattica di vini rossi. Nello sviluppo di nuove alternative all'uso dei solfiti in enologia, sono indispensabili esperimenti su scala industriale allo scopo di dimostrare la potenziale applicazione tecnologica e il suo impatto sulle proprietà e sulla qualità del vino (González-Rompinelli et al., 2013).

L'azione antiossidante degli estratti **UIS15PAEA**, **UIM16PBEL** e **UIV16PBEL** è stata valutata su vini con caratteristiche diverse (cultivar, annata, processo) in comparazione con additivi enologici comunemente utilizzati in ambito enologico come il tannino enologico (**T**), l'acido ascorbico (**AA**) e la solforosa (**SO2**) mediante i test POM e IOA. Entrambi i test si basano sull'aggiunta al vino di un forte ossidante, il perossido di idrogeno, e sull'aumento della temperatura al fine di verificarne la resistenza del vino all'ossidazione.

Data l'elevata variabilità dei vini in esame e della complessità dei processi di ossidazione, preliminarmente è stata determinata la quantità di H_2O_2 al 3% necessaria per produrre un livello di ossidazione del colore simile in tutti i vini e compreso fra il 40% e il 60%. Per i vini rossi il test IOA è stato eseguito addizionando ad ogni campione una concentrazione da 0 a 16000 µl/L di H_2O_2 al 3%, mentre nel caso dei vini bianchi, per il POM test è stata addizionata per ciascun campione una quantità di H_2O_2 al 3% da 0 a 4000 µl/L.

I risultati del IOA e del POM test eseguiti sulle varie tipologie di vino sono mostrati rispettivamente nella Figura 47 e nella Figura 48.

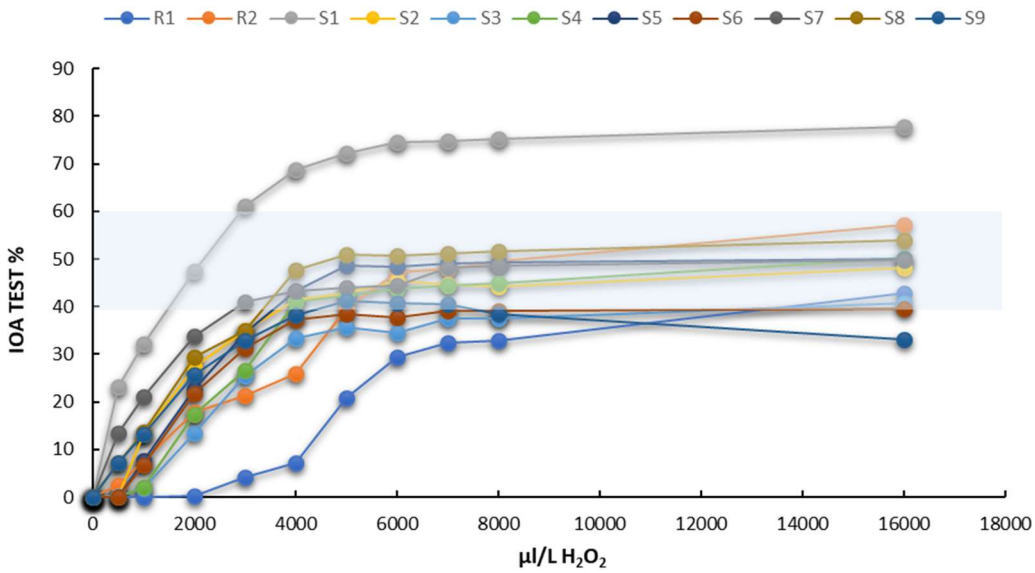


Figura 47. IOA test sui vini rossi (**R1**, **R2**, **S1**, **S2**, **S3**, **S4**, **S5**, **S6**, **S7**, **S8**, **S9**). In azzurro è evidenziato il range di ossidabilità dal 40% al 60%.

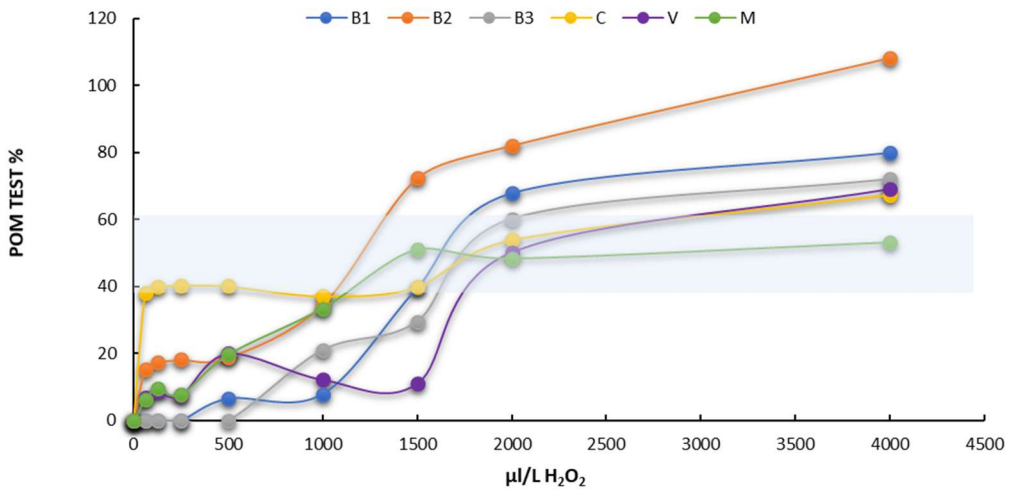


Figura 48. POM test eseguito sui vini bianchi (**B1**, **B2**, **B3**, **C**, **V**, **M**). In azzurro è evidenziato il range di ossidabilità dal 40% al 60%.

I vini rossi mostravano una protezione all'ossidazione maggiore rispetto ai vini bianchi. E' noto infatti che gli antociani siano una delle classi fenoliche correlata positivamente all'attività antiossidante dei vini (Lingua, Fabani, Wunderlin & Baroni, 2016). In particolare, tutti i vini bianchi hanno raggiunto una percentuale di ossidazione dal 40 al 60% a seguito dell'aggiunta di 1500 – 2000 µl/L di H_2O_2 al 3% (Fig.47). I vini rossi hanno mostrato una variabilità maggiore alla dose di perossido di idrogeno necessario al raggiungimento del range di ossidazione desiderato. I vini rossi da tavola **R1**, **R2** hanno raggiunto il 40% circa di ossidazione con l'aggiunta di 16000 e 8000 µl/L di H_2O_2, rispettivamente. I campioni **S3**, **S4**, **S5** hanno raggiunto la % di ossidazione dopo l'aggiunta di 16000 µl/L di H_2O_2, i vini **S3**, **S6** e **S7** con 6000 µl/L mentre i campioni **S8** e **S9** con una quantità pari a 5000 µl/L di H_2O_2. Il campione **S1**, un vino Sangiovese del 2018, in corso di elaborazione, ha mostrato la migliore protezione all'ossidazione con 2000 µl/L di H_2O_2 aggiunti per ottenere un'ossidazione pari al 50% circa (Fig.48).

I test di ossidabilità IOA e POM sono stati eseguiti sui vini preliminarmente aggiunti sia di antiossidanti da uva immatura sia degli additivi commerciali, utilizzando le dosi di perossido di idrogeno determinate per ciascun vino nelle prove preliminari. Nelle condizioni drastiche di stress ossidativo dei test IOA e POM è stato necessario aggiungere una dose pari a 2 g/L di ciascun estratto da uva immatura (**UIM16PBEL**, **UIV16PBEL** e **UIS15PAEA)** per ottenere protezione. Gli antiossidanti tradizionali (**SO2**, **AA** e **T**) sono stati invece utilizzati alla dose di 100 mg/L

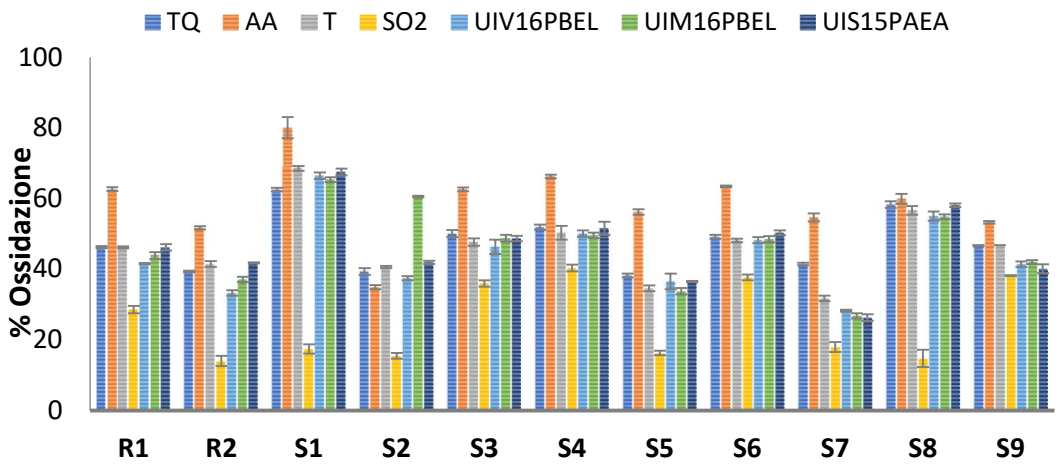


Figura 49. Risultati del test IOA eseguito sui vini rossi addizionati con i diversi prodotti antiossidanti. Vini rossi (**R1**, **R2**, **S1**, **S2**, **S3**, **S4**, **S5**, **S6**, **S7**, **S8**, **S9),** vino non trattato (**TQ**), acido ascorbico (**AA**), tannino (**T**), anidride solforosa (**SO2**), estratti da uva immatura (**UIM16PBEL**, **UIV16OBEL**, **UIS15PAEA**).

I risultati dello IOA test sono mostrati nella Figura 49. L'addizione di **AA** determinava un aumento dell'ossidazione di tutti i campioni rispetto al **TQ**. Si può ipotizzare che, in presenza di catalizzatori metallici del vino, l'ossidazione dell'acido ascorbico possa aver dato origine alla produzione di un ulteriore quantità di perossido di idrogeno, contribuendo in questo modo all'ossidazione del colore (Bradshaw, Cheynier, Scollary, & Prenzler, 2003). Gli estratti da **UI** Merlot, Viognier e Sangiovese, hanno mostrato una capacità antiossidante migliore dell'acido ascorbico e simile a quella del tannino commerciale, portando i campioni di vino rosso ad una percentuale di ossidazione simile a quella del tal quale. In tutti i campioni l'aggiunta di **SO2** riduceva l'ossidazione a livelli inferiori rispetto al **TQ** e ai campioni aggiunti con gli altri antiossidanti, dimostrandosi più efficace nel proteggere il vino dall'aggiunta diretta di perossido di idrogeno. Facevano eccezione il campione **S7** ed, in maniera meno marcata per il campione **S9** nei quali la capacità

antiossidante degli estratti da uva immatura portava ad una ossidazione del vino minore rispetto ai campioni **TQ** e aggiunti di **T**. I campioni **S7** e **S9** sono stati ottenuti dalla cultivar Sangiovese senza l'aggiunta di solforosa.

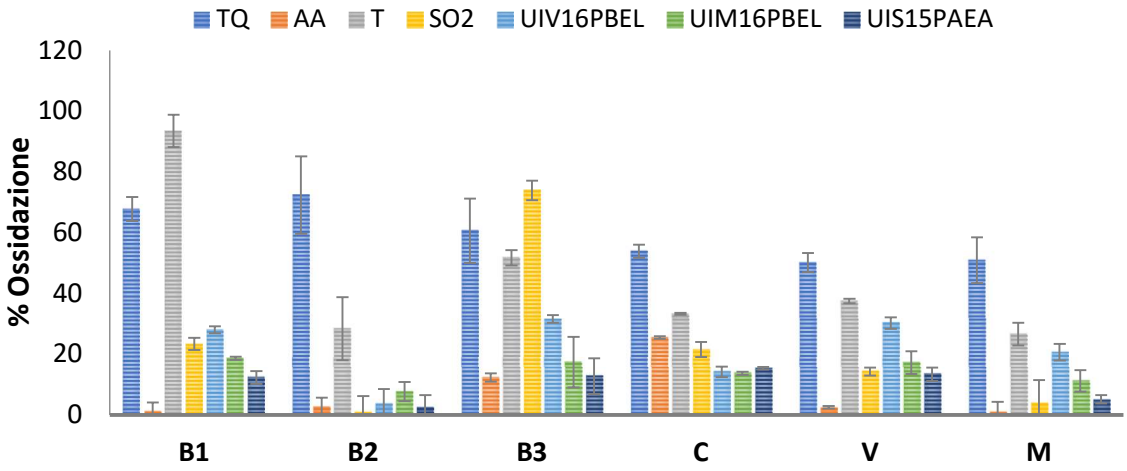


Figura 50. Risultati del test POM eseguito sui vini bianchi addizionati con i diversi prodotti antiossidanti. Vini bianchi (**B1**, **B2**, **B3**, **C**, **V**, **M**), vino non trattato (**TQ**), acido ascorbico (**AA**), tannino (**T**), anidride solforosa (**SO2**), estratti da uva immatura (**UIM16PBEL**, **UIV16OBEL**, **UIS15PAEA**).

I risultati del POM test sono mostrati nella Figura 50. E' possibile osservare che tutti gli additivi utilizzati, ad eccezione dell'anidride solforosa, esercitavano un'azione antiossidante sui vini bianchi diversa da quella osservata per i vini rossi. Infatti, tutti gli antiossidanti mostravano un'azione protettiva riducendo la percentuale di ossidazione del colore dei vini rispetto al **TQ**, con la sola eccezione del campione **B1** aggiunto di tannino. Il tannino commerciale era poco efficace mentre l'acido ascorbico, la solforosa e gli estratti d'uva avevano un effetto protettivo migliore e variabile in funzione della tipologia di vino. Nel caso dei vini bianchi, la solforosa presente nei vini potrebbe aver contribuito a ridurre il perossido di idrogeno formatosi in seguito all'ossidazione dell'acido ascorbico, sinergia utile a proteggere il colore di questa tipologia di vini. A seguito dell'aggiunta degli estratti da **UI**

Merlot, Viognier e Sangiovese, tutti i vini mostravano un'ossidabilità minore rispetto al tal quale e ai campioni aggiunti di tannino e l'effetto antiossidante degli **EA** era simile a quello ottenuto aggiungendo **SO2**. Risultati analoghi erano stati ottenuti da Fia et al. (2018), studiando il potenziale effetto antiossidante di un estratto ottenuto da uve immature Sangiovese su vini bianchi Bellone, Chardonnay e Viognier. I risultati ottenuti indicano come gli estratti da uva immatura potrebbero aumentare la capacità antiossidante di un vino bianco e potrebbero essere utilizzati in aggiunta o in sostituzione ai tradizionali antiossidanti enologici.

5.5.1 Prove sangiovese S1

Sul campione di vino rosso **S1** sono state effettuate delle prove di maturazione su un volume di 100 litri in fusti di acciaio. Il campione **S1**, vinificato senza l'aggiunta di solfiti, conteneva 20 g/hl di chitocel (AEB group) e rappresentava la tesi tal quale (**Tq**) del piano sperimentale. Tale tesi è stata confrontata con altre tre tesi in cui il campione **S1** (+20 g/hl di chitocel) veniva addizionato con 20 g/hl di **UIM16PBEL** (**A**), 50 g/hl di **UIM16PBEL** (**B**) e 50 mg/L di SO_2 (**C**).
Le prove sono ancora in corso di sperimentazione e saranno condotte per un tempo complessivo di 6 mesi. I campioni **Tq**, **A**, **B** e **C**, al tempo zero e dopo 3 mesi, sono stati confrontati per ossidabilità e test sensoriali di differenza. Acidità totale, pH, acidità volatile, contenuto in polifenoli totali e attività antiossidante sono state monitorate ogni 30 giorni.

I risultati delle analisi di base di acidità volatile in g/L di acido acetico (A), acidità totale in g/L di acido tartarico (B), pH (C) e grado alcolico % (v/v) (D) son mostrati nella Figura 51.

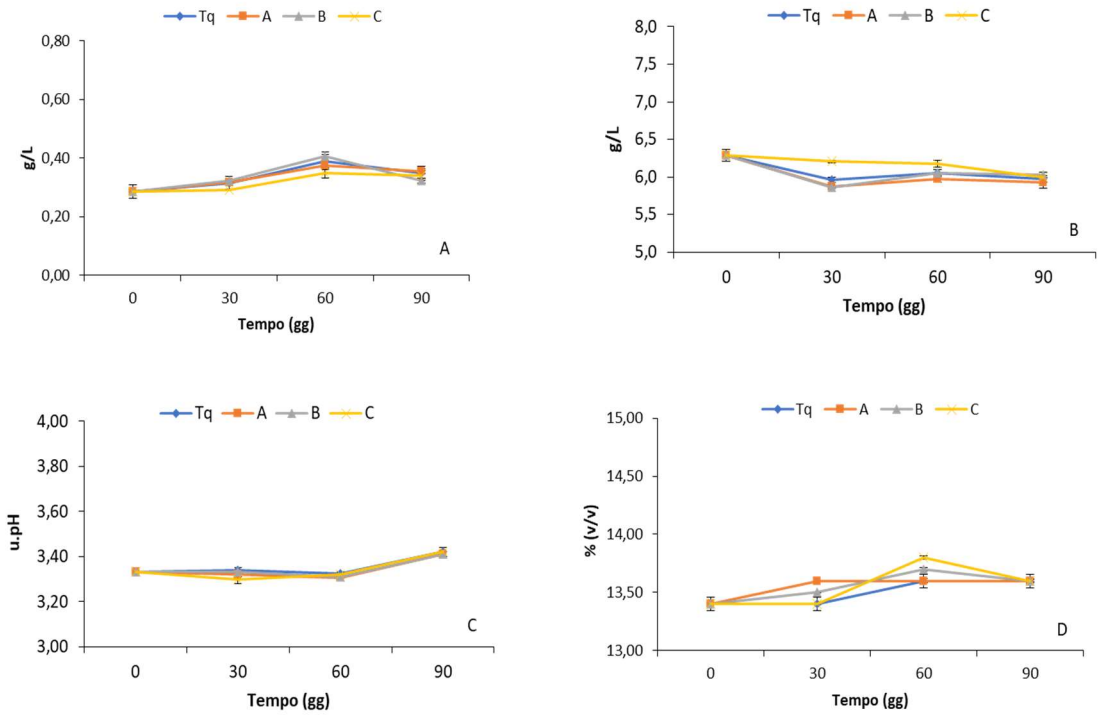


Figura 51. Acidità volatile (g/L di acido acetico), acidità totale (g/L di acido tartarico), pH e grado alcolico (% p/v) dei campioni **Tq**, **A**, **B**, **C**.

Non si sono osservate alterazioni dei parametri di base durante i primi 3 mesi di maturazione del vino **S1** alle 4 tesi in esame. L'aggiunta dell'estratto **UIM16PBEL** al vino Sangiovese, alle due dosi diverse, non portava variazioni significative sul pH, acidità totale e acidità volatile.

Risultati analoghi sono stati ottenuti da Gonzàlez-Rampinelli et al. (2013). Tale lavoro riporta una prima prova su scala aziendale dell'aggiunta di estratti a caratteristiche antimicrobiche provenienti da matrici vegetali durante l'invecchiamento del vino in barrique di rovere. Il vino (cv. Verdejo) è stato trattato con una dose regolare di SO_2 (160 mg / L) o con una mezza dose di SO_2 (80 mg / L), addizionato con i due estratti, uno da foglie di eucalipto e l'altro dalla buccia di mandorla ad una concentrazione pari a 100 mg/L e successivamente posto in

barrique. Analizzando i parametri di base, pH, acidità totale e volatile ed alcol gli Autori osservarono che il vino dopo l'aggiunta dei due estratti vegetali non mostrava differenze significative rispetto al campione non trattato. Tali Autori dimostrarono anche che il vino trattato con gli estratti fenolici rimaneva microbiologicamente stabile durante i 6 mesi di invecchiamento in barrique.

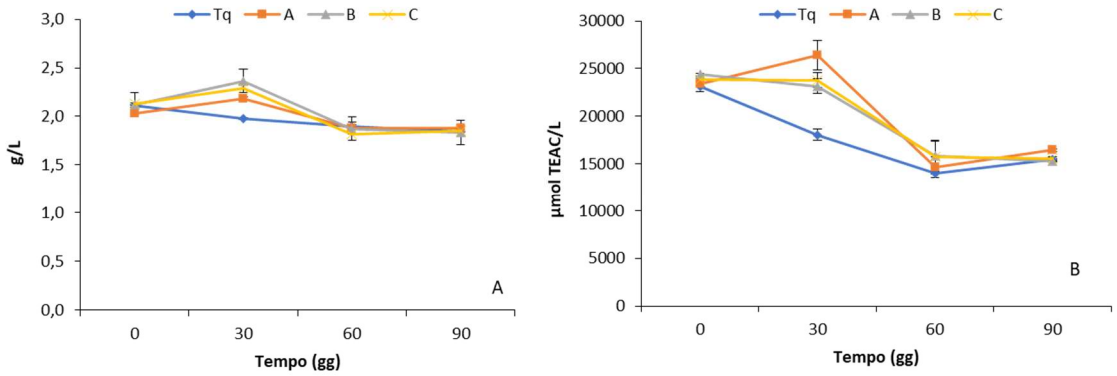


Figura 52. Polifenoli totali (A) in g/L e attività antiossidante (B) in µmol TEAC/ L dei campioni **Tq**, **A**, **B**, **C**. Le barre rappresentano la deviazione standard.

L'andamento dei polifenoli totali e dell'attività antiossidante dei 4 campioni sono mostrate nella Figura 52. Nel corso dei 3 mesi, l'andamento del contenuto in polifenoli totali riflette quello dell'attività antiossidante. Dopo 30 giorni di maturazione, nelle tesi addizionate con 20 g/hl e 50 g/hl di **UIM16PBEL** e con 50 mg/L di **SO2** si osservava un incremento del contenuto in polifenoli e dell'attività antiossidante, seguito da un leggero decremento a 60 giorni per poi rimanere costante fino al raggiungimento dei 90 giorni. Risultati simili sono stati ottenuti da Gonzàlez-Rampinelli et al. (2013) i quali hanno osservato che l'aggiunta di entrambi gli estratti fenolici di origine vegetale, provenienti dalle foglie di eucalipto e dalla buccia di mandorle, non modificava in modo significativo il contenuto fenolico del vino ad eccezione di alcuni acidi e esteri idrossicinnamici e flavan-3-oli, che mostravano una concentrazione inferiore rispetto al campione di vino non trattato.

L'incremento della attività antiossidante potrebbe essere potrebbe essere in accordo con le proprietà chelanti ed antimicrobiche e la capacità di inibire le specie radicaliche del chitosano (Chinnici & Riponi, 2016) unite alle capacità antiossidanti dell'estratto da uve immature Merlot osservate precedentemente sui diversi campioni di vino rosso (11), che risultavano paragonabili a quella della SO2.

Il chitosano è un polimero derivante dal processo di de-acetilazione della chitina e forte espansione nel settore alimentare. Dal 2011 è stato approvato il suo utilizzo nel settore enologico per la rimozione di contaminanti chimici o biologici, la prevenzione delle precipitazioni proteiche ed il controllo dello sviluppo di *Brettanomyces spp.* (Chinnici & Riponi, 2016).

Ad inizio e metà sperimentazione è stato effettuato il test IOA per valutare la variazione dell'ossidabilità dei campioni durante la maturazione in acciaio. Il test IOA è stato effettuato con dosi crescenti da 500 a 16000 µl/L di H_2O_2 al 3% (Fig. 53).

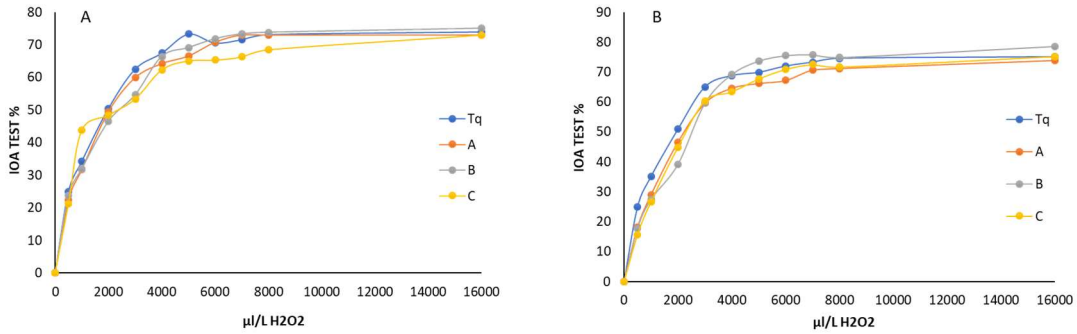


Figura 53. IOA test (%) dei campioni **Tq**, **A**, **B**, **C** all'inizio (A) e dopo tre mesi (B) di maturazione in acciaio

All'inizio delle prove, la propensione all'ossidazione del campione **Tq** era paragonabile a quella dei campioni addizionati con gli antiossidanti **UIM16PBEL** e **SO2**; tutti i campioni raggiungevano infatti un'ossidazione del 50% circa con l'aggiunta di 2000 µl/L di H_2O_2.

A metà sperimentazione, dopo 3 mesi di affinamento in fusti di acciaio, le 4 tesi non presentano variazioni nella predisposizione all'ossidazione, anche in tal caso infatti, l'aggiunta di 2000 µl/L di perossido di idrogeno ha portato ad una ossidazione del 50% su tutti e 4 i campioni. Dai risultati ottenuti emerge che l'estratto **UIM16PBEL,** utilizzato anche alla dose più bassa di 20 g/hl**,** esercitava una protezione all'ossidazione paragonabile a quella dell'anidride solforosa (50 mg/L).

Allo scopo di valutare delle differenze a livello sensoriale è stato utilizzato un test triangolare di differenza sui 4 campioni ad inizio e metà sperimentazione.

L'elaborazione dei dati del test triangolare è stata effettuata confrontando il numero di risposte corrette con il valore riportato (Jellinek, 1985) di probabilità a doppia entrata che, in corrispondenza del numero di giudici che hanno effettuato il test, indica il numero minimo di risposte corrette. I risultati ottenuti mostravano che il numero di risposte corrette elaborato era inferiore al minimo di risposte necessarie per concludere che esiste una differenza fra i vini.

Nello specifico nel test triangolar eseguito ad inizio sperimentazione, su di un numero di giudici pari a 16, il numero di risposte corrette ($p < 0.05$) doveva essere almeno di 12. Il test di differenza è stato eseguito tra i campioni **Tq-A**, **Tq-B** e **Tq-C** con un numero di risposte correte rispettivamente di 6,8,7.

A metà sperimentazione, il test triangolare è stato ripetuto nello stesso ordine con un panel costituito da 18 soggetti. In questo caso, il numero delle risposte corrette per poter avere una significatività dei dati era pari a 16 ($p < 0.05$). Rispettivamente 5,7 e 7 sono state le risposte corrette ottenute nei test di differenza tra i campioni **Tq-A**, **Tq-B** e **Tq-C**. Questo significa che i 4 campioni di vino non erano significativamente diversi e che l'aggiunta degli estratti derivanti dalle uve immature Merlot (2016) non apportava variazioni sensoriali al vino **S1** di riferimento.

Per evidenziare delle differenze a livello sensoriale tra i vini addizionati con gli estratti vegetali ed il vino non trattato, anche Gonzàlez-Rampinelli et al. (2013) hanno eseguito un test triangolare. Tali Autori ottennero risultati analoghi al nostro studio, il test triangolare non ha mostrato differenze significative tra i vini trattati e non trattati con gli estratti fenolici ad attività antimicrobica.

I risultati ottenuti indicano la potenziale applicabilità degli estratti fenolici derivanti da uve immature (*cv* Merlot) come alternativa al diossido di zolfo durante la maturazione in fusti di acciaio di un vino rosso.

6.0 CONCLUSIONI

In conclusione, le uve immature, derivanti le operazioni da diradamento sono un'importante fonte di composti antiossidanti e vitamine idrosolubili e sono risultate idonee alla produzione di estratti a valore aggiunto.

Il metodo di produzione industriale proposto è efficiente ed ecosostenibile in quanto si avvale di normali attrezzature presenti in cantina, non prevede l'utilizzo di solventi o stabilizzanti e la CO_2 utilizzata potrebbe essere recuperata con dispositivi reperibili sul mercato. Il metodo ha permesso inoltre di ottenere un estratto liquido contenente i principali antiossidanti dell'uva immatura. L'applicazione della bassa temperatura e del ghiaccio secco hanno favorito l'estrazione dei composti bioattivi da bucce, vinaccioli di uve immature e prevengono l'ossidazione dei composti estratti.

L'estratto in forma secca ha mostrato caratteristiche chimiche e fisiche adeguate per l'inclusione in alimenti a base vegetale come ingrediente funzionale ad elevato valore aggiunto e per preservare la stabilità e le caratteristiche organolettiche dei vini.

La composizione dei prototipi di alimenti di origine vegetale ha influenzato le proprietà funzionali e sensoriali dei fenoli estratti dalle uve immature. L'effetto più marcato in termini di recupero dei fenoli e dell'attività antiossidante è stato osservato negli alimenti a base proteica. Lo studio ha permesso di individuare la purea di barbabietola (carboidrati/pH acido/sapore dolce) come prototipo più adeguato ad esaltare il valore nutrizionale dei fenoli aggiunti e controllare l'impatto sensoriale negativo dei fenoli utilizzati come ingredienti funzionali.

Per quanto riguarda i vini, lo studio ha fornito indicazioni preliminari sul potenziale utilizzo degli estratti secchi come antiossidanti alternativi agli additivi enologici classici. Nei test di ossidazione per aggiunta di perossido di idrogeno le dosi di estratto che conferiscono protezione al vino sono risultate molto elevate in comparazione con quelle degli antiossidanti tradizionali. Tuttavia, nelle prove su piccolo volume condotte in cantina su vino Sangiovese, gli estratti sono risultati

efficaci anche a dosi enologiche nel proteggere il vino dall'ossidazione. In queste condizioni non sono state evidenziate variazioni significative delle proprietà sensoriali del vino.

Concludendo, lo studio ha permesso di individuare strategie idonee per la valorizzazione di uve immature provenienti da operazioni di diradamento sia attraverso la messa a punto di prototipi funzionali ad elevata prestazione, sia fornendo indicazioni preliminari sulla efficacia antiossidante nel vino.

BIBLIOGRAFIA

Adams, D. O. (2006). Phenolics and ripening in grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, *57*(3), 249-256.

Adom K.K., Sorrells M.E., Liu R.H. (2005). Phytochemicals and antioxidant activity of milled fractions of different wheat varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* **53:** 2297-2306.

Aghamirzaei, M., Peighambardoust, S.H., Azadmard-Damirchi, S., Majzoobi, M., 2015. Effects of
grape seed powder as a functional ingredient on flour physicochemical characteristics and dough rheological properties. *J.Agric. Sci. Technol.* 17 (2), 365–373.

Aleixandre-Tudo, J. L., & du Toit, W. (2018). Cold maceration application in red wine production and its effects on phenolic compounds: A review. *LWT*, *95*, 200-208.

Alupului, A., Calinescu, I., & Lavric, V. (2012). Microwave extraction of active principles from medicinal plants. *UPB Science Bulletin, Series B*, *74*(2), 1454-2331.

Amendola D., De Faveri D.M., & Spigno G. (2010). Grape march phenolics : extraction kinetics, quality and stability of extracts. *J.Food Eng.* 97 (3), 384-392.

Anastasiadi, M., Pratsinis, M., Kletsas, D., Skaltsounis, AL., Haroutounian. SA. (2012). Grape stem extracts: Polyphenolic content and assessment of their in vitro antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology* 48, 316-322.

Andersen, O. M., & Markham, K. R. (2005). *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. CRC press: Boca Ratòn, FL.

Andrade, M. A., Lima, V., Sanches Silva, A., Vilarinho, F., Castilho, M. C., Khwaldia, K., & Ramos, F. (2019). Pomegranate and grape by-products and their active compounds: are they a valuable source for food applications?. *Trends in food science & technology*.

A. O. A. C (1995). Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. *AOAC International, Arlington VA*.

Atanacković, M., Petrović, A., Jović, S., Gojković-Bukarica, L., Bursać, M., & Cvejić, J. (2012). Influence of winemaking techniques on the resveratrol content, total phenolic content and antioxidant potential of red wines. *Food Chemistry*, *131*(2), 513-518.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, *117*(4), 426-436.

Babu, R. J., Chen, L., & Kanikkannan, N. (2015). Fatty alcohols, fatty acids, and fatty acid esters as penetration enhancers. In *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement* (pp. 133-150). Springer, Berlin, Heidelberg.

Baydar, N. G., Özkan, G., & Çetin, E. S. (2007). Characterization of grape seed and pomace oil extracts. *Grasas y aceites*, *58*(1), 29-33.

Balasa, A., Toepfl, S., & Knorr, D. (2006). Pulsed electric field treatment of grapes. *Food factory of the future 3*, Gothenburg, Sweden

Barba, F. J., Terefe, N. S., Buckow, R., Knorr, D., & Orlien, V. (2015). New opportunities and perspectives of high pressure treatment to improve health and safety attributes of foods. A review. *Food Research International*, *77*, 725-742.

Barba, F. J., Zhu, Z., Koubaa, M., Sant'Ana, A. S., & Orlien, V. (2016). Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *49*, 96-109.

Barbosa-Canovas, G. V., Pierson, M. D., Zhang, Q. H., & Schaffner, D. W. (2000). Pulsed electric fields. *Journal of Food Science*, 65(S8), 65-79.

Bartoshuk, L. M. (2000). Comparing sensory experiences across individuals: recent psychophysical advances illuminate genetic variation in taste perception. *Chemical senses*, *25*(4), 447-460.

Beres, C., Costa, G. N., Cabezudo, I., da Silva-James, N. K., Teles, A. S., Cruz, A. P., ... & Freitas, S. P. (2017). Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. *Waste management*, *68*, 581-594.

Beres, C., Simas-Tosin, F. F., Cabezudo, I., Freitas, S. P., Iacomini, M., Mellinger-Silva, C., & Cabral, L. M. (2016). Antioxidant dietary fibre recovery from Brazilian Pinot noir grape pomace. *Food chemistry*, *201*, 145-152.

Bertelli, A., Falchi, M., Lo Scalzo, R., & Morelli, R. (2004). EPR evaluation of the antiradical activity of wines containing high concentrations of resveratrol. *Drugs under experimental and clinical research*, *30*(3), 111-115.

Bittar, S., Périno-Issartier, S., Dangles, O., & Chemat, F. (2013). An innovative grape juice enriched in polyphenols by microwave-assisted extraction. *Food chemistry*, *141*(3), 3268-3272.

Boussetta, N., Vorobiev, E., Reess, T., De Ferron, A., Pecastaing, L., Ruscassié, R., & Lanoiselle, J. L. (2012). Scale-up of high voltage electrical discharges for polyphenols extraction from grape pomace: effect of the dynamic shock waves. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *16*, 129-136.

Boussetta, N., Turk, M., De Taeye, C., Larondelle, Y., Lanoisellé, J. L., & Vorobiev, E. (2013). Effect of high voltage electrical discharges, heating and ethanol concentration on the extraction of total polyphenols and lignans from flaxseed cake. *Industrial Crops and Products*, *49*, 690-696.

Boussetta, N., & Vorobiev, E. (2014). Extraction of valuable biocompounds assisted by high voltage electrical discharges: a review. *Comptes Rendus Chimie*, *17*(3), 197-203.

Bautista-Ortin, A.B., Pérez-Prieto, L.J., Romero-Cascales, I., Fernández-Fernández, J.I., López-Roca, J.M., & Gómez-Plaza, E. (2003). Influencia del estado de maduraciòn de la uva de la variedad Monastrell en el color de los vino. In: *II Congreso Nacional de Ciencia y Tecnologìa de los Alimentos, Orihuela, España.*

Bradshaw, M. P., Cheynier, V., Scollary, G. R., & Prenzler, P. D. (2003). Defining the ascorbic acid crossover from anti-oxidant to pro-oxidant in a model wine matrix containing (+)-catechin. *Journal of agricultural and food chemistry*, *51*(14), 4126-4132.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, *28*(1), 25-30.

Brito, A. G., Peixoto, J., Oliveira, J. M., Oliveira, J. A., Costa, C., Nogueira, R., & Rodrigues, A. (2007). Brewery and winery wastewater treatment: some focal points of design and operation. In *Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry* (pp. 109-131). Springer, Boston, MA.

Burg, P., Vítěz, T., Turan, J., & Burgová, J. (2014). Evaluation of grape pomace composting process. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, *62*(5), 875-881.

Bustamante, M. A., Paredes, C., Moral, R., Moreno-Caselles, J., Pérez-Espinosa, A., & Pérez-Murcia, M. D. (2005). Uses of winery and distillery effluents in agriculture: characterisation of nutrient and hazardous components. *Water Science and Technology*, *51*(1), 145-151.

Cabras P., & Martelli A. (2004). Chimica degli alimenti. Piccin Nuova Libraria, Padova.

Callahan, J. C., Cleary, G. W., Elefant, M., Kaplan, G., Kensler, T., & Nash, R. A. (1982). Equilibrium moisture content of pharmaceutical excipients. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, *8*(3), 355-369.

Cano-Chauca, M., Stringheta, P. C., Ramos, A. M., & Cal-Vidal, J. (2005). Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *6*(4), 420-428.

Canuti, V., Puccioni, S., Storchi, P., Zanoni, B., Picchi, M., & Bertuccioli, M. (2018). Enological eligibility of grape clones based on the SIMCA method: the case of the Sangiovese cultivar from Tuscany. *Italian Journal of Food Science*, *30*(1).

Canuti, V., Picchi, M., Zanoni, B., Fia, G., & Bertuccioli, M. (2017). A multivariate methodological approach to relate wine to characteristics of grape composition: the case of typicality. *American Journal of Enology and Viticulture*, *68*(1), 49-59.

Carocho, M., & Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*, *51*, 15-25.

Carratù B. and Sanzini E. (2005). Sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale. *Annuario Istituto Superiore della Sanità*, 41(1), 7-16.

Casas, L., Mantell, C., Rodríguez, M., de la Ossa, E. M., Roldán, A., De Ory, I., ... & Blandino, A. (2010). Extraction of resveratrol from the pomace of Palomino fino grapes by supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, *96*(2), 304-308.

Casazza, A. A., Aliakbarian, B., Sannita, E., & Perego, P. (2012). High-pressure high-temperature extraction of phenolic compounds from grape skins. *International journal of food science & technology*, *47*(2), 399-405

Catarino, M., & Mendes, A. (2011). Dealcoholizing wine by membrane separation processes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *12*(3), 330-337.

Cattaruzza, A., Peri, C., & Rossi, M. (1987). Ultrafiltration and deep-bed filtration of a red wine: comparative experiments. *American journal of enology and viticulture*, *38*(2), 139-142.

Cheynier, V., Souquet, J. M., & Moutounet, M. (1989). Glutathione content and glutathione to hydroxycinnamic acid ratio in Vitis vinifera grapes and musts. *American Journal of Enology and Viticulture*, *40*(4), 320-324.

Chinnici, F., & Riponi, C (2016). Controllo dell'ossidazione di (+)-catechina mediante chitosano: ipotesi di utilizzo in vinificazioni a ridotto contenuto in solfiti. Disponibile su www.infowine.com

Cho, Y. J., Hong, J. Y., Chun, H. S., Lee, S. K., & Min, H. Y. (2006). Ultrasonication-assisted extraction of resveratrol from grapes. *Journal of Food Engineering*, *77*(3), 725-730.

Comuzzo, P., Battistutta, F., Vendrame, M., Páez, M. S., Luisi, G., & Zironi, R. (2015). Antioxidant properties of different products and additives in white wine. *Food chemistry*, *168*, 107-114.

Corbin, K. R., Hsieh, Y. S., Betts, N. S., Byrt, C. S., Henderson, M., Stork, J., ... & Burton, R. A. (2015). Grape marc as a source of carbohydrates for bioethanol:

chemical composition, pre-treatment and saccharification. *Bioresource technology*, *193*, 76-83.
Corrales, M., Butz, P., & Tauscher, B. (2008). Anthocyanin condensation reactions under high hydrostatic pressure. *Food Chemistry*, *110*(3), 627-635.

Corrales, M., García, A. F., Butz, P., & Tauscher, B. (2009). Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Engineering*, *90*(4), 415-421.

Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D., Tauscher, B., (2008). Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: a comparison. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol*. 9, 85–91.

Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12 (4), 564–582.

Crews, C., Hough, P., Godward, J., Brereton, P., Lees, M., Guiet, S., Winkelmann, W., (2006). Quantitation of the main constituents of some authentic grape-seed oils of different origin. *J. Agric. Food Chem*. 54, 6261–6265.

Cvejić, J., & Atanacković, M. (2015). Effect of wine production techniques on wine resveratrol and total phenolics. In *Processing and Impact on Active Components in Food* (pp. 501-508). Academic Press.

Cvejic, J., & Gojkovic-Bukarica, L. J. (2016). Wine phenolics: Clinical trials. *Red wine consumption and health*, 501-508.

Czochanska, Z., Foo, L. Y., & Porter, L. J. (1979). Compositional changes in lower molecular weight flavans during grape maturation. *Phytochemistry*, *18*(11), 1819-1822.

Da Porto, C., Porretto, E., Decorti, D., (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with
conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (Vitis vinifera L.) seeds. *Ultrason. Sonochem.* 20, 1076–1080.

Da Ros, C., Cavinato, C., Bolzonella, D., Pavan, P., (2016). Renewable energy from thermophilic anaerobic digestion of winery residue: preliminary evidence from batch and continuous lab-scale trials. *Biomass Bioenergy* 91, 150–159.

Di Stefano, R., Cravero, M. C., & Gentilini, N. (1989). Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini. *L'enotecnico*, *25*(5), 83-89.

Dimou, C., Kopsahelis, N., Papadaki, A., Papanikolaou, S., Kookos, I. K., Mandala, I., & Koutinas, A. A. (2015). Wine lees valorization: biorefinery development including production of a generic fermentation feedstock employed for poly (3-hydroxybutyrate) synthesis. *Food Research International*, *73*, 81-87.

Delgado De La Torre, M. P., Priego-Capote, F., & Luque de Castro, M. D. (2015). Tentative identification of polar and mid-polar compounds in extracts from wine lees by liquid chromatography–tandem mass spectrometry in high-resolution mode. *Journal of Mass Spectrometry*, *50*(6), 826-837.

Decreto legislativo del 3 Aprile 2006, n. 152: "Norme in materia ambientale". (https://www.camera.it/parlam/leggi/deleghe/06152dl3.htm)

Decreto del Ministero dell'Ambiente del 13 Ottobre 2016, n.264: "Regolamento recante criteri indicativi per agevolare la dimostrazione della sussistenza dei requisiti per la qualifica dei residui di produzione come sottoprodotti e non come rifiuti" (https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2017/02/15/17G00023/sg)

Decreto del 4 Agosto 2010, n.7407: "Modifiche all'articolo 5 del decreto ministeriale 27 Novembre 2008, n.5396, concernente Disposizioni di attuazione dei regolamenti (CE) n.479/2008 del Consiglio e n.555/2008 della Commissione per quanto riguarda l'applicazione della misura della distillazione dei sottoprodotti della vinificazione". (https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2015/11/11/15A08329/sg)

Deng, Q., Penner, M. H., & Zhao, Y. (2011). Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. *Food Research International*, *44*(9), 2712-2720.

Deng, Q., Zinoviadou, K. G., Galanakis, C. M., Orlien, V., Grimi, N., Vorobiev, E., ... & Barba, F. J. (2015). The effects of conventional and non-conventional processing on glucosinolates and its derived forms, isothiocyanates: extraction, degradation, and applications. *Food Engineering Reviews*, *7*(3), 357-381.

Devesa-Rey, R., Vecino, X., Varela-Alende, J.L., Barral, M.T, Cruz, J.M & Moldes, A.B. (2011). Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling. *Waste Management* 31, 2327–2335.

dos Santos Freitas, L., Jacques, R. A., Richter, M. F., da Silva, A. L., & Caramão, E. B. (2008). Pressurized liquid extraction of vitamin E from Brazilian grape seed oil. *Journal of Chromatography A*, *1200*(1), 80-83.

Dupas de Matos, A., Marangon, M., Magli, M., Cianciabella, M., Predieri, S., Curioni, A. & Vincenzi, S. (2019). Sensory characterization of cucumbers pickled with verjuice as novel acidifying agent. *Food Chemistry* 286, 78-86.

El Darra, N., Grimi, N., Vorobiev, E., Maroun, R. G., & Louka, N. (2013). Pulsed electric field assisted cold maceration of Cabernet franc and Cabernet Sauvignon grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, *64*(4), 476-484.

El Darra, N., Grimi, N., Vorobiev, E., Louka, N., & Maroun, R. (2013). Extraction of polyphenols from red grape pomace assisted by pulsed ohmic heating. *Food and Bioprocess Technology*, *6*(5), 1281-1289.

Enviromental Protection Agency, USA. <http://www.epa.gov/greenchemistry/pubs/about_gc.html>.

Fabbri, A., Bonifazi, G., & Serranti, S. (2015). Micro-scale energy valorization of grape marcs in winery production plants. *Waste management*, *36*, 156-165.

FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations-Statistics Division, 2018. Available from: http://faostat3.fao.org/home/E

Fernandez de Simon, B., Perez-Ilzarbe, J., Hernandez, T., Gomez-Cordoves, C., & Estrella, I. (1992). Importance of phenolic compounds for the characterization of fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *40*(9), 1531-1535.

Ferreira, C.S., de Pinho, M.N., Cabral, L.M.C., 2013. Solid-liquid extraction and concentration with processes of membrane technology of soluble fibres from wine grape pomace. *Téc. Lisb.*, 1–9

Fia, G., Zanoni, B., Gori, C., 2016. A new technique for exploitation of wine lees. *Agric. Agric. Sci. Proc*. 8, 748–754.

Fia, G., Gori, C., Bucalossi, G., Borghini, F., & Zanoni, B. (2018). A Naturally Occurring Antioxidant Complex from Unripe Grapes: The Case of Sangiovese (v. Vitis vinifera). *Antioxidants*, *7*(2), 27.

Fiori, L., Lavelli, V., Duba, K. S., Harsha, P. S. C. S., Mohamed, H. B., & Guella, G. (2014). Supercritical CO2 extraction of oil from seeds of six grape cultivars: Modeling of mass transfer kinetics and evaluation of lipid profiles and tocol contents. *The Journal of Supercritical Fluids*, *94*, 71-80.

Fredericks, I. N., Du Toit, M., & Krügel, M. (2011). Efficacy of ultraviolet radiation as an alternative technology to inactivate microorganisms in grape juices and wines. *Food Microbiology*, *28*(3), 510-517.

Freitas, V. A. P. D., & Glories, Y. (1999). Concentration and compositional changes of procyanidins in grape seeds and skin of white Vitis vinifera varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *79*(12), 1601-1606.

Galanakis, C. M. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*, *26*(2), 68-87.

Gambacorta, G., Antonacci, D., Pati, S., La Gatta, M., Faccia, M., Coletta, A., & La Notte, E. (2011). Influence of winemaking technologies on phenolic composition of Italian red wines. *European Food Research and Technology*, *233*(6), 1057-1066.

García-Lomillo, J., Gonzalez-SanJose, M. L., Del Pino-García, R., Rivero-Perez, M. D., & Muniz-Rodriguez, P. (2014). Antioxidant and antimicrobial properties of wine byproducts and their potential uses in the food industry. *Journal of agricultural and food chemistry*, *62*(52), 12595-12602.

Garcìa-Lomillo, J. & Gonzàlez-SanJosé, ML. (2016). Applications of Wine Pomace in the Food Industry: Approaches and Functions. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol. 16, 2017.

García-Ruiz, A., Cueva, C., González-Rompinelli, E. M., Yuste, M., Torres, M., Martín-Álvarez, P. J., ... & Moreno-Arribas, M. V. (2012). Antimicrobial phenolic extracts able to inhibit lactic acid bacteria growth and wine malolactic fermentation. *Food Control*, *28*(2), 212-219.

Garrido, J., & Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols—A chemical perspective. *Food research international*, *54*(2), 1844-1858.

Gharras, H.E., (2009). Polyphenols: Food sources, properties and applications: A review. *Int. J. Food Sci. Technol*. 44, 2512–2518.

Gil-Muñoz, R., Moreno-Pérez, A., Vila-López, R., Fernández-Fernández, J. I., Martínez-Cutillas, A., & Gómez-Plaza, E. (2009). Influence of low temperature prefermentative techniques on chromatic and phenolic characteristics of Syrah and Cabernet Sauvignon wines. *European Food Research and Technology*, *228*(5), 777-788.

Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges. lre partie: les équilibres des anthocyanes et des tanins. *OENO One*, *18*(3), 195-217.

Glories, Y. (1999). La maturità fenolica delle uve: primo parametro da controllare per una corretta vinificazione in rosso. *Vignevini,* vol.3, pp 46-50.

Gonçalves, R., Mateus, N., & de Freitas, V. (2011). Inhibition of α-amylase activity by condensed tannins. *Food Chemistry*, *125*(2), 665–672.

González-Centeno, M. R., Rosselló, C., Simal, S., Garau, M. C., López, F., & Femenia, A. (2010). Physico-chemical properties of cell wall materials obtained from ten grape varieties and their byproducts: grape pomaces and stems. *LWT-Food Science and Technology*, *43*(10), 1580-1586.

González-Rompinelli, E. M., Rodríguez-Bencomo, J. J., García-Ruiz, A., Sánchez-Patán, F., Martín-Álvarez, P. J., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2013). A winery-scale trial of the use of antimicrobial plant phenolic extracts as preservatives during wine ageing in barrels. *Food Control*, *33*(2), 440-447.
Gori, C., Menichetti, S., & Fia, G. (2014). Multi-Functional Oenological Machine and Use in the Oenological Production Chain. European Patent 2,957,627,22 June 2014.

Green, B. G., Higgins, J., Cowart, B., Rankin, K., Dalton, P., & Shaffer, G. (2007). Evaluating the 'Labeled Magnitude Scale' for Measuring Sensations of Taste and Smell. *Chemical Senses*, *21*(3), 323–334.

Grimplet, J., Deluc, L.G., Cramer, G.R., & Cushman, J.C. (2007). Integrating functional genomics with salinity and water deficit stress responses in wine grape-*Vitis Vinifera*. In M.A.Jenks, P.M. Hasegawa, & S.M. Jain (Eds.) *Advances in molecular breeding drought and salt tolerant crops* (pp.643-6668). Netherlands: Springer.

Guerrero, R. F., Liazid, A., Palma, M., Puertas, B., González-Barrio, R., Gil-Izquierdo, Á., ... & Cantos-Villar, E. (2009). Phenolic characterisation of red grapes autochthonous to Andalusia. *Food Chemistry*, *112*(4), 949-955.

Hagen, K. M., Keller, M., & Edwards, C. G. (2008). Survey of biotin, pantothenic acid, and assimilable nitrogen in winegrapes from the Pacific Northwest. *American Journal of Enology and Viticulture*, *59*(4), 432-436.

Halliwell B. and Whiteman M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology,* 142: 231-55.

Harbertson, J. F., Kennedy, J. A., & Adams, D. O. (2002). Tannin in skins and seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot noir berries during ripening. *American Journal of Enology and Viticulture*, *53*(1), 54-59.

Hogervorst, J. C., Miljić, U., & Puškaš, V. (2017). Extraction of bioactive compounds from grape processing by-products. In *Handbook of Grape Processing By-Products* (pp. 105-135). Academic Press.

Iglesias, H. A., & Chirife, J. (1982). Water sorption parameters for food and food components. *Handbook of food isotherms*, 23-87.

Ignea, C., Dorobanţu, C. M., Mintoff, C. P., Branza-Nichita, N., Ladomery, M. R., Kefalas, P., & Chedea, V. S. (2013). Modulation of the antioxidant/pro-oxidant balance, cytotoxicity and antiviral actions of grape seed extracts. *Food chemistry*, *141*(4), 3967-3976.

Iland, P., Dry, P., Proffitt, T., & Tyerman, S. D. (2011). *The grapevine: from the science to the practice of growing vines for wine*. Patrick Iland Wine Promotions.

ISTAT, Instituto Nazionale di Statistica, 2018. (http://www.inumeridelvino.it/2018/05/la-produzione-di-vino-in-italia-nel-2017-dati-finali-istat.html).

Jakobek, L. (2015). Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food chemistry*, *175*, 556-567

Jellinek, G. (1985). *Sensory evaluation of food. Theory and practice*. Ellis Horwood Ltd..
Katalinìc V, Moˇzina SS, Skroza D, Generali´c, I, Abramoviˇc, H, Miloˇs M, Ljubenkov I, Piskernik

Jordão, A. M., Ricardo-da-Silva, J. M., & Laureano, O. (2001). Evolution of catechins and oligomeric procyanidins during grape maturation of Castelão Francês and Touriga Francesa. *American Journal of Enology and Viticulture*, *52*(3), 230-234.

Katalinić, V., Možina, S. S., Skroza, D., Generalić, I., Abramovič, H., Miloš, M., ... & Boban, M. (2010). Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 Vitis vinifera varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry*, *119*(2), 715-723.

Kaur C. & Kapoor H.C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. *International Journal of Food Science and Technology*, 36, 703- 725.

Kedage, V. V., Tilak, J. C., Dixit, G. B., Devasagayam, T. P., & Mhatre, M. (2007). A study of antioxidant properties of some varieties of grapes (Vitis vinifera L.). *Critical reviews in food science and nutrition*, *47*(2), 175-185.

Koubaa, M., Rosello-Soto, E., Šic Žlabur, J., Režek Jambrak, A., Brncic, M., Grimi, N., ... & Barba, F. J. (2015). Current and new insights in the sustainable and green recovery of nutritionally valuable compounds from Stevia rebaudiana Bertoni. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(31), 6835-6846.

Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2011). Use of unripe grapes harvested during cluster thinning as a method for reducing alcohol content and pH of wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *17*(2), 230-238.

Kuck, L. S., & Noreña, C. P. Z. (2016). Microencapsulation of grape (Vitis labrusca var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. *Food chemistry*, *194*, 569-576.

Kumar, P., Barrett, DM., Delwiche, MJ. & Stroeve, P. (2009). Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind. Eng. Chem. Res*. 48, 3713–3729.

Lachman, J., Hejtmánková, A., Táborský, J., Kotíková, Z., Pivec, V., Střalková, R., ... & Dědina, M. (2015). Evaluation of oil content and fatty acid composition in the seed of grapevine varieties. *LWT-Food Science and Technology*, *63*(1), 620-625.

Lee, C. Y., & Jaworski, A. (1989). Major phenolic compounds in ripening white grapes. *American journal of enology and viticulture*, *40*(1), 43-46

Liang, N. N., He, F., Bi, H. Q., Duan, C. Q., Reeves, M. J., & Wang, J. (2012). Evolution of flavonols in berry skins of different grape cultivars during ripening and a comparison of two vintages. *European Food Research and Technology*, *235*(6), 1187-1197.

Liazid, A., Guerrero, R. F., Cantos, E., Palma, M., & Barroso, C. G. (2011). Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Food Chemistry*, *124*(3), 1238-1243.

Lingua, M. S., Fabani, M. P., Wunderlin, D. A., & Baroni, M. V. (2016). From grape to wine: changes in phenolic composition and its influence on antioxidant activity. *Food chemistry*, *208*, 228-238.

Lustrato, G., Vigentini, I., De Leonardis, A., Alfano, G., Tirelli, A., Foschino, R., & Ranalli, G. (2010). Inactivation of wine spoilage yeasts Dekkera bruxellensis using low electric current treatment (LEC). *Journal of applied microbiology*, *109*(2), 594-604.

Luque de Castro, M.D., & Garcia-Ayuso, L.E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta* 369 (1–2), 1–10.

Makris, D. P., Kallithraka, S., & Kefalas, P. (2006). Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. *Journal of food composition and analysis*, *19*(5), 396-404.

Mathiowitz, E., Kreitz,M.R., & Branon-Prppas, L. (1999). Microencapsulation. In E. Mathiowitz (Ed.), *Encyclopedia of controlled drug* (pp. 493-553). New York : John Wiley and Sons.

Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M., & Velasco, R. (2006). Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. *Journal of agricultural and food chemistry*, *54*(20), 7692-7702.

Mendes, J. A., Xavier, A. M., Evtuguin, D. V., & Lopes, L. P. (2013). Integrated utilization of grape skins from white grape pomaces. *Industrial crops and products*, *49*, 286-291.

Mildner-Szkudlarz, S., Siger, A., Szwengiel, A., Bajerska, J. (2015). Natural compounds from grape by-products enhance nutritive value and reduce formation of CML in model muffins. *Food Chemistry,* 172,78–85.

Miljić U., Puškaš, V., Vučurović, V., & Razmovski, R. (2014). Acceptability of wine produced with an increased content of grape seeds and stems as a functional food. *J. Inst. Brew.* 120, 149–154.

Mohamed, HB., Duba, KS., Fiori, L., Abdelgawed, H., Tlili, I., Tounekti, T. & Zrig, A. (20016). Bioactive compounds and antioxidant activities of different grape (Vitis vinifera L.) seed oils extracted by supercritical CO2 and organic Solvent. *LWT - Food Science and Technology* 74, 557-562.

Mokochinski, J.B., Sovrani, V., Dalla Santa, H.S., Felsner, M.L., Sawaya, A.C.H.F., González-Borrero, P.P., Bataglion, G.A., Eberlin, M.N., & Torres, Y.R. (2015). Biomass and sterol production from vegetal substrate fermentation using Agaricus brasiliensis. *J. Food Qual*. 38 (3), 221–229.

Monteleone, E., Spinelli, S., Dinnella, C., Endrizzi, I., Laureati, M., Pagliarini, E., ... & Bailetti, L. I. (2017). Exploring influences on food choice in a large population sample: The Italian Taste project. *Food quality and preference*, *59*, 123-140.

Motta, S., Guaita, M., Petrozziello, M., Panero, L., & Bosso, A. (2014). Effect of reductive pressing on the concentration of reduced glutathione and phenols in the musts of four Italian cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture*, *65*(4), 471-478.

Mulero, J., Pardo, F., & Zafrilla, P. (2010). Antixidant activity and phenolic composition of organic and conventional grapes and wines. *Journal of Food Composition and Analysis, 23*, 569-574.

Muller-Spath, H. (1992). Der POM-Test. *Deutsche Weinbau*, 23, 1099-1100.

Musialik, M., Kuzmicz, R., Pawłowski, T. S., & Litwinienko, G. (2009). Acidity of hydroxyl groups: an overlooked influence on antiradical properties of flavonoids. *The Journal of organic chemistry*, *74*(7), 2699-2709.

Ninfali, P., & Bacchiocca, M. (2003). Polyphenols and antioxidant capacity of vegetables under fresh and frozen conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2222-2226.

OIV, The International Organisation of Vine and Wine, 2018. Available from: http://www.oiv.int/en/oiv-life/2018-world-wine-production-estimated-2757-mhl

Oliveira, C. M., Ferreira, A. C. S., De Freitas, V., & Silva, A. M. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, *44*(5), 1115-1126.

Oliveira, D.A.; Salvador, A.A.A.S.; Smânia, E.F.A.; Maraschin, M.; Ferreira, S.R.S. (2013). Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids. *J. Biotechnol*. *164*, 423–432.

Öncül, N. & Karabiyikli1, SE. (2015) Factors Affecting The Quality Attributes Of Unripe Grape Functional Food Products. *Journal Of Food Biochemistry* Issn 1745-4514.

Oszmianski, J., Romeyer, F. M., Sapis, J. C., & Macheix, J. J. (1986). Grape seed phenolics: Extraction as affected by some conditions occurring during wine processing. *American Journal of Enology and Viticulture*, *37*(1), 7-12.

Owen, S. C., Lee, M., & Grissom, C. B. (2011). Ultra-performance liquid chromatographic separation and mass spectrometric quantitation of physiologic cobalamins. *Journal of chromatographic science*, *49*(3), 228-233.

Ozdal, T., Capanoglu, E., & Altay, F. (2013). A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, *51*(2), 954-970.

Pardo, JE., Fernández, E., Rubio, M., Alvarruiz, A. & Alonso, GL. (2009). Characterization of grape seed oil from different grape varieties (Vitis vinifera). *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 111, 188–193.

Pascual-Martı, M. C., Salvador, A., Chafer, A., & Berna, A. (2001). Supercritical fluid extraction of resveratrol from grape skin of Vitis vinifera and determination by HPLC. *Talanta*, *54*(4), 735-740.

Pinelo, M., Arnous, A., & Meyer, A.S., (2006). Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends Food Sci. Technol*. 17, 579–590.

Ping. L., Brosse. N., Sannigrahi. P., Ragauskas. A. (2011). Evaluation of grape stalks as a bioresource. *Industrial Crops and Products* 33, 200–204.

Paixao, N., Perestrelo, R., Marques, J. C., & Câmara, J. S. (2007). Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chemistry*, *105*(1), 204-214.

Pérez-Jiménez, J., Díaz-Rubio, M. E., & Saura-Calixto, F. (2013). Non-extractable polyphenols, a major dietary antioxidant: Occurrence, metabolic fate and health effects. *Nutrition Research Reviews*, *26*(2), 118–129.

Poljšak, B., & Dahmane, R. (2012). Free radicals and extrinsic skin aging. *Dermatology research and practice*, *2012*.

Pons, A., Lavigne, V., Darriet, P., & Dubourdieu, D. (2015). Glutathione preservation during winemaking with Vitis vinifera white varieties: Example of Sauvignon blanc grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, *66*(2), 187-194.

Praporscic, I. (2005). *Influence du traitement combiné par champ électrique pulsé et chauffage modéré sur les propriétés physiques et sur le comportement au pressage de produits végétaux* (Doctoral dissertation, Compiègne).

Price, S. F., Breen, P. J., Valladao, M., & Watson, B. T. (1995). Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, *46*(2), 187-194.

Prozil, S. O., Evtuguin, D. V., & Lopes, L. P. C. (2012). Chemical composition of grape stalks of Vitis vinifera L. from red grape pomaces. *Industrial Crops and Products*, *35*(1), 178-184.

Prozil, S.O., Evtuguin, D.V., Silva, A.M.S., & Lopes, L.P.C., (2014). Structural characterization of lignin from Grape Stalks (Vitis vinifera L.). *J. Agric. Food Chem*. 62, 5420–5428.

Robards K. (2003). Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1000**,** 657–691.

Puškaš, V., & Miljic´, U. (2012). Effects of fining on phenolic compounds and colour of red wine obtained with addition of increased amounts of grape solid phase in pomace. *Hem. Ind*. 66, 727–734.

Rajha, H. N., Boussetta, N., Louka, N., Maroun, R. G., & Vorobiev, E. (2014). A comparative study of physical pretreatments for the extraction of polyphenols and proteins from vine shoots. *Food Research International*, *65*, 462-468.

Rajha, H. N., Chacar, S., Afif, C., Vorobiev, E., Louka, N., & Maroun, R. G. (2015). β-Cyclodextrin-assisted extraction of polyphenols from vine shoot cultivars. *Journal of agricultural and food chemistry*, *63*(13), 3387-3393.

Ramírez, M. J., Giraldo, G. I., & Orrego, C. E. (2015). Modeling and stability of polyphenol in spray-dried and freeze-dried fruit encapsulates. *Powder technology*, *277*, 89-96.

Rawel, H. M., Czajka, D., Rohn, S., & Kroll, J. (2002). Interactions of different phenolic acids and flavonoids with soy proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, *30*(3-4), 137-150.

Rawlings, A.V., & Matts, P.J. (2005). Stratum corneum moisturization at the molecular level: an update in relation to the dry skin cycle. *J. Invest. Dermatol*. 124, 1099–1110.

Ribèreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. & Debourdieu, D. (2007). I composti fenolici. *Trattato di enologia II. Chimca del vino-Stabilizzazione e Trattamen*ti. Ediagricole, Dound (Paris), pp. 153-218.

Rodrigues, F., Santos, J., Pimentel, F.B., Braga, N., Palmeira-De-Oliveira, A., & Oliveira, M.B.P.P. (2015). Promising new applications of Castanea sativa shell: nutritional composition, antioxidant activity, amino acids and vitamin E profile. *Food Funct*. 6, 2854–2860.

Roggero, J. P., Coen, S., & Ragonnet, B. (1986). High performance liquid chromatography survey on changes in pigment content in ripening grapes of Syrah. An approach to anthocyanin metabolism. *American Journal of Enology and Viticulture*, *37*(1), 77-83.

Romo Sánchez, S., Gil Sánchez, I., Arévalo-Villena, M., & Briones Pérez, A. (2015). Production and immobilization of enzymes by solid-state fermentation of agroindustrial waste. *Bioproc. Biosyst. Eng*. 38 (3), 587–593.

Rondeau, P., Gambier, F., Jolibert, F., & Brosse, N. (2013). Compositions and chemical variability of grape pomaces from French vineyard. *Industrial Crops and Products*, *43*, 251-254.

Rosello-Soto, E., Koubaa, M., Moubarik, A., Lopes, R. P., Saraiva, J. A., Boussetta, N., ... & Barba, F. J. (2015). Emerging opportunities for the effective valorization of wastes and by-products generated during olive oil production process: Non-conventional methods for the recovery of high-added value compounds. *Trends in Food Science & Technology*, *45*(2), 296-310.

Santos, M. C., Nunes, C., Saraiva, J. A., & Coimbra, M. A. (2012). Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations. *European Food Research and Technology*, *234*(1), 1-12.

Saint-Cricq de Gaulejac, N., Vivas, N., & Glories, Y. (1998). Maturité phénolique: définition et contrôle. *Revue française d'oenologie*, (173), 22-25.

Saura-Calixto, F.(1998). Antioxidant dietary fiber product: A new concept and a potential food ingredient. *J. Agric. Food Chem. 46*, 4303–4306.

Sellappan, S., Akoh, C. C., & Krewer, G. (2002). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *Journal of agricultural and food chemistry*, *50*(8), 2432-2438.

Sharma, A.K., Kumar, R., Azad, Z.R.A.A., & Adsule, P.G., (2015). Use of fine wine lees for value addition in ice cream. *J. Food Sci. Technol*. 52 (1), 592–596.

Shi H., Noguchi N., Niki E. (2001). Introducing natural antioxidants. In: *Antioxidants in food. Pratical applications*. Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M. (Eds), CRC Press, New York.

Silva, L.V., Nelson, D.L., Drummond, M.F.B., Dufosse, L., & Gloria, M.B.A., (2005). Comparison of hydrodistillation methods for the deodorization of turmeric. Food Research International*,* 38 (8–9), 1087–1096.

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, *16*(3), 144-158.

Soares, S., Mateus, N., & De Freitas, V. (2007). Interaction of different polyphenols with bovine serum albumin (BSA) and human salivary α-amylase (HSA) by fluorescence quenching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(16), 6726-6735.

Somogyi A., Rosta K., Pusztai P., Tulassay Z., & Nagy G. (2007). Antioxidant measurements. *Clinical Physics and Physicological measurement*, 28: R41-R55

Soto, M., Falqué, E., & Domínguez, H., (2015). Relevance of natural phenolics from grape and derivative products in the formulation of cosmetics. *Cosmetics,* 2, 259–276.

Spigno, G., & De Faveri, D.M (2007). Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering* 78, 793–801.

Spigno G., Marinoni, L., & Garrido, G. D. (2017) State of the Art in Grape Processing By-products. In *Handbook of Grape Processing By-Products*. Galanakis, C. M., Eds; Elsevier : Chania, Greece, , pp. 1-27.

Spigno, G., Maggi, L., Amendola, D., Dragoni, M., & De Faveri, D.M., (2013a). Influence of cultivar on the lignocellulosic fractionation of grape stalks. *Ind. Crops Prod*. 35, 178–184.

Spigno, G., Donsì, F., Amendola, D., Sessa, M., Ferrari, G., & De Faveri, D.M., (2013b). Nanoencapsulation systems to improve solubility and antioxidant efficiency of a grape marc extract into hazelnut paste. *J. Food Eng*. 114 (2), 207–214.

Spigno, G., Pizzorno, T., & De Faveri, D.M. (2008). Cellulose and hemicelluloses recovery from grape stalks. *Bioresource Technology* 99, 4329–4337.

Soto, M., Falqué, E., & Domínguez, H., (2015). Relevance of natural phenolics from grape and derivative products in the formulation of cosmetics. *Cosmetics* 2, 259–276.

Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D.A., & Garcia-Viguera, C., (2014). Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: a review. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 15638–15678.

Teixeira, N., Mateus. N., de Freitas. V., & Oliveira. J. (2018). Wine industry by-product: Full polyphenolic characterization of grape stalks. *Food Chemistry* 268, 110–117.

Tinello & Lante (2017) Evaluation of antibrowningand antioxidant activities in unripe grapes recovered during bunch thinning. *Australian Journal of Grape and Wine research* 23, 33-41.

Tinello F., Mihaylova D., & Lante A. (2018) Effect of dipping pre-treatment with unripe grape juice on dried "golden delicious" apple slices. *Food and Bioprocess Technology* 11, 2275-2285.

Trombley, J. D., Loegel, T. N., Danielson, N. D., & Hagerman, A. E. (2011). Capillary electrophoresis methods for the determination of covalent polyphenol–protein complexes. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *401*(5), 1523-1529.

Tsai, P. J., & She, C. H. (2006). Significance of phenol− protein interactions in modifying the antioxidant capacity of peas. *Journal of agricultural and food chemistry*, *54*(22), 8491-8494.

Turkmen, N., Sari, F., & Velioglu, Y. S. (2005). The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food chemistry*, *93*(4), 713-718.

Valgimigli, L., Amorati, R., Petrucci, S., Pedulli, G. F., Hu, D., Hanthorn, J. J., & Pratt, D. A. (2009). Unexpected acid catalysis in reactions of peroxyl radicals with phenols. *Angewandte Chemie International Edition*, *48*(44), 8348-8351.

van Golde, P. H., van der Westelaken, M., Bouma, B. N., & van de Wiel, A. (2004). Characteristics of piraltin, a polyphenol concentrate, produced by freeze-drying of red wine. *Life sciences*, *74*(9), 1159-1166.

Van Hoed, V., Barbouche, I., De Clercq, N., Dewettinck, K., Slah, M., Leber, E., Verhé, R., 2011. Influence of filtering of cold pressed berry seed oils on their antioxidant profile and quality characteristics. *Food Chem.* 127, 1848–1855.

Vankar, P.S., 2004. Essential oils and fragrances from natural sources. *Resonance* 9 (4), 30–41.

Vincenzi, S., Dinnella, C., Recchia, A., Monteleone, E., Gazzola, D., Pasini, G., Curioni, A., 2013. Grape seed proteins: a new fining agent for astringency reduction in red wine. *Aust. J. Grape Wine R.* 19, 153–160.

Waterhouse, A. L., & Laurie, V. F. (2006). Oxidation of wine phenolics: A critical evaluation and hypotheses. *American Journal of Enology and Viticulture*, *57*(3), 306-313.

.

Xia, E.-Q., Deng, G.-F., Guo, Y.-J., & Li, H.-B., (2010). Biological activities of polyphenols from grapes. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 622–646.

Xiong, X., Narsimhan, G., & Okos, M. R. (1992). Effect of composition and pore structure on binding energy and effective diffusivity of moisture in porous food. *Journal of Food Engineering*, *15*(3), 187-208

Zanoni, B., Siliani, S., Canuti, V., Rosi, I., & Bertuccioli, M. (2010). A kinetic study on extraction and transformation phenomena of phenolic compounds during

red wine fermentation. *International journal of food science & technology*, *45*(10), 2080-2088.

Zhang, H., Yu, D., Sun, J., Liu, X., Jiang, L., Guo, H., & Ren, F. (2014). Interaction of plant phenols with food macronutrients: characterisation and nutritional–physiological consequences. *Nutrition Research Reviews*, *27*(01), 1–15.

Zhu, Q., Wu, J., Wang, L., Yang, G., & Zhang, X., (2016). Adsorption characteristics of Pb2+ onto wine lees derived biochar. Bull. Environ. *Contam. Toxicol*. 97, 294–299.

Zielinska, A., & Nowa, I., (2014). Fatty acids in vegetable oils and their importance in cosmetic industry. *Chemik* 68, 103–110.

Zinnai, A., Venturi, F., Calamita, Y., & Andrich, G. (2008). l'impiego della criomacerazione nella vinificazione di uve sangiovese. *Bollettino della Comunità Scientifica in Australasia*, 47-56.

Zouboulis, A.I., Lazaridis, N.K., & Matis, K.A., (2002). Removal of toxic metal ions from aqueous systems by biosorptive flotation. *J. Chem. Technol. Biotechnol*. 77, 958–964.