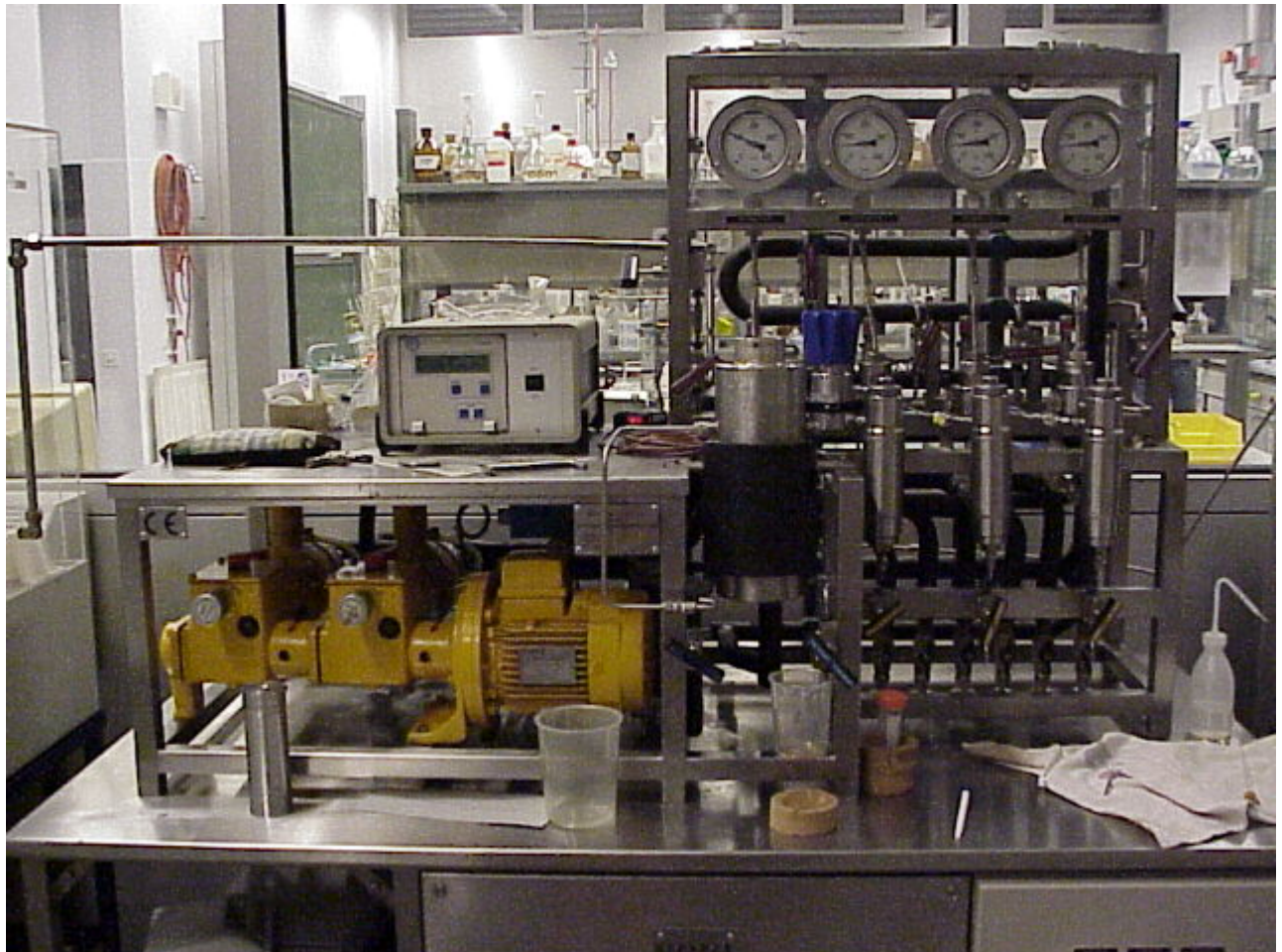


# **TECNICHE DI ESTRAZIONE SELETTIVA DI ANTOCIANI DALLE BUCCE D'UVA DI TIPO MERLOT**



# **TECNICHE DI ESTRAZIONE SELETTIVA DI ANTOCIANI DALLE BUCCE D'UVA DI TIPO MERLOT**

**Andrea Rabufetti 4H e Marco Servalli 4G**

## **Lavoro di maturità in chimica**

**Anno scolastico 2004-2005**

**Liceo Cantonale di Lugano 2, Savosa**

<b>1. RIASSUNTO</b> .....	<b>- 3 -</b>
<b>2. INTRODUZIONE</b> .....	<b>- 4 -</b>
<b>3. OBIETTIVI DELLA RICERCA</b> .....	<b>- 5 -</b>
<b>5. APPROFONDIMENTI TEORICI</b> .....	<b>- 6 -</b>
5.1 VINO E SALUTE .....	- 6 -
5.2 I PRINCIPALI COMPONENTI DEL VINO .....	- 7 -
5.3 CHIMICA DEGLI ANTOCIANI .....	- 8 -
5.4 GAS DENSI QUALI SOLVENTI E FLUIDI DI PROCESSO: LA FASE SUPERCRITICA .....	- 10 -
5.5 L'ANIDRIDE CARBONICA SUPERCRITICA COME SOLVENTE .....	- 11 -
5.6 CHIMICA DELL'ANIDRIDE SOLFOROSA .....	- 11 -
<b>6. PRESCRIZIONI PER LE DERRATE ALIMENTARI: L'ORDINANZA FEDERALE</b> .....	<b>- 14 -</b>
<b>7. STATO DELL'ARTE</b> .....	<b>- 16 -</b>
<b>8. APPARECCHIATURE E METODI IMPIEGATI</b> .....	<b>- 17 -</b>
8.1 ESTRATTORE SUPELCO SFE-400 .....	- 17 -
8.2 APPARECCHIO PER ESTRAZIONE SOXHLET .....	- 17 -
8.3 APPARECCHIO PER BAGNO AD ULTRASUONI SONOREX TK30 .....	- 18 -
8.4 ESTRATTORE A FLUIDI SUPERCRITICI SEPAREX SFE-500 .....	- 18 -
<b>9. SVILUPPO DEL LAVORO</b> .....	<b>- 20 -</b>
<b>10. PARTE SPERIMENTALE</b> .....	<b>- 21 -</b>
10.1 VERIFICHE SULLA SOLUBILITÀ DI ANTOCIANI DI BUCCE FERMENTATE E IDROLIZZATE IN SOLVENTI A POLARITÀ E PH DIVERSI .....	- 21 -
10.1.1 Fermentazione .....	- 21 -
10.1.2 Idrolisi acida .....	- 21 -
10.1.3 Prove di solubilità in provetta .....	- 22 -
10.2 ESTRAZIONE SOXHLET CON METANOLO E ANALISI DELL'ESTRATTO .....	- 24 -
10.2.1 Estrazione Soxhlet .....	- 24 -
10.2.2 Concentrazione dell'estratto .....	- 25 -
10.2.3 Caratterizzazione dell'estratto mediante cromatografia TLC .....	- 27 -
10.2.4. Prova organolettica (degustazione) .....	- 30 -
10.2.5. Prove qualitative di solubilità e colorazione .....	- 31 -
10.3 PROVA DI ESTRAZIONE MEDIANTE BAGNO AD ULTRASUONI .....	- 36 -
10.4 PROVE PREVENTIVE DI ESTRAZIONE MEDIANTE IMPIEGO DI CO <sub>2</sub> QUALE MEZZO DI TRASPORTO DI SOLVENTI ED ESTRATTI .....	- 38 -
10.5 PROVE PRELIMINARI DI ESTRAZIONE CON L'IMPIEGO DI SO <sub>2</sub> E VERIFICA DELL'ESTRATTO .....	- 39 -
10.5.1 Verifica delle proprietà estrattive dell'SO <sub>2</sub> .....	- 39 -
10.5.2 Macerazione in anidride solforosa (H <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> /SO <sub>2</sub> ) .....	- 41 -
10.5.3 Macerazione con metabisolfito di sodio .....	- 42 -
10.5.4 Concentrazione del colore e dell'estratto .....	- 42 -
10.5.5 Caratterizzazione dell'estratto .....	- 44 -
10.5.6 Prove qualitative di solubilità e colorazione .....	- 47 -
10.6 PROVE DI ESTRAZIONE CON CO <sub>2</sub> SUPERCRITICA E SO <sub>2</sub> COME COSOLVENTE .....	- 49 -
10.6.1. Prima estrazione .....	- 50 -
10.6.2. Seconda estrazione .....	- 51 -
10.6.3. Terza estrazione .....	- 52 -
<b>11. CONCLUSIONI FINALI</b> .....	<b>- 55 -</b>
<b>ALLEGATI</b> .....	<b>- 59 -</b>
<b>RINGRAZIAMENTI</b> .....	<b>- 61 -</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>- 62 -</b>

## 1. RIASSUNTO

Con il seguente lavoro sono state sperimentate alcune tecniche estrattive per isolare selettivamente gli antociani dalle bucce d'uva fermentate di tipo Merlot. Sono state studiati metodi di estrazione a riflusso (Soxhlet con metanolo), con ultrasuoni e con gas denso (anidride carbonica allo stato supercritico con l'aggiunta di anidride solforosa come cosolvente).

Le analisi hanno messo in evidenza una discreta solubilità in metanolo degli antociani dopo riscaldamento prolungato a riflusso in ambiente acido delle bucce fermentate. Questo solvente non si mostra però selettivo in quanto l'estratto denota forti caratteristiche tanniniche del tutto sgradite.

Un effetto molto migliore sia per completezza estrattiva sia per selettività è stato osservato utilizzando anidride solforosa quale mezzo per favorire la liberazione e la mobilitazione degli antociani dalla struttura cellulare e di etanolo quale solvente per solubilizzare gli antociani nella forma decolorata e polare assunta da questi nelle condizioni create dall'anidride solforosa. L'azione dell'anidride solforosa viene incrementata dall'anidride carbonica in stato di fluido supercritico nel quale essa può essere sciolta a pressioni superiori a 80 bar. Le bucce trattate con anidride solforosa in CO<sub>2</sub> supercritica e in seguito macerate in etanolo sono risultate molto scolorate ed è stato possibile ottenere un estratto dalle proprietà tipiche degli antociani e con debolissime caratteristiche tanniniche. I risultati permettono di ipotizzare un'estrazione completa, selettiva e diretta degli antociani sottoponendo le bucce fermentate all'azione di un flusso di anidride carbonica supercritica addizionata di anidride solforosa e di etanolo utilizzando la tecnologia dei fluidi supercritici già utilizzata per numerose applicazioni alimentari e farmaceutiche

Foto in copertina: l'impianto Separex SFE-500 del laboratorio del LiLu 2

## 2. INTRODUZIONE

In questi ultimi anni sono state esaltate dagli studiosi le proprietà salutari conseguenti ad un consumo regolare e moderato di vino: in particolare si è osservata una diminuzione del rischio delle malattie cardiovascolari e un contenimento dell'incidenza di malattie di tipo cronico, come i tumori, l'arteriosclerosi e il diabete (vedi approfondimenti teorici punto 5.1). In generale queste proprietà sono state maggiormente evidenziate nei vini rossi e anche se può sembrare strano, quest'ultima constatazione è legata proprio al colore.

Questo è infatti dovuto a particolari sostanze, i polifenoli, e in particolare ai flavonoidi e agli antociani, responsabili appunto della colorazione del vino rosso e di molte altre specie vegetali (i petali dei fiori e i frutti quali mirtilli). Rispetto al vino bianco essi sono presenti infatti in quantità notevolmente maggiori, dell'ordine di circa 20 volte di più. In generale il tasso totale di polifenoli solubili nel vino rosso si situa tra i 2 e i 4 grammi per 75 centilitri<sup>1</sup>. I polifenoli, localizzati nelle bucce, nella polpa e nei semi dell'uva, possiedono inoltre proprietà antiossidanti, atte a rallentare, se non prevenire, le malattie citate nel primo paragrafo.

Dopo il processo di vinificazione le bucce dell'uva rimangono ancora parecchio colorate, e di conseguenza restano ricche di polifenoli antiossidanti che purtroppo non verranno più utilizzati. Durante la produzione del vino, questi composti vengono infatti estratti solo in piccola parte, così come il colore.

Nasce appunto il proposito di estrarre questi polifenoli inutilizzati dopo la vinificazione, per poi inserirli nei vini stessi ottenendo così un duplice vantaggio: non solo si andrebbero ad aumentare le proprietà benefiche e salutari del vino, ma si riscontrerebbe un ulteriore aumento dell'intensità del colore, conseguenza sicuramente ben accetta dai nostri produttori di vino e in particolare del Merlot del Ticino. Inoltre questa pratica sarebbe legalmente ammessa se i polifenoli estratti provenissero dalle stesse bucce di un determinato lotto di vino.

Occorre però sorvegliare che l'estrazione di questi polifenoli, in particolare gli antociani, non comporti la coestrazione di componenti che vadano ad intaccare il gusto e la qualità del vino. È per questo molto importante eseguire un'estrazione selettiva di soli antociani, che non hanno gusto, evitando in particolare i tannini e i residui nell'estratto di un eventuale solvente tossico.

L'idea di studiare l'estrazione selettiva degli antociani (polifenoli responsabili del colore del vino) nasce da un'esigenza espressa dai produttori di vino merlot del Ticino di origine controllata (Marchio Viti), di ottenere per quest'ultimo un colore più intenso. In passato l'obiettivo veniva raggiunto mediante tagli con vini di produzione estera, in particolare della Romagna, detti "rossissimi".

Tale prassi non è ovviamente compatibile con un marchio di qualità DOC.

Diversamente potrebbe essere valutata una procedura che permetta di aumentare l'intensità del colore, nonché le proprietà salutari e antiossidanti (vedi punto 3) del Merlot del Ticino con un ulteriore apporto di antociani provenienti dalle vinacce della stessa produzione.

Una pratica del genere non è stata finora mai applicata. Di conseguenza essa non è contemplata dalle disposizioni di legge. Non ci è possibile dire se tale operazione, nel caso essa possa trovare applicazione industriale, risulterà permessa o meno dall'Ordinanza sulle derrate alimentari al paragrafo "Vino".

### 3. OBIETTIVI DELLA RICERCA

L'obiettivo di questo lavoro consiste nel trovare una tecnica adeguata di estrazione selettiva e possibilmente totale degli antociani rimasti nelle bucce d'uva rossa a vinificazione avvenuta. Tutto questo evitando di compromettere la naturalezza dell'estratto. Il fine è quello di rendere utilizzabili l'estratto, a livello artigianale e industriale, per migliorare il colore e le proprietà salutari del vino rosso ottenuto dalla stessa materia prima che ha generato le bucce residue.

## 5. APPROFONDIMENTI TEORICI

### 5.1 VINO E SALUTE



Come già esplicitato nell'introduzione, si ritiene che il consumo ragionato e ragionevole di vino possa prevenire o per lo meno ridurre il rischio di malattie cardiovascolari e, sulla base dei riscontri epidemiologici, che possa contenere l'incidenza di malattie croniche, quali il cancro, l'arteriosclerosi, il diabete, l'invecchiamento, le degenerazioni articolari e del tessuto connettivo, alla cui origine vi è l'azione aggressiva dei radicali liberi ossigenati. La constatazione delle proprietà terapeutiche del vino è già

stata resa nota nel 1991.<sup>2</sup>

Un polifenolo molto celebrato è il resveratrolo<sup>3</sup>, che si concentra nella buccia dell'acino ed è prodotto dalla vite per difendersi dall'attacco di funghi e insetti. Il meccanismo di protezione cardiovascolare di questo composto, il cui fabbisogno giornaliero ammonta a 2-2,5 milligrammi contenuto in 3-4 bicchieri di vino, è riconducibile alla sua azione antiossidante ed antinfiammatoria. È infatti una molecola capace di captare e neutralizzare particelle ossidanti e radicali liberi generati dal metabolismo lipidico, addirittura protegge dal degrado le altre vitamine antiossidanti presenti nell'organismo e riduce l'effetto nocivo di metalli come il ferro e il rame. Provoca inoltre la morte per apoptosi di numerose cellule tumorali ed inibisce la proliferazione di queste ultime. Il resveratrolo come gli altri polifenoli, grazie al suo potenziale antiossidante limita gli effetti nefasti causati dall'ossidazione dei tessuti e contrasta l'insorgere delle affezioni croniche sopraccitate.<sup>4</sup>

Fra i 4000 componenti del vino, i polifenoli, oltre 200, sono costituiti da molecole a struttura ciclica esagonale. Per progressiva associazione, la complessità molecolare aumenta dal più semplice ma celebrato resveratrolo ai polifenoli flavonoidi, che si differenziano in flavonoidi, antociani e proantociani (pigmenti rossi e blu), flavonoli, tannini flavonoli e flavononoli. Anche i polifenoli tannici sono in grado di captare e neutralizzare i radicali liberi e gli ossidanti ( $\text{OH}^\circ$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), grazie ai numerosi gruppi idrossilici che possiedono. Per questo si consiglia un consumo moderato e regolare di vino durante i pasti. Veicolo di antiossidanti, oltre che efficiente, in quanto assecondato dall'ambiente alcolico e lipidico intestinale. L'abuso di alcol genera per contro uno stress ossidativo con elevata produzione di radicali, per questo non sempre il vino viene visto di buon occhio: ci sono altri alimenti come il tè e le cipolle che contengono quantità di polifenoli molto maggiori.<sup>5</sup>

## 5.2 I PRINCIPALI COMPONENTI DEL VINO<sup>6</sup>

Viene qui riportato di seguito un elenco dei principali componenti del vino, suddivisi in categorie. Importante notare le tre principali: colore, profumo e gusto.

### **Composizione chimica del vino**

**ACQUA** 85% - 90%

### **COLORE**

#### **nei vini rossi**

- antociani 200 – 500 mg/l ed in parte tannini

#### **nei vini bianchi**

- leucoantociani e tannini 15 – 20 mg/l
- a volte clorofilla

### **PROFUMO**

#### **a) aromi primari**

(provengono direttamente dall'uva)

- terpeni (linaiololo, geraniolo,  $\alpha$ -terpineolo, neroli, citronellolo)

#### **b) aromi secondari**

(si formano dalla fermentazione alcolica)

- alcoli superiori, esteri, acidi, ecc...

#### **c) aroma terziario o bouquet**

(si forma soprattutto nell'invecchiamento in bottiglia)

- esteri dell'alcol etilico e di alcoli superiori
- aldeidi, chetoni acetali, lattoni, ecc...

### **GUSTO**

#### **a) sostanze dal sapore dolce** (morbidezza)

- zuccheri residui: fruttosio e glucosio (variabili)
- alcol etilico 50 – 150 g
- glicerina 4 – 18 g
- pentosi 1 g
- colloidi (pectine, gomme, mucillagini) 0,5 – 1 g

#### **b) sostanze dal sapore acido** (acidità)

- acido tartarico 5 – 6 g
- acido malico 0,5 – 5 g
- acido citrico 0,1 – 0,5 g
- acido lattico 1 – 1,5 g
- acido succinico 0,5 – 1,5 g
- acido acetico 0,3 – 1 g

#### **c) astringenza (tannino)**

- nei vini rossi 1- 3 g
- nei vini bianchi 20 – 50 mg

#### **d) sostanze dal sapore salato**

- sali minerali e Sali acidi organici 2 – 3 g

**e) sostanze dal sapore amaro**

- chinoni, solfuri, ecc...

**ALTRE SOSTANZE            anidride carbonica (variabile)**

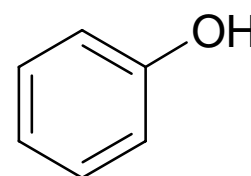
Si noti subito l'incredibile differenza della composizione chimica tra vino bianco e vino rosso per quanto riguarda gli antociani: quest'ultimo ne contiene una quantità 20 volte superiore al primo. Lo si poteva tranquillamente dedurre data l'enorme differenza di colore.

Ancora più importante da notare è che i suddetti antociani si trovano unicamente nella categoria colore: ciò significa che non possiedono né profumo, né gusto. Questa constatazione è di grande interesse, poiché si capisce l'importanza di eseguire un'estrazione altamente selettiva: così facendo il gusto e il profumo del vino rimarrebbero inalterati dopo l'inserimento dell'estratto; questo andrebbe invece a migliorare colore e qualità terapeutiche.

**5.3 CHIMICA DEGLI ANTOCIANI****POLIFENOLI<sup>7</sup>**

Composti contenenti più fenoli (vedi figura 2).

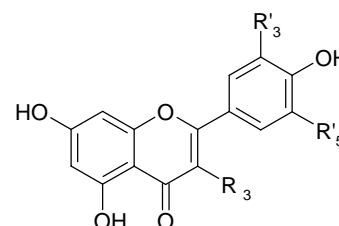
Il fenolo è un composto aromatico (derivato monossidrilato del benzene), di formula  $C_6H_5OH$ . Il fenolo fu scoperto nel 1834 da Runge nel catrame di carbon fossile, da cui si ottiene tuttora. Il fenolo è un solido incolore, spesso più o meno colorato per la presenza di impurezze. È caustico e molto tossico. Viene impiegato per la sintesi di numerose sostanze coloranti, di medicinali, dell'acido salicilico, dell'acido picrico, delle bacheliti, del nailon. I polifenoli sono derivati più volte ossidrilati dei nuclei aromatici: molti si trovano allo stato naturale liberi o sotto forma di glucosidi.

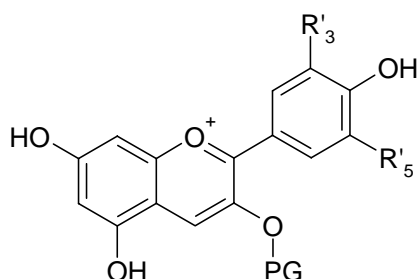
**Fig. 2** Struttura del fenolo**FLAVONOIDI<sup>8</sup>**

Tipi di polifenoli (vedi figura 3), sono molecole ampiamente distribuite nei tessuti delle piante, nei quali spesso agiscono da pigmento e sono responsabili del colore giallo, viola, rosso e blu. Essi possono essere presenti liberi oppure in forma glicosidata, si raggruppano in flavonoli, flavanoli, flavanoni, flavoni, isoflavoni, antociani e proantociani.

Possiedono un potere antiossidante (sottrattori di radicali liberi e molecole che si legano ai metalli, funzione chelante) e sono costituenti fondamentali dell'alimentazione umana.

Le principali fonti di questi composti sono il tè, le cipolle, il vino rosso e le mele.

**Fig. 3** Formula di struttura di un flavonoide

**ANTOCIANI<sup>9</sup>**

**Fig. 4** Formula di struttura generale di un antociano.

Pigmenti azzurri, rossi o violetti che si trovano nei fiori e nelle bucce d'uva. Sono chimicamente dei glucosidi (composti chimici creati per condensazione a partire da un monosaccaride e da una sostanza diversa) i cui agliconi (le parti non zuccherine dei glucosidi) vengono chiamati antocianidine (vedi figura 4). Hanno la caratteristica di cambiare colore secondo il pH dell'ambiente in cui si trovano immersi. Come già detto, gli antociani (dal greco *antos* = fiore e *cianos* = azzurro) e le antocianidine sono responsabili del colore rosso delle uve prima e del colore rosso-violetto dei vini

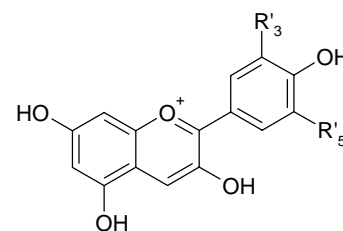
novelli. Durante l'invecchiamento del vino si aggregano formando dei polimeri detti flavanoli i quali sono poco solubili nel vino e precipitano; per tale ragione il vino con il tempo tende a schiarirsi.

**ANTOCIANINE<sup>10</sup>**

Sono flavonoidi e quindi una derivazione degli antociani. Sono composte da antocianidine combinate con molecole glucidiche quali il glucosio.

**ANTOCIANIDINE<sup>11</sup>**

Derivati degli antociani, delle antocianine e delle proantocianidine (vedi figura 5). Si legano con composti di natura glucidica per formare i composti appena citati. Nell'uva sono stati identificati solamente sei antocianidine: cianidolo, peonidolo, malvidolo, petunidolo, delphinidolo e pelargonidolo che, combinandosi chimicamente con gli zuccheri, (ramnosio, glucosio) formano le antocianine.



**Fig. 5** Formula di struttura delle antocianidine

**PROANTOCIANIDINE<sup>12</sup>**

Gli sforzi della ricerca indirizzati all'identificazione di nuove terapie naturali hanno condotto alla scoperta della presenza di numerosi componenti ad elevato potere antiossidante all'interno degli acini d'uva della specie *Vitis vinifera*. Tali componenti, le cosiddette proantocianidine oligomeriche (conosciute anche con la sigla OPCs), possiedono proprietà antinfiammatorie, antimutagene ed antiedematose. Sono i principali responsabili delle molteplici virtù dell'estratto secco di acini d'uva. Le principali applicazioni di questo estratto riguardano, proprio in seguito all'alto potere antiossidante, la protezione dei vasi sanguigni e della retina, la prevenzione delle patologie dell'apparato cardiovascolare, nonché delle allergie e della degenerazione del collagene presente nei tessuti.

Se riscaldate con acidi minerali diluiti, formano delle antocianidine.

## 5.4 GAS DENSI QUALI SOLVENTI E FLUIDI DI PROCESSO: LA FASE SUPERCRITICA<sup>13</sup>

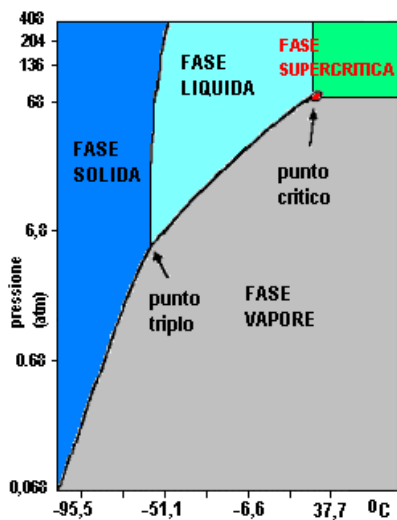


Fig. 6 Esempio di diagramma di fase per la CO<sub>2</sub>

Ogni sostanza chimica possiede tre stati di aggregazione: solido, liquido e aeriforme; questi stati variano a seconda della temperatura e della pressione. A volte è utile conoscere in quale forma si trovi un determinato composto: un modo semplice consiste nel costruire un diagramma di fase (o diagramma di stato): una rappresentazione grafica delle relazioni pressione – temperatura, applicata agli equilibri fra le fasi della sostanza in esame (vedi figura 6). Si possono principalmente distinguere tre curve che separano tre aree e si intersecano in un punto comune. I punti appartenenti alla curva che separa la fase solida da quella aeriforme (curva della pressione di vapore del solido) corrispondono a temperature e pressione per le quali i due stati solido e aeriforme sono in equilibrio; quelli appartenenti alla curva che separa la fase solida da quella liquida corrispondono invece alle temperature e alle pressioni per le quali gli stati solido e liquido sono in equilibrio; infine i punti sulla curva separante

fase liquida e vapore (curva della pressione di vapore del liquido) corrispondono ai valori di pressione e temperatura per cui stato liquido e vapore sono in equilibrio. Il punto comune in cui si intersecano le tre curve è detto punto triplo: a questo valore di pressione e temperatura, tutti e tre gli stati di aggregazione sono in equilibrio. Ogni sostanza possiede un punto triplo caratteristico dipendente dal bilanciamento tra le forze intermolecolari nel solido, nel liquido e nel vapore. Si osserva infine che la curva della pressione di vapore del liquido termina in un punto: esso è il punto critico. La temperatura corrispondente a questo punto è detta temperatura critica  $T_C$  (temperatura massima alla quale è possibile liquefare il vapore per aumento di pressione) mentre la pressione è detta pressione critica  $P_C$  (pressione necessaria alla liquefazione alla temperatura critica). Al di sopra della temperatura critica non può esistere una fase liquida, indipendentemente dal valore della pressione. Quindi cosa accade realmente? Al punto critico vapore e liquido hanno uguale densità e non sono più distinguibili (vedi figura 7); creano così un'unica fase omogenea: un fluido allo stato supercritico (FSC). Il sistema si trova dunque in uno stato intermedio tra liquido e aeriforme, passando allo stato di vapore con un abbassamento della temperatura e/o della pressione, o restando in uno stato supercritico applicando un rispettivo aumento di pressione e temperatura.

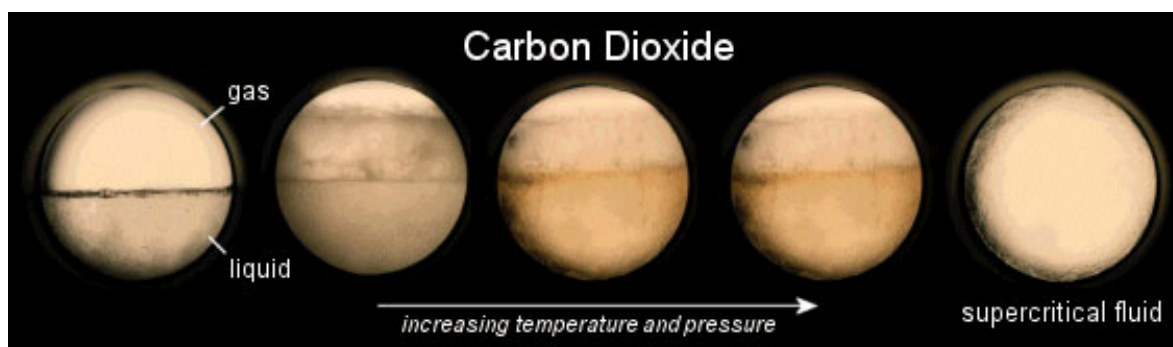


Fig. 7 Fotogrammi che illustrano la sequenza della transizione a CO<sub>2</sub> superfluido (foto NASA)

### 5.5 L'ANIDRIDE CARBONICA SUPERCRITICA COME SOLVENTE<sup>14</sup>

Per Fluido Supercritico (FSC) si intende un fluido in condizioni di temperatura e pressione superiori ai valori critici. Particolarmente interessanti sono le sostanze a basso peso molecolare aventi una temperatura critica prossima a quella ambiente ( $T_C \sim 10-40 \text{ }^\circ\text{C}$ ) ed una pressione critica non troppo elevata ( $P_C \sim 40-60 \text{ bar}$ ). Gli idrocarburi leggeri hanno queste proprietà fisiche ma presentano il problema dell'infiammabilità e della tossicità. Certi clorofluorocarburi (CFC) si prestano allo scopo ma sono relativamente costosi se ottenuti ad elevato grado di purezza e sono oggi proibiti a causa dei danni ambientali che causano. L'anidride carbonica, pur avendo una pressione critica leggermente maggiore ( $P_C = 72.1 \text{ bar}$ ), offre altre vantaggiose proprietà che ne fanno il fluido più impiegato nelle applicazioni SC: non è infiammabile, non è tossica, si può ottenere a basso costo anche ad elevate purezze e non presenta alcun pericolo dal punto di vista ambientale, inoltre le condizioni supercritiche sono più che abbordabili:  $P_C = 72.1 \text{ bar}$  e  $T_C = 31 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

La possibilità di modulare la densità dei FSC grazie a modeste variazioni di temperatura e pressione, rappresenta il fattore caratterizzante di questi fluidi.

Le proprietà fondamentali dell'estrazione con fluidi supercritici (SFE, Supercritical Fluid Extraction) possono così riassumersi:

- potere solvente e selettività del fluido impiegato modificabile tramite temperatura e pressione;
- il fluido impiegato è un gas non infiammabile avente una totale accettabilità ambientale;
- le temperature operative ne fanno una tecnologia "fredda";
- è possibile modulare la pressione oltre che la temperatura per ottimizzare sia il processo di estrazione sia quello di separazione.

Occorre inoltre dire che le condizioni operative della  $\text{CO}_2$  supercritica sono compatibili con le esigenze dei composti biologici sensibili al calore. Ciò la rende particolarmente interessante per l'industria agro-alimentare, ed è proprio in questo campo che viene maggiormente utilizzata. L'estrazione mediante biossido di carbonio presenta però qualche limite: essendo  $\text{CO}_2$  una molecola apolare, non si presta all'estrazione di sostanze con gruppi alcolici OH e acido-carbossilici COOH entrambi polari: occorre ricordare che il simile scioglie il simile, di conseguenza un solvente apolare non si presta su di un soluto polare. Per questo zuccheri e aminoacidi non possono venire estratti efficacemente con l'anidride carbonica, anche con l'aggiunta di cosolventi polari come acqua, etanolo e metanolo.<sup>15</sup>

### 5.6 CHIMICA DELL'ANIDRIDE SOLFOROSA<sup>16</sup>

L'anidride solforosa ( $\text{SO}_2$ ) è l'unico antisettico permesso in enologia. Ha diversi effetti<sup>17</sup>:

- antiossidante: protegge il vino dall'ossigeno dell'aria (il vino infatti è un composto ossidabile);
- solubilizzante: facilita l'estrazione dalle bucce delle sostanze coloranti;
- potere coagulante: favorisce la sedimentazione dei composti colloidali dei mosti;

- effetto antisettico: inibisce lieviti, batteri ed attua anche un'azione di selezione sui lieviti;
- effetto miglioratore delle proprietà organolettiche: permette di conservare la freschezza dell'aroma.

Nel vino l'anidride solforosa si trova sotto due forme: libera e combinata; la loro somma dà l'anidride solforosa totale. La  $\text{SO}_2$  libera è la più importante in quanto è quella che esplica principalmente l'azione antisettica ed antiossidante. Il suo tenore deve essere sempre intorno ai 15-20 mg/l e bisogna tenerlo controllato in quanto tende a diminuire. Il tasso di  $\text{SO}_2$  combinato aumenta quando si solfito e diminuisce quando diminuisce la solforosa libera.

Nel caso della vinificazione in rosso, si ritiene che la solfitazione favorisca la dissoluzione delle sostanze minerali, degli acidi organici e soprattutto dei composti fenolici (antociani e tannini), che costituiscono la sostanza colorante dei vini rossi. L'azione dissolvente è dovuta alla distruzione delle cellule della buccia, che così cedono più facilmente i loro costituenti solubili<sup>18</sup>. L'efficacia delle macerazioni solfitiche nell'estrazione dei pigmenti dell'uva è indiscutibile; da non dimenticare che questo procedimento viene impiegato per la preparazione industriale di un colorante commerciale<sup>19</sup>.

Per solfitare si utilizzano principalmente i cosiddetti solfitometri che contengono  $\text{SO}_2$  liquida, oppure il metabisolfito di potassio che è un sale dell'acido solforoso ( $\text{H}_2\text{SO}_3$ ). La quantità di  $\text{SO}_2$  da utilizzare dipende da molti fattori ed ogni vasca ha bisogno di un diverso quantitativo. Nella moderna enologia l'utilizzo di molte nuove tecniche, ha portato all'utilizzo sempre minore di questo antisettico che però rimane importantissimo in alcune fasi della vinificazione. Ovviamente il suo impiego è soggetto a leggi che ne regolano le dosi. Se la dose di  $\text{SO}_2$  immessa è troppo elevata il vino assumerà un sapore ed un odore pungente ed un retrogusto non gradevole.

Viene qui di seguito riportata una scheda tecnica generale dell'anidride solforosa<sup>20</sup>:

<b>Nome</b>	anidride solforosa; ossido di zolfo; ossido solforoso; bisolfito	
<b>Formula chimica</b>	$\text{SO}_2$	$\text{O}=\text{S}=\text{O}$
<b>Peso molecolare</b>	64.06 g/mol	

#### **Proprietà fisiche:**

Gas incolore, non infiammabile, forte odore soffocante, tossico.

$$P_{\text{fus}} = -76^\circ\text{C}$$

$$P_{\text{eb}} = -10,1^\circ\text{C}$$

$$\text{Densità liquido (1,013 bar a } P_{\text{eb}}) = 1,458 \text{ kg/m}^3$$

$$\text{Densità gas (1,013 bar a } P_{\text{eb}}) = 3,049 \text{ kg/m}^3$$

$$P_c = 78,84 \text{ bar}$$

$$T_c = 157,65^\circ\text{C}$$

#### **Solubilità**

L'anidride solforosa è solubile in acqua, alcoli e numerosi composti organici come etere e cloroformio.

**Tossicità**

L'anidride solforosa è irritante per gola, occhi ed è estremamente tossica per le vie respiratorie. Lunghe esposizioni provocano irritazioni agli occhi, al naso e alla gola, rinorrea, tosse, bronco ostruzioni, bruciature alla pelle e agli occhi. Una prolungata esposizione a concentrazione di 20 ppm in volume nell'aria risulta impossibile, provocando rapidamente edema polmonare e coma per soffocamento.

**Produzione**

SO<sub>2</sub> viene prodotta dalla combustione dello zolfo o della pirite in appositi forni.

**Principali utilizzi<sup>21</sup>**

- È il materiale di base per la produzione dell'acido solforico H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; se sciolta in acqua, l'anidride solforosa forma l'acido solforoso H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>;
- Viene utilizzata nell'industria alimentare come conservante, disinfettante e candeggiante, soprattutto in campo enologico;
- Nell'industria dei tessuti è essenzialmente usata come decolorante;
- SO<sub>2</sub> liquida funge da solvente.

## 6. PRESCRIZIONI PER LE DERRATE ALIMENTARI: L'ORDINANZA FEDERALE<sup>22</sup>

Dall' "Ordinanza sulle derrate alimentari (ODerr)" pubblicata dalla Cancelleria federale, 2004; diffusione UFCL, Distribuzione pubblicazioni, CH-3003 Berna.

### **Capitolo 36:**

#### **Vino, vino-mosto pastorizzato in fase di fermentazione, prodotti contenenti vino**

##### **Sezione 1: Vino**

#### **Art. 367** Categorie di vini

<sup>1</sup>I vini sono suddivisi in tre categorie:

- a. categoria 1: vini con denominazione di origine controllata;
- b. categoria 2: vini con denominazione di provenienza;
- c. categoria 3: vini senza denominazione di origine controllata o di provenienza

<sup>2</sup>Per la produzione di vini svizzeri devono essere utilizzati i mosti d'uva corrispondente a queste categorie, conformemente all'articolo 64 capoverso 1 della legge del 29 aprile 1998 sull'agricoltura.

#### **Art. 368** Esigenze minime e caratteristiche di composizione

<sup>1</sup>Il vino deve presentare un tenore alcolico totale (acquisito e potenziale) di almeno 7 per cento in volume e un tenore alcolico acquisito di almeno 5,5 per cento in volume.

<sup>2</sup>Possono essere aggiunti i seguenti ingredienti:

- a. sciroppo zuccherino, per ottenere la fermentazione secondaria, nella produzione di vini spumanti o frizzanti;
- b. sciroppo di dosaggio, nella produzione di vini spumanti o frizzanti;
- c. anidride carbonica per la produzione di vini spumanti o frizzanti con anidride carbonica aggiunta secondo l'articolo 366 lettere f e g.

<sup>3</sup>[...]

<sup>4</sup>[...]

#### **Art. 369** Decolorazione

È vietata la decolorazione del vino rosso e del vino rosato.

#### **Art. 371** Taglio

<sup>1</sup>Per taglio s'intende la miscelazione di uve, mosti d'uve o vini di origine o provenienza diverse.

<sup>2</sup>Fatti salvi i capoversi 3 e 5 è vietato:

- a. il taglio di vini svizzeri delle categorie 1 e 2 con vini esteri;
- b. il taglio di vini esteri delle categorie 1 e 2.

<sup>3</sup>Per quanto riguarda il taglio di vino svizzero con vino svizzero vale quanto segue:

- a. il vino della categoria 1 può essere tagliato fino al 10 per cento con vini di ugual colore;
- b. il vino della categoria 2 può essere tagliato fino al 15 per cento con vini di ugual colore.

<sup>4</sup>Il vino della categoria 3 può essere tagliato a piacimento.

<sup>5</sup>Il vino estero con una denominazione d'origine protetta o un'altra denominazione protetta ai sensi di una legislazione estera, deve corrispondere, alla consegna, alla legislazione estera in questione per quanto riguarda taglio e denominazione specifica.

Come cita l'articolo 371 paragrafo 3 inerente il taglio dei vini, sarebbe permessa un'aggiunta di vino svizzero ad un altro vino svizzero (di origine e denominazione controllata) entro certi limiti. Non bisogna infatti tagliare oltre il 10%. L'articolo rimane comunque ambiguo per quanto riguarda il colore del vino da utilizzare per il taglio: non si capisce se deve essere uguale al vino tagliato il colore (rossi con rossi, bianchi con bianchi, rosé con rosé), oppure l'intensità del colore. A rigor di logica si suppone che debba essere l'intensità del colore ad essere la stessa, poiché altrimenti si andrebbe ad alterare proprio la colorazione del vino tagliato.

## 7. STATO DELL'ARTE

Le attuali leggi svizzere, come si evidenzia nel punto precedente, non permettono l'aggiunta al vino di sostanze estranee all'uva e ai processi di vinificazione (tranne qualche eccezione). L'estrazione massiccia e selettiva di antociani, e più in particolare dell'enocianina<sup>23</sup>, il principale colorante delle bucce d'uva, avviene tuttora a livello industriale. Questo avviene con l'ausilio di anidride solforosa: più precisamente si può schematizzare il ciclo lavorativo di un procedimento di estrazione dell'enocianina nelle seguenti fasi:<sup>24</sup>

- Macerazione delle vinacce in SO<sub>2</sub> o diffusione: una massa di buone vinacce di uve appropriate viene lasciata a bagno (macerazione) in una soluzione di anidride solforosa al 5-6%, l'azione distruttiva di questa sulle cellule delle bucce (diffusione solido-liquido) permette quindi la fuoriuscita di molecole antocianiche;
- Riposo e defecazione;
- Concentrazione con recupero o meno dell'alcole.

Secondo questo metodo un'estrazione con resa soddisfacente è possibile solo da uve che sono particolarmente ricche di enocianina e altri antociani, da considerarsi però estranee alle uve Merlot.

Dal momento che la legislazione svizzera che non permette l'aggiunta di sostanze che non appartengano allo stesso lotto di uva con cui è stato prodotto il suo vino, pena la perdita del marchio, l'utilizzo di estratti da uve estranee non è praticabile.

Inoltre una estrazione industriale richiede quantità di uva elevate, che sicuramente i piccoli produttori di vino (ai quali si dedica principalmente questo lavoro di ricerca) non avrebbero a disposizione. Per questo occorre trovare metodi alternativi ed efficaci di estrazione.

Va inoltre detto che il campo dell'aggiunta di sostanze originali della stessa uva allo stesso vino e di estratti concentrati ottenuti con solventi inerti è sostanzialmente inesplorato. Come detto al momento non si dispongono di metodi che permettano di recuperare da un lotto di uva sostanze originarie che possano poi essere inserite al vino prodotto da questo stesso lotto.

L'estrazione per contatto prolungato con acqua a temperatura elevata fa rischiare il degrado delle sostanze biologiche e inoltre produce la coestrazione di composti indesiderati (tannini in particolare) che generano in seguito dopo l'aggiunta al vino una modificazione del gusto. L'impiego dell'anidride solforosa sarebbe da riferire alle sue proprietà distruttive sulla struttura delle bucce che facilitano la liberazione degli antociani.<sup>25</sup>

Perciò questo lavoro è volto allo sviluppo di nuove tecniche adatte allo sviluppo di nuovi metodi che possano ampliare il campo dell'arte, agevolando le produzioni di vino locali e rispettando i principi ai quali si rifà l'attuale legislazione.

## 8. APPARECCHIATURE E METODI IMPIEGATI

### 8.1 ESTRATTORE SUPELCO SFE-400<sup>26</sup>

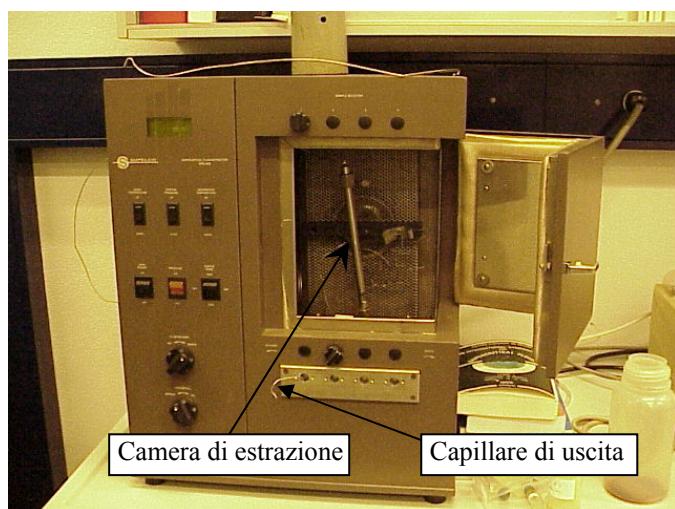


Fig. 9 L'estrattore a fluidi supercritici Supelco SFE-400

L'apparecchio Supelco SFE-400 è un estrattore a fluido supercritico (vedi figura 9). È un apparecchio in scala analitica che non permette grandi estrazioni, ma risulta molto utile per eseguire degli studi preliminari sulla fattibilità della tecnica: con la capienza della camera di estrazione pari a 10 ml (circa 2-4 g di materia prima), si ottengono infatti piccole quantità di estratto, adatte appunto alle analisi; purtroppo però, l'impianto non permette la misurazione della quantità del flusso di solvente in circolo.

L'estratto viene raccolto in un recipiente dall'estremità del capillare proveniente dalla camera di estrazione, questo permette inoltre la fuoriuscita di CO<sub>2</sub> che si disperde poi nell'ambiente circostante. Tuttavia il sistema di separazione dell'estratto mediante il capillare molto fine e non riscaldato, come si vedrà nella parte sperimentale del lavoro, pone spesso problemi di otturazione dello stesso.

### 8.2 APPARECCHIO PER ESTRAZIONE SOXHLET

L'estrattore Soxhlet (vedi figura 10) è un apparecchio utilizzato per estrazioni durante le quali il solvente è in continuo riflusso: si tratta di un tipo di percolazione. Esso è composto da una camera munita di un sifone e di un tubo laterale, al quale va montato un refrigerante all'estremità superiore, e un recipiente contenente il solvente all'estremità inferiore. I vapori che si sviluppano dal riscaldamento del solvente, salendo lungo il tubo laterale di bypass, unico percorso possibile, entrano nel corpo centrale per poi salire nel refrigerante. Qui condensano e ricadono allo stato liquido nel ditale filtrante (sostituibile) contenente il campione di materia dal quale si vogliono estrarre le sostanze, fino a riempire l'estrattore al livello del sifone, attraverso cui il liquido si scarica nuovamente nel pallone. A questo punto l'estrazione diventa continua, automatica ed autosufficiente con il risultato che il campione nel ditale viene sottoposto a ripetuti passaggi di solvente puro; questo rende il processo molto più efficiente di una macerazione statica in un solvente in cui la concentrazione dei residui estratti aumenta costantemente, raggiungendo uno stato di equilibrio che impedisce progressivamente la liberazione e l'accumulo dei composti estratti della matrice. Inoltre il ditale filtrando il prodotto solido impedisce pure che il materiale solido vada a bloccare il tubo del sifone.

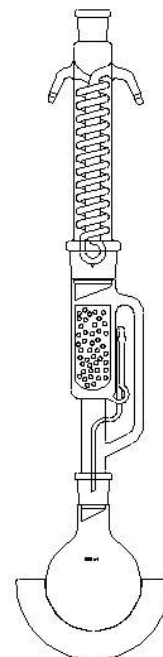


Fig. 10 Estrattore Soxhlet

### 8.3 APPARECCHIO PER BAGNO AD ULTRASUONI SONOREX TK30



Fig. 11 Bagno ad ultrasuoni Sonorex TK30

Questo apparecchio consiste in una bacinella d'acqua collegata ad un generatore di ultrasuoni a frequenza 50kHz, attivabile con un timer che ne determina il periodo di accensione (vedi figura 11). Gli ultrasuoni vengono utilizzati per permettere una disgregazione delle strutture vegetali, in particolare cuticole e membrane, rendendone più solubili le componenti interne<sup>27</sup>. Il materiale che si vuole sottoporre al trattamento viene trasferito in una beuta o in un bicchiere che viene immerso nell'acqua dell'apparecchio ad ultrasuoni.

### 8.4 ESTRATTORE A FLUIDI SUPERCRITICI SEPAREX SFE-500<sup>28</sup>

Questo impianto in scala laboratorio-piccolo pilota può essere considerato il “fratello maggiore” dell'apparecchio Supelco. Infatti l'SFE-500 permette carichi fino a 30 volte superiori. Con questo apparecchio è possibile operare fino a pressioni pari a 300 bar e a temperature fino a 80°C, e grazie alla sua pompa a membrana a doppia testata con motore unico, può movimentare una portata di gas fino a 5Kg/h. La CO<sub>2</sub> viene pompata dalla bombola in fase liquida e compressa nella pompa alla pressione desiderata. La valvola permette di regolare manualmente la pressione nella camera di estrazione. La CO<sub>2</sub> prima di entrare nella camera d'estrazione può venir portata alla temperatura voluta (20-80°C) tramite uno scambiatore di calore. Entrando nella camera viene in contatto con la materia introdotta nella camera d'estrazione e comincia il processo d'estrazione trasportando l'estratto fuori dalla camera. Grazie ai 3 separatori presenti è possibile recuperare il materiale estratto mediante salti di pressione che riducono il potere solvente della CO<sub>2</sub> (vedi figura 12).

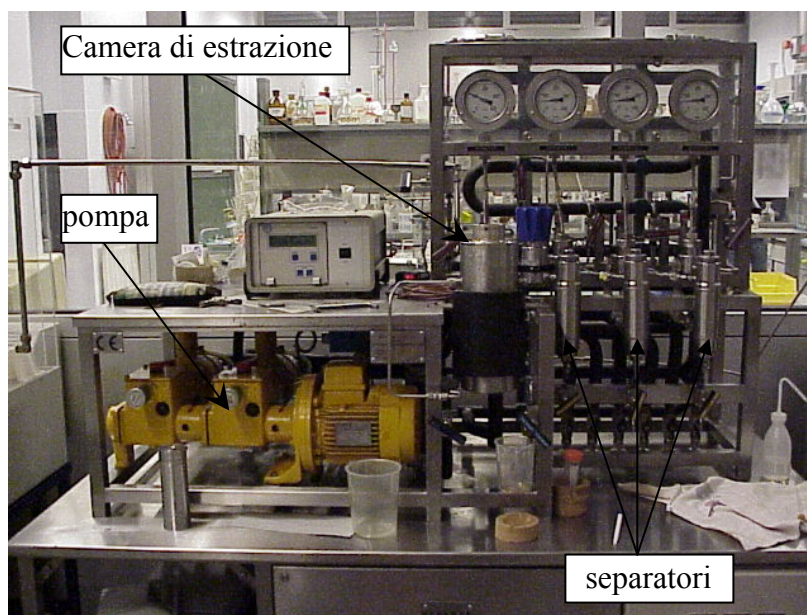


Fig. 12 Estrattore a fluidi supercritici Separex SFE-500

Per prima operazione consiste nel carico del panierino con il materiale che deve essere sottoposto al processo estrattivo. Il panierino viene in seguito introdotto nella camera che viene chiusa con speciali sistemi di chiusura (tappi e viti coniche). Una volta impostata la temperatura si lascia entrare la CO<sub>2</sub> dalla bombola alla camera di estrazione mediante

l'apertura delle valvole manuali. Quando la pressione raggiunge l'equilibrio si innesca la pompa la cui portata può essere dosata mediante i regolatori di potenza. La pressione di tutte le camere può essere letta sui relativi manometri. In caso di eccessiva pressione (<300 bar), la pompa si spegne automaticamente grazie a un dispositivo d'emergenza. La pressione nella camera di estrazione e nei separatori può essere regolata mediante valvole ad ago poste all'uscita dagli stessi.

A fine processo l'impianto deve essere depressurizzato: bisogna spegnere la pompa e chiudere tutte le valvole da cui passa la CO<sub>2</sub>. In seguito si inizia a scaricare le singole camere mediante le valvole di scarico e quando i manometri segnano 0 bar si può estrarre il cilindro della camera d'estrazione e analizzare il risultato.

9. SVILUPPO DEL LAVORO

<b>Step</b>	<b>Descrizione</b>	<b>Obiettivi</b>	<b>Modalità</b>
<b>1</b>	Indagine preliminare sulla solubilizzazione degli antociani da bucce d'uva fermentate e idrolizzate, in vari solventi a pH diverso.	Ottenere informazioni basilari sulla solubilità degli antociani in solventi di polarità crescente a pH diverso, verificando il risultati ottenuti nel precedente lavoro di ricerca.	Fermentazione, idrolisi acida e prove in provetta con i campioni d'uva ottenuti, utilizzando solventi di polarità crescente a pH diverso.
<b>2</b>	Verifica della estraibilità mediante metanolo con estrattore Soxhlet; caratterizzazione dell'estratto.	Verificare la capacità di estrazione del metanolo	Estrazione a riflusso Soxhlet con metanolo, distillazione al Rotavapor, analisi qualitativa e cromatografica dell'estratto.
<b>3</b>	Prova di estrazione mediante bagno a ultrasuoni.	Verificare se gli ultrasuoni possiedono proprietà ausiliario-estrattive nei confronti degli antociani.	Bagno a ultrasuoni di campioni di uva immersi in metanolo.
<b>4</b>	Prove preventive sulla fattibilità tecnica dell'estrazione di antociani mediante CO <sub>2</sub> e metanolo.	Verifica dell'estraibilità in CO <sub>2</sub> degli antociani dall'uva fermentata e idrolizzata.	Prove di estrazione con Supelco SFE-400 a condizioni variabili utilizzando metanolo come cosolvente.
<b>5</b>	Prove preliminari di estrazione con impiego di anidride solforosa (SO <sub>2</sub> ) e verifica dell'estratto.	Verificare le proprietà estrattive dell'SO <sub>2</sub> in fase acquosa nei confronti degli antociani.	Macerazione in SO <sub>2</sub> di campioni di uva, evaporazione, concentrazione e analisi cromatografia dell'estratto.
<b>6</b>	Prove di estrazione con CO <sub>2</sub> supercritica e aggiunta di SO <sub>2</sub> supercritica come solvente.	Verificare il potere estrattivo della SO <sub>2</sub> in fase supercritica	Prove di estrazione con Separex SFE500 con CO <sub>2</sub> supercritica e soluzione di SO <sub>2</sub> come cosolvente.

**Tab. 1** Lo sviluppo del lavoro di ricerca.

In tabella 1 viene descritto il lavoro di analisi e ricerca in laboratorio: esso è strutturato in sei fasi o passi e segue una logica consequenziale. Per ogni passo viene effettuata una descrizione, gli obiettivi che si intendo raggiungere e la modalità dei procedimenti. Negli allegati si può trovare un ulteriore superfluo step (punto 10.4.1) riguardante le prime prove di estrazione a CO<sub>2</sub> supercritica mediante l'utilizzo di Supelco SFE-400.

## 10. PARTE SPERIMENTALE

### 10.1 Verifiche sulla solubilità di antociani di bucce fermentate e idrolizzate in solventi a polarità e pH diversi

#### **10.1.1 Fermentazione**

Dario Bottinelli ha verificato che l'estrazione di antociani migliora in seguito ad una fermentazione dell'uva<sup>29</sup>. La fermentazione alcolica di materia organica trasforma gli zuccheri liberi in alcol etilico: è ben noto che la presenza di zuccheri liberi ostacola sovente i processi estrattivi.

E' quindi probabile che l'aumentata efficacia del processo estrattivo sia da ascrivere all'eliminazione degli zuccheri attraverso la loro conversione in alcol etilico.

#### **Principio**

Viene eseguita una fermentazione di due masse di uva rispettivamente di 461,68 g e 423,27 g. La fermentazione viene seguita qualitativamente: non viene calcolato il volume di anidride carbonica sviluppatosi; il processo fermentativo viene ritenuto terminato quando non è più osservabile il gorgogliamento determinato dalla produzione di anidride carbonica.

#### **Procedimento**

Le due masse vengono lasciate a bagnomaria in due palloni da 1000 ml ad una temperatura di 22°C per permettere l'attività dei fermenti.

Dopo 3 giorni il gorgogliamento, e quindi lo sviluppo di CO<sub>2</sub> da parte della massa d'uva, è terminato: ne consegue che la fermentazione è avvenuta a completezza. La massa fermentata viene quindi filtrata con ovatta per raccogliere le bucce.

#### **10.1.2 Idrolisi acida**

Nel lavoro di Dario Bottinelli è descritta un'idrolisi in condizioni blande, che non aveva dato nessun effetto significativo sull'estraibilità degli antociani<sup>30</sup>. Per questa ragione viene qui effettuata un'idrolisi acida secondo le condizioni più drastiche descritte dalla letteratura.

Essendo gli antociani glicosidati, ossia legati a catene di zuccheri (una, due o più unità di glucosio) tramite legame glucosidico che si forma per condensazione, occorre effettuare un'idrolisi per rompere questo legame e staccare le code zuccherine (molto polari) dalla molecola di antociano. Questo per facilitare una futura estrazione delle molecole più semplici con solventi più o meno polari, dall'acqua (solvente polare) fino a pentano o CO<sub>2</sub> (solvente apolari). Tuttavia in letteratura non è stato trovato alcun saggio che possa permettere la verifica dell'effettiva deglicosidazione degli antociani.

#### **Principio**

Le bucce di uva fermentata vengono immerse in una soluzione di HCl 3M e bollite a riflusso per 3 ore e 30 minuti.

#### **Procedimento**

Secondo i protocolli di idrolisi di zuccheri descritti dalla letteratura, le condizioni più estreme risultano essere:

- concentrazione della soluzione di HCl: 3M
- temperatura: 100°C

- durata: 2 ore a riflusso

Ci si è voluti spingere oltre facendo durare le due idrolisi entrambe 3 ore e 30 minuti.

Vengono presi dei campioni di uva di 257,99 g e 247,49 g dalle masse fermentate in precedenza e messe in due palloni da 500 ml ognuno con 300 ml di soluzione HCl 3M. I palloni muniti di termometro e refrigeranti vengono riscaldati con calotte elettriche sotto cappa. Le soluzioni contenenti l'uva vengono riscaldate fino a ebollizione, e in seguito mantenute a leggera ebollizione. I due campioni vengono trattati in parallelo.

$T_{\text{pallone 1}}: 98^{\circ}\text{C}$

$T_{\text{pallone 2}}: 96^{\circ}\text{C}$

Durata complessiva: 3 h e 30 min

A fine processo viene eseguita una filtrazione sottovuoto per eliminare i residui della soluzione di HCl; il solido trattenuto appare come una poltiglia umidiccia.

### ***10.1.3 Prove di solubilità in provetta***

La solubilità delle sostanze organiche è una questione di polarità delle molecole di solvente e soluto. In generale si può dire che il simile scioglie il simile, soluti polari si scioglieranno cioè meglio in solventi polari, mentre soluti apolari si scioglieranno meglio in solventi apolari. La polarità degli antociani può modificarsi a seconda del pH della soluzione in cui si trovano in quanto nelle loro molecole ci sono gruppi che possono essere protonati o deprotonati variando la concentrazione di ioni  $\text{H}_3\text{O}^+$  e  $\text{OH}^-$ .

Con gli esperimenti descritti di seguito si cercherà di capire, l'influsso del pH, sulla solubilità degli antociani in vari tipi di solvente: si partirà da un solvente apolare come il cicloesano per poi andare in crescendo verso un solvente polare come l'acqua.

### **Principio**

Campioni da 2 g di uva fermentata e idrolizzata, vengono messi in provetta a contatto con 10 ml di solventi di varia polarità in soluzione a diverso grado di pH (4, 7, 9). Dopo l'agitazione delle provette, si osserva a parità di tempo di contatto il grado di decolorazione delle bucce e l'intensità della colorazione della soluzione.

### **Procedimento**

Vengono preparate 21 provette da 10 ml e disposte in 3 file da 7 come mostra la tabella 2. In ognuna di queste vengono messi 2 g di uva fermentata e idrolizzata proveniente dal pallone 1. Vengono poi aggiunti nel seguente ordine dal meno polare al più polare i seguenti solventi utilizzando soluzioni tampone di pH diversi e a temperatura ambiente ( $22^{\circ}\text{C}$ ): cicloesano, toluolo, eptano, acetone, etanolo, metanolo, acqua. Per i solventi organici viene aggiunta un po' di acqua distillata alla soluzione tampone. Vengono messi 7 ml di solvente con 3 ml di soluzione tampone, mentre per i solventi organici 6 ml di solvente, 2 ml di soluzione tampone e 2 ml di acqua distillata.

## Risultati

La tabella 2 mostra il grado di colorazione dei solventi ai vari pH.

	acqua	metanolo	etanolo	acetone	eptano	Toluolo	cicloesano
<b>pH 9</b>	Scarso	Molto Buono	Buono	Buono	Scarsissimo	Scarsissimo	Scarsissimo
<b>pH 7</b>	Scarso	Molto Buono	Buono	Buono	Scarsissimo	Scarsissimo	Scarsissimo
<b>pH 4</b>	Suff.	Ottimo	Buono	Molto buono	Scarsissimo	Scarsissimo	Scarsissimo

**Tab. 2:** Grado di colorazione dei solventi a diversi pH

## Discussione

Nei tre solventi organici eptano, toluolo e cicloesano, che sono apolari, nella fase organica si riscontra una pressoché inesistente colorazione, la solubilità è scarsissima a qualunque grado di pH.

Nell'acqua, che è un solvente polare, si riscontra una solubilità scarsa a qualsiasi pH. Si potrebbe pensare a questo punto che gli antociani non siano né strettamente apolari, né strettamente polari; ciò significa che devono essere una via di mezzo e che si richiede appunto un solvente che risponde a questa esigenza di polarità. L'acetone di formula  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$  possiede discreta polarità e risulta essere un buon solvente soprattutto in condizioni acide (pH 4), tuttavia il suo impiego risulterebbe piuttosto scomodo e inadeguato causa la sua tossicità. L'etanolo potrebbe essere una buona soluzione come solvente di polarità intermedia e i risultati ottenuti lo dimostrano: la sua formula è  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , possiede dunque una coda apolare del tipo  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ . Tuttavia potrebbe risultare un po' troppo apolare per gli antociani; infatti il risultato migliore è dato dal metanolo, soprattutto a pH 4. Il metanolo possiede formula chimica  $\text{CH}_3\text{OH}$  e ha come coda apolare solo  $-\text{CH}_3$ , è quindi più polare dell'etanolo, ma meno dell'acqua. Come detto si riscontra maggiore solubilità a pH 4, questo potrebbe essere dovuto alla particolare capacità degli antociani di cambiare struttura e quindi colore in funzione del pH.

Sia per l'acqua che per acqua e acetone (quindi per tutti i solventi polari) si riscontra un leggero miglioramento a pH 4.

## Conclusioni

I solventi migliori risultano essere nell'ordine metanolo, acetone, etanolo, acqua. Condizioni di debole acidità (pH 4) aumentano il potere estrattivo di questi solventi (non sono state verificate condizioni di acidità più drastiche).

Dovrebbe quindi essere possibile un'estrazione massiccia degli antociani mediante una miscela metanolo/acqua tamponata a pH 4 oppure delle bucce umide con  $\text{CO}_2$  supercritica (che crea acidità) aggiunta di metanolo quale cosolvente.

L'impiego dell'anidride solforosa quale mezzo per facilitare la mobilitazione degli antociani verrà preso in considerazione in un secondo tempo.

## 10.2 Estrazione Soxhlet con metanolo e analisi dell'estratto

### 10.2.1 Estrazione Soxhlet

#### Principio

Secondo le conclusioni del punto 10.1 viene eseguita una prova di estrazione con metanolo, utilizzando la tecnica Soxhlet.

Il metanolo viene portato ad ebollizione nel pallone: i vapori che si sviluppano, salendo lungo il tubo laterale, entrano nel corpo centrale per poi salire nel refrigerante. Qui condensano e ricadono allo stato liquido nel ditale filtrante contenente il campione di uva fermentata, fino a riempire l'estrattore al livello del sifone, attraverso cui il liquido si scarica nuovamente nel pallone. A questo punto l'estrazione diventa continua, automatica ed autosufficiente con il risultato che il campione nel ditale viene sottoposto ad un ripetuto impregnamento nel solvente puro. Inoltre il ditale filtrante, come suggerisce il nome stesso, non solo trattiene il prodotto solido, ma agisce anche da filtro impedendo che il materiale blocchi il tubo del sifone.

Nonostante la solubilità degli antociani in metanolo sia maggiore in ambiente a pH 4, si è preferito utilizzare metanolo puro, senza soluzioni tampone in quanto la tecnica Soxhlet richiede l'evaporazione del solvente e la sua condensazione prima che esso venga a contatto con la massa da estrarre: con una miscela metanolo/acqua/tampone non si otterrebbe dopo evaporazione e ricondensazione una soluzione omogenea come nelle provette del punto 10.1.

#### Procedimento

Viene dapprima fatta fermentare e idrolizzare dell'uva secondo la procedura descritta al punto 10.1 con aggiunta di mezza bustina di lievito per pane tamponato a pH 7 per stimolare la fermentazione; dopo quattro giorni lo sviluppo di CO<sub>2</sub> cessa e si assume che il processo fermentativo batterico sia terminato; in seguito viene assemblata l'apparecchiatura per l'estrazione Soxhlet: viene dapprima riempito tutto il corpo centrale estrattore con del metanolo, finché il liquido non raggiunge il sifone e scola quindi nel pallone da 500 ml. In questo è ora contenuta la quantità minima di solvente necessaria al processo di estrazione, viene dunque aggiunto dell'altro metanolo per garantire la continuità al sistema. L'impiego di un paio di sassolini porosi facilita in seguito un'ebollizione dolce e regolare del metanolo.

Un ditale filtrante (cartuccia) contenente 37,33 g di uva fermentata viene inserito nel Soxhlet, alla sua estremità superiore viene montato un refrigerante a bolle con relativi tubi, atti a raccogliere e condensare i vapori di metanolo, mentre all'estremità inferiore è fissato il pallone contenente il solvente su di una calotta riscaldante.

Viene quindi attivata la circolazione dell'acqua di raffreddamento e il riscaldamento della calotta per portare il metanolo ad ebollizione.

#### Risultati

Il solvente viene fatto circolare dapprima per circa 2 ore, il risultato ottenuto è ottimo: ad un primo impatto visivo, già dopo qualche minuto di estrazione, il solvente prende una colorazione molto intensa. Questo fa pensare ad un'efficace estrazione di antociani dalla buccia dell'uva.

Si lascia proseguire l'estrazione per ulteriori 8 ore. Durante tutto il processo, fino agli ultimi minuti, si nota che la soluzione di metanolo che diffonde nel Soxhlet attraverso la cartuccia è costantemente colorata: si tratta di un rosso viola molto intenso. Nasce quindi una



Fig. 13 Le bucce recuperate dall'estrazione Soxhlet

duplice ipotesi: o le bucce continuano a scolorarsi oppure il solvente messo in circolo è sempre lo stesso (cioè colorato) e non è più puro. Ma quest'ultima ipotesi non può reggere poiché il metodo Soxhlet è studiato apposta in modo che il solvente in circolo sia sempre puro, per conferma viene smontata l'apparecchiatura e viene sostituita la soluzione colorata con del metanolo fresco. Viene quindi continuata l'estrazione per altre 4 ore: alla fine il solvente messo in circolo appare debolmente colorato: si deduce che sia stato estratto il massimo possibile dal campione di bucce, e che evidentemente nell'estrazione precedente erano queste che continuavano la loro decolorazione. Vengono poi raccolti i due solventi e recuperate le bucce che presentano una colorazione marrone (vedi figura 13).

### Discussione

Il colore del metanolo recuperato è di un colore rosso-rosa vivo sorprendente, tuttavia le bucce d'uva non sono eccessivamente decolorate come ci si poteva aspettare: presentano comunque una tonalità più chiara e tendente al marroncino rispetto all'origine. Non risulta chiaro il ruolo dell'idrolisi che non sembra dare buoni risultati sulle bucce.

### Conclusione

A prescindere da qualsiasi analisi quantitativa il metanolo sembra avere notevoli capacità estrattive.

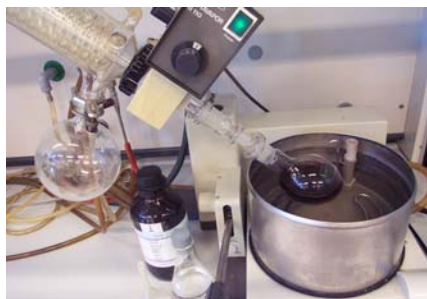
#### 10.2.2 Concentrazione dell'estratto

Per concentrare l'estratto ottenuto in precedenza occorre evaporare il metanolo dalla soluzione: mediante evaporatore rotante.

### Principio

La soluzione ottenuta dall'estrazione Soxhlet viene riscaldata al punto di ebollizione del metanolo ( $P_{eb}$ :  $65^{\circ}\text{C}$ ) ed evaporata fino a secchezza. Il metanolo viene aspirato mediante pompa da vuoto in un condensatore, condensato e recuperato in forma pura.

### Procedimento



**Fig. 14** Distillazione Rotavapor per concentrare l'estratto

La soluzione ottenuta dall'estrazione soxhlet viene trasferita in un pallone per Rotavapor assieme a un sassolino da distillazione (per facilitare l'ebollizione); il pallone viene immerso in un bagno d'acqua a  $70^{\circ}\text{C}$ ; quindi viene attivata la pompa da vuoto (a caduta d'acqua), la circolazione d'acqua fredda nel condensatore e il motore del Rotavapor che ruota il pallone nel bagno. Durante il processo, il metanolo evaporato viene poi condensato in un pallone da recupero (vedi figura 14).

Non è conveniente distillare subito fino a secchezza: sarebbe scomodo recuperare l'estratto concentrato dal pallone (di grandi dimensioni) del Rotavapor. Per questo la soluzione liquida concentrata restante dopo una prima fase di evaporazione viene trasferita in un pallone per Minirotavapor dove si procede con lo stesso principio fino a completa secchezza. L'ultima fase del processo viene condotta chiudendo la valvola in testa al condensatore creando così una pressione ridotta che facilita l'eliminazione degli ultimi resti di solvente.

### Risultati

Durante l'evaporazione del metanolo la soluzione in via di concentrazione si scurisce progressivamente.

Nel corso della seconda fase di evaporazione nel Minirotavapor, si nota che l'estratto rimane sempre liquido, anche dopo completa eliminazione del metanolo. Questo enigma è facilmente svelabile: si tratta certamente di acqua proveniente dalle bucce d'uva fermentate sottoposte all'azione del Soxhlet; esse non sono state essiccate e contenevano sicuramente dell'acqua, che è stata estratta dal metanolo durante il processo di estrazione. Infatti dopo un'ulteriore distillazione a 110°C, si ottiene un concentrato solido secco. Esso presenta una natura pastosa e una bella colorazione violaceo scura; viene raschiato dal pallone con l'ausilio di una spatola e messo in una boccetta di vetro per una massa totale di estratto recuperato pari a 1,70 g (vedi figura 15).



**Fig. 15** L'estratto concentrato, notare la colorazione molto scura

### Tabella riassuntiva

<b>Massa di uva iniziale</b>	<b>460 g</b>
<b>Massa di uva fermentata</b>	<b>460 g</b>
<b>Volume di vino</b>	<b>512 ml</b>
<b>Massa di uva estratta</b>	<b>37,33 g</b>
<b>Massa di estratto secco</b>	<b>1,91 g</b>

### Discussione

Il risultato ottenuto è molto buono, l'estratto concentrato oltre ad avere una consistenza propria degli antociani (natura pastosa), presenta una colorazione molto scura (anch'essa propria degli antociani e in particolare dell'enocianina), che porterebbe sicuramente ad un aumento di intensità di colore di un eventuale vino al quale verrebbe aggiunto.

Per quanto riguarda l'aspetto quantitativo, partendo da una massa di uva fermentata pari a 37,33 g, si è riusciti ad estrarre un concentrato di massa pari a 1,91 g, del quale ne sono stati recuperati 1,70 g.

Si calcola mediamente che un quintale di uva dia in media 75 litri di vino, quindi ad un 1 kg di uva corrisponde circa ad una bottiglia e quindi a 0,75 litri di vino.

Nella parte teorica al punto 5.2 si afferma che mediamente un litro di vino rosso contenga da 200 a 500 mg di antociani. Possiamo quindi considerare un valore medio di 350 mg/l (0,35 g/l).

Dal nostro processo abbiamo ottenuto 1700 mg di estratto secco da 37,33 g di bucce fermentate. L'aggiunta dell'estratto secco al vino ottenuto sarebbe dell'ordine di 3,32 g/l.

Il contenuto naturale di antociani del vino da noi ottenuto con la fermentazione dovrebbe invece essere di circa 0,18 g, ossia 0,35 g/l.

Occorre ovviamente stabilire quale parte dell'estratto secco sia realmente costituita da antociani.

Massa di uva per 1 l di vino

$$\frac{0,75l}{1kg} = \frac{1l}{x} \Rightarrow x \cong 1,3kg$$

Con 1,3 kg di uva si produce quindi un litro di vino circa.

Ora, è noto che 1 l di vino e quindi 1,3 kg di uva contengano circa 0,35 g di antociani. Applicando i risultati ottenuti con l'estrazione Soxhlet e la distillazione, vale la proporzione:

$$\frac{0,35g}{1300g} = \frac{x}{37,3g} \Rightarrow x \cong 0,01g \text{ (di antociani)}$$

Tenendo conto che il processo di estrazione Soxhlet utilizzato sia diverso e probabilmente più efficace di quello della vinificazione, i dati parlano comunque chiaro:

1,70 g di antociani ottenuti sperimentalmente, contro circa 0,01 g antociani ottenuti teoricamente e approssimativamente.

### Conclusioni

Il metanolo sembra effettivamente essere un buon solvente anche se non produce, nemmeno dopo un periodo di estrazione assai lungo una spettacolare decolorazione delle bucce. La quantità di estratto secco è rilevante ma occorre verificare l'effettivo tenore dello stesso in antociani.

Quanto sopra discusso porta di nuovo una duplice ipotesi:

1. l'estrazione è stata veramente efficiente e selettiva così da poter estrarre una notevole quantità di antiossidanti.
2. l'estrazione non è stata selettiva e i coestratti non antociani ne rappresentano una parte consistente.

La risposta potrebbe venire solo da un'analisi quantitativa degli antociani, non possibile nel nostro laboratorio che non dispone dell'attrezzatura analitica necessaria (HPLC con integratore).

Un'analisi qualitativa o semiquantitativa attraverso cromatografia su strato sottile può già dare comunque utili informazioni.

### 10.2.3 Caratterizzazione dell'estratto mediante cromatografia TLC

#### Principio

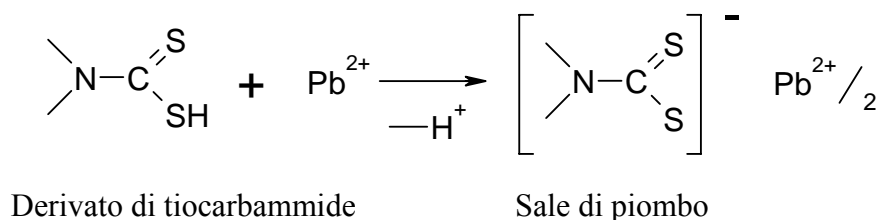
Il campione da analizzare viene concentrato sulla piastra di gel di silice e viene poi immerso nella camera dell'eluente composto da etilacetato, acido formico e acqua (85 + 10 + 15). Dopo mezz'ora viene tolto e lasciato essiccare a 80°C per 15 minuti, immerso in una soluzione-reagente e in seguito in una soluzione al 5% in etanolo di polietilglicolo 6000. Infine dopo aver lasciato essiccare a temperatura ambiente la piastra per 30 min, può essere osservato il risultato sotto una lampada UV ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ). Gli antociani potrebbero essere meglio visualizzati attraverso una reazione di derivatizzazione<sup>31</sup>; purtroppo la preparazione della soluzione di reazione non è possibile a causa della mancanza di sostanze necessarie, inoltre in laboratorio non si dispone del polietilglicolo 6000.

A questo proposito viene applicato un diverso protocollo:<sup>32</sup>

secondo questo metodo occorre preparare di nuovo una soluzione-reagente di acetato di piombo (II) con un contenuto di piombo pari al 17,5-19%. Dopo aver preparato l'eluente composto da etilacetato, dicolorometano, acido formico, acqua (35 + 15 + 5 + 3), e immersi la piastra in gel di silice con il campione da analizzare per circa 20 minuti, questa viene poi messa a bagno nella soluzione di acetato di piombo per 1 secondo. Infine occorre essiccare la

piastra a 50-80°C per circa 20 minuti, per poi procedere all'analisi sotto lampada UV ( $\lambda = 365$  nm). Dopo l'essiccazione in forno, dovrebbero già risultare zone colorate sul cromatogramma, che diventerebbero poi fluorescenti con l'esposizione ai raggi UV.

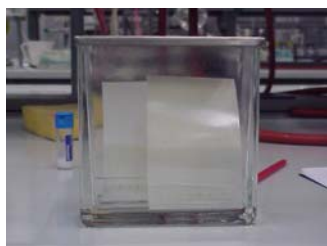
La piastra con i campioni di estratto disciolti in metanolo, viene lasciata nella camera con l'eluente per 20 minuti. Questo per capillarità e per affinità di polarità trasporta con sé lungo la fase mobile del cromatogramma le sostanze da analizzare, in questo caso gli antociani. La soluzione di acetato di piombo reagisce poi con questi formando dei sali di piombo colorati, rilevabili già a occhio nudo e fluorescenti sotto l'effetto dei raggi UV. Gli antociani reagiscono analogamente alla tiocarbammide secondo l'equazione seguente:



### Procedimento

Innanzitutto occorre preparare la soluzione-reagente che viene poi impiegata sul cromatogramma a cromatografia avvenuta: si tratta di una soluzione di acetato di piombo (II) contenente il 18% in massa di piombo. Per la preparazione bisogna tener conto che è necessario ottenere un volume di liquido sufficiente alla totale immersione del cromatogramma: 230,44 g di acetato di piombo vengono aggiunti a 469,58 g di acqua bidistillata (proporzioni rispettate per ottenere un contenuto di piombo in soluzione pari al 18%), il tutto viene messo sotto agitazione e riscaldato per accelerare il processo di solubilizzazione.

Viene poi preparata una piastra in gel di silice 60F25H: con una matita si traccia la linea dello start a circa un centimetro dall'inizio della piastra, questa viene poi messa ad essiccare in forno a 110°C per eliminare qualsiasi traccia di umidità presente. Durante l'essiccazione si prepara la soluzione eluente, composta da etilacetato, diclorometano, acido formico e acqua (35 + 15 + 5 + 3), la si versa nella camera facendo attenzione a non superare l'altezza di 1 cm, questo perché quando la piastra viene immersa nell'eluente, il livello di fluido deve restare al di sotto della linea dello start, per evitare il diretto contatto con la sostanza da analizzare e compromettere quindi l'intero procedimento. Nella camera sigillata viene quindi immersa della carta assorbente per alcuni minuti, per saturare l'ambiente con i vapori dell'eluente (vedi figura 16).



**Fig. 16** La camera in fase di saturazione

I preparativi preliminari sono stati effettuati, si può quindi procedere all'analisi cromatografica:

Dell'estratto viene sciolto in metanolo per ottenere la soluzione (è importante che non vi sia la presenza di particelle in sospensione: deve essere limpida), che va depositata sulla piastra cromatografica; quest'ultima deve essere molto concentrata, si consiglia quindi di diminuire il solvente e aumentare il soluto fino a saturazione completa: ciò che si ottiene è un liquido di colore marrone molto scuro (vedi figura 17). A questo punto si può procedere al deposito della sostanza sulla piastra: con l'aiuto di appositi capillari molto fini (vedi figura 18) viene prelevata e depositata sulla linea dello start. È importante che la macchia formatasi sia piccola e molto concentrata, per questo occorrono più "passate" cercando di contenerne il diametro; tra un deposito e l'altro risulta



**Fig. 17** La soluzione estratto-metanolo da analizzare

utile asciugare la soluzione con l'ausilio di un phon. Vengono poi eseguiti, per essere sicuri di una percentuale di riuscita dell'analisi maggiore, altri quattro depositi il più distanti possibili



**Fig. 18** I capillari per il deposito della sostanza da analizzare

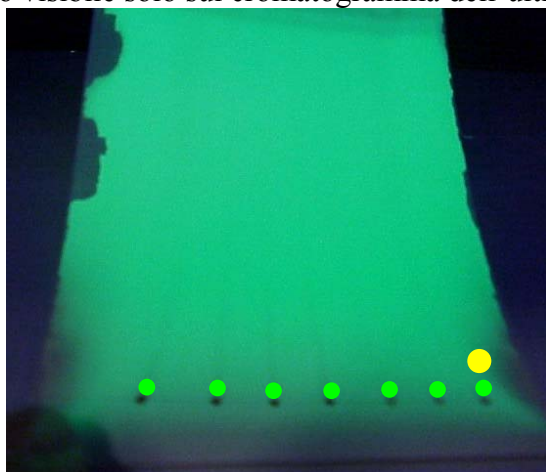
lungo la linea dello start. Ciò che si ottiene è una piastra con cinque macchie molto scure; questa viene quindi messa nella camera chiusa dell'eluente in posizione verticale (liquido parallelo alla linea dello start), e lasciata per circa 20 minuti (vedi figura 19). A tempo trascorso, la piastra, viene tolta dalla camera e con l'ausilio di una pinza viene immersa nella soluzione di acetato di piombo per un secondo, infine viene messa in forno ad asciugare a 80°C per 20 minuti. La soluzione-reagente è quindi conservata per eventuali usi futuri. A essiccazione avvenuta, la piastra può essere passata ai raggi UV di lunghezza d'onda  $\lambda = 365 \text{ nm}$  e venir quindi esaminata.



**Fig. 19** La piastra durante il processo cromatografico

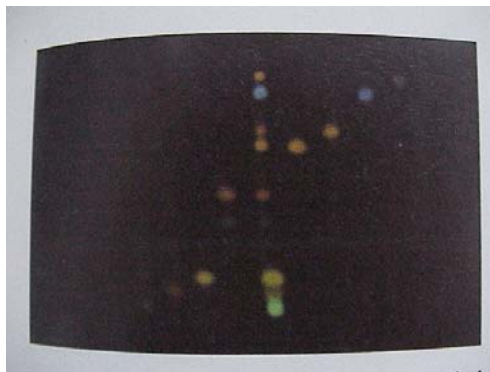
### Risultati

i risultati sono ammissibili e positivi: se di primo acchito la piastra risulta normale sotto la lampada a raggi UV, dopo un accurato sguardo e cercando di oscurare il più possibile, vengono rilevate due deboli zone fluorescenti (vedi figura 20). In particolare una macchia verde quasi in corrispondenza (poco sopra) della linea dello start seguita da una gialla qualche centimetro più sopra (però visibile solo sul cromatogramma dell'ultimo deposito);



**Fig. 20** La piastra sotto l'azione dei raggi UV, purtroppo nella fotografia non si notano le zone fluorescenti, vengono quindi aggiunte per elaborazione grafica. Si noti come la macchia gialla sia visibile solo sull'ultimo deposito. Per un confronto guardare figura 21 che mostra il cromatogramma del protocollo seguito.

Queste macchie (i sali di piombo), come descritto sul protocollo (vedi figura 21), sono le più caratteristiche e quindi le più importanti dei flavonoidi. Il mancato rilevamento delle altre zone fluorescenti, e la stessa debole osservazione delle zone verde e gialla, sono sicuramente dovuti alla scarsa concentrazione del deposito di flavonoidi sulla piastra: sarebbero dovute avvenire almeno 20 concentrazioni mediante capillare.



**Fig. 21** Il cromatogramma illustrato dal protocollo, spiccano subito le zone fluorescenti verde e gialla.

### **Discussione**

I risultati ottenuti permettono di evidenziare la presenza di flavonoidi nell'estratto. Tuttavia questi non sono con ogni probabilità gli unici componenti: la debole visualizzazione nel cromatogramma indica una debole concentrazione. L'ipotesi andrebbe verificata procedendo in particolare ad un'analisi dei tannini mediante radiazioni infrarosse, per verificare la presenza nell'estratto di questi composti, notoriamente estraibili con metanolo.

#### **10.2.4. Prova organolettica (degustazione)**

Per la caratterizzazione dell'estratto è utile eseguire un'analisi organolettica; qui ci si accontenta di una prova degustazione. Come visto nella teoria al punto 5.2, gli antociani non possiedono gusto. Al contrario particolarmente i tannini danno una tipica sensazione astringente. In base a queste proprietà è possibile una verifica di massima della selettività dell'estrazione in metanolo.

### **Principio**

Una piccola quantità di estratto viene posta sulla lingua e degustata; Gli antociani non dovrebbero venir rilevati dalle papille, in quanto non esiste compatibilità molecolare a livello strutturale e stereochimico.

### **Procedimento**

Parte dell'estratto viene deposta sulla lingua e degustata. In seguito viene caratterizzato il gusto: se si tratta di una sostanza salata, dolce, amara o acida (per maggiori informazioni sulla teoria del gusto si veda il lavoro di ricerca precedente<sup>33</sup>).

### **Risultati**

Durante la degustazione viene percepito un gusto amaro e astringente, estraneo agli antociani e tipico per contro dei tannini.

### **Discussione**

La degustazione ha rilevato un sapore amaro e astringente, segno che nell'estratto, come già esplicitato in precedenza, non vi è l'esclusiva presenza di antociani, che al contrario, non avrebbero alcun gusto. La percezione di astringenza e amarezza nel gusto, è quella tipica dei tannini (vedi punto 5.2), sostanze in parte coloranti di natura flavonoidea, ma poco benefiche per la salute.

## Conclusioni

Dalla prova organolettica di degustazione viene confermata la scarsa selettività dell'estrazione con l'impiego di metanolo, in quanto nell'estratto vi è anche la presenza di sostanze tanniniche (oltre sicuramente alle altre sostanze non verificate).

### 10.2.5. Prove qualitative di solubilità e colorazione

In seguito all'analisi cromatografica vengono eseguite delle prove qualitative di solubilità e colorazione dell'estratto in varie soluzioni. Nonostante si riconosca la presenza di altre sostanze estranee, i risultati verranno considerati e correlati esclusivamente al comportamento degli antociani.

## Principio

Piccole quantità di estratto vengono disciolte in varie soluzioni, tra cui una composta esclusivamente da vino, per osservarne il comportamento: in particolare verranno prese in considerazione la solubilità e l'incremento dell'intensità di colorazione. L'estratto a contatto con i solventi si scioglie in base alla sua affinità con essi, dovuta in particolare alla polarità dei suoi componenti. Il colore conferito alla soluzione è invece dovuto principalmente al grado di acidità o di basicità della soluzione. Un ruolo importante può pure essere giocato da un'eventuale ossidazione degli antociani che produce una colorazione tendente al marrone.

## Procedimento



**Fig. 22** Soluzione al 10% di etanolo

Viene eseguita un'indagine preliminare sul vino ottenuto dalla fermentazione delle stesse bucce sottoposte all'estrazione con metanolo.

Viene preparata una soluzione al 10% di etanolo (circa la concentrazione di alcol nel vino, vedi figura 22) nella quale vengono disciolti 0,14 g di estratto secco. In seguito si cerca di creare un ambiente acido simile a quello presente nel vino, per cui viene aggiunta alla soluzione di etanolo, una soluzione tampone a pH 3-4: il tutto verrà poi aggiunto a 50 ml di vino. Vengono poi eseguite altre prove di solubilità in 50 ml di soluzione pura di etanolo, 50 ml di soluzione pura di metanolo e 50 ml di vino. Per agevolare il processo le soluzioni vengono leggermente riscaldate e agitate mediante magnete.

Per quanto riguarda il colore viene eseguita una prova di intensità in tre provette: nella prima vengono messi 10 ml della soluzione al 10% di etanolo assieme all'estratto e al vino preparata in precedenza, nella seconda vengono messi 10 ml di una soluzione di 50 ml di vino e estratto, mentre nella terza 10 ml di vino (sempre proveniente dalle bucce fermentate). Tutti i campioni vengono in seguito diluiti con 10 ml di acqua distillata per osservare il cambiamento dell'intensità di colorazione.

### Risultati

Per quanto riguarda la solubilità dell'estratto nella soluzione al 10% di etanolo il risultato è scarso: il colore ottenuto è un verde marcio che non cambia dopo l'aggiunta di una soluzione tampone a pH 4 (vedi figura 23). Quando il tutto viene aggiunto a 50 ml di vino, il colore di quest'ultimo resta pressoché immutato. Nella soluzione di etanolo puro il risultato è in parte migliore: dopo l'aggiunta di 0,10 g di estratto si scorge una punta di rosa, tuttavia il soluto si scioglie lentamente e in misura molto limitata, anche dopo riscaldamento e agitazione (vedi figura 24). Nel metanolo puro, come ci si poteva attendere, l'estratto si scioglie velocemente e senza difficoltà (non occorre nemmeno riscaldare o ricorrere ad un magnete per agitare): la soluzione prende subito colore, un marrone tendente al rosso (vedi figura 25). Infine aggiungendo 0,10 g di estratto al vino, si ottiene una discreta dissoluzione e praticamente nessun incremento di colore, come per la soluzione di etanolo al 10% aggiunta al vino.



Fig. 23 Estratto sciolto in soluzione di etanolo al 10%



Fig. 24 Estratto sciolto in etanolo



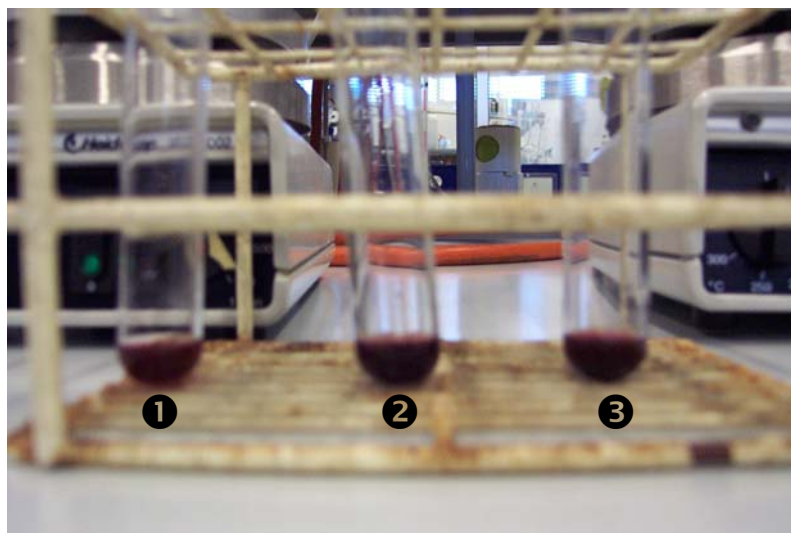
Fig. 25 Estratto sciolto in metanolo

Per quanto riguarda la prova di intensità di colore eseguita in provetta, vengono di seguito riassunti i risultati nelle tabelle 4, 5 e 6, rispettivamente prima e dopo la diluizione con 10 e 20 ml di acqua distillata:

**Inizio** (vedi figura 26)

Campione	Ccontenuto	Colore	Intensità	Osservazioni
1	Estratto + soluzione etanolo 10% a pH4 + vino	Rosso-viola chiaro	Più chiara di 1 e 2	
2	Estratto + vino	Rosso-viola scuro	Scura, simile a campione 3	
3	Vino	Rosso-viola scuro	Scura, simile a campione 2	

Tab. 4 Colore e Intensità di colore delle soluzioni dopo aggiunta dell'estratto

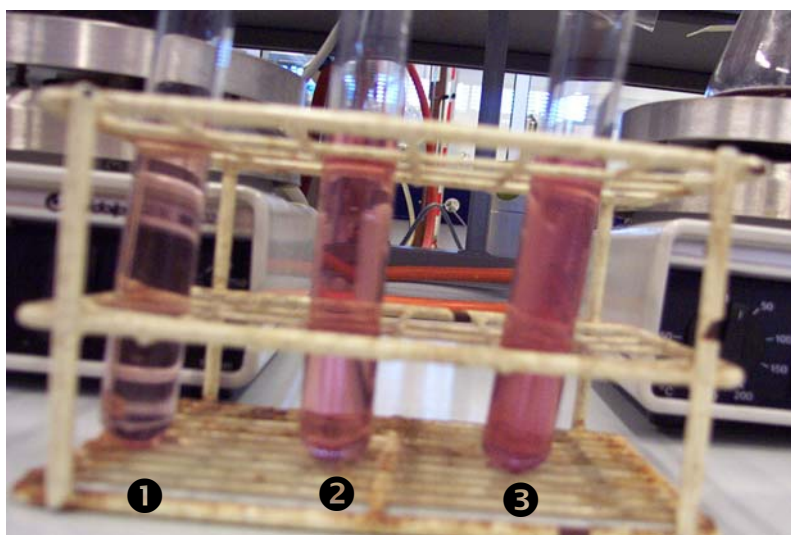


**Fig. 26** L'estratto sciolto in etanolo 10% a pH4 + vino (1) e in vino (2), messi a confronto con vino puro (3).

**Dopo aggiunta di 10 ml di acqua** (vedi figura 27)

Campione	Contenuto	Colore	Intensità	Osservazioni
1	Estratto + soluzione etanolo 10% a pH4 + vino	Rosa chiaro	Molto più chiara rispetto a 2 e 3	
2	Estratto + vino	Viola	Leggermente più chiara di 3	
3	Vino	Viola	Leggermente più scura di 2	

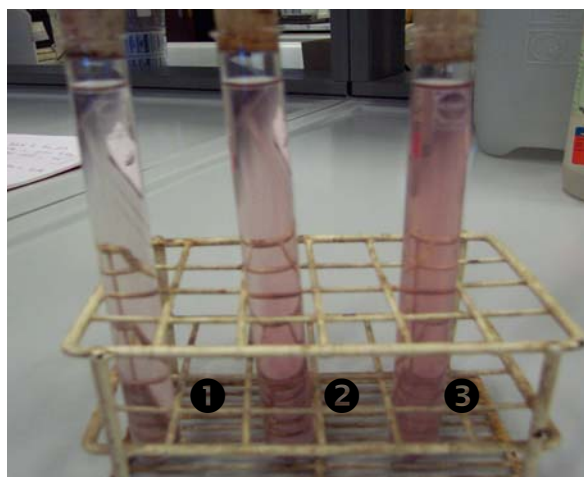
**Tab. 5** Intensità di colore delle varie soluzioni analizzate dopo diluizione con 10 ml di acqua.



**Fig. 27** L'estratto sciolto in etanolo 10% a pH4 + vino (1) e in vino (2), messi a confronto con vino puro (3), dopo l'aggiunta di 10 ml di acqua

**Dopo aggiunta di 20 ml di acqua** (vedi figura 28)

Campione	Contenuto	Colore	Intensità	Osservazioni
1	Estratto + soluzione etanolo 10% a pH4 + vino	Rosa molto chiaro	Molto più chiara rispetto a 2 e 3	
2	Estratto + vino	Viola chiaro	Più chiara di 3	
3	Vino	Viola chiaro	Più scura di 2	

**Tab. 6** Intensità di colore delle varie soluzioni analizzate dopo diluizione con 20 ml di acqua.**Fig. 28** L'estratto sciolto in etanolo 10% a pH4 + vino (1) e in vino (2), messi a confronto con vino puro (3), dopo l'aggiunta di 20 ml di acqua

Come si nota dai risultati la soluzione di etanolo al 10% a pH 4 con estratto e vino risulta la più chiara fin da subito, mentre quella di estratto e vino e quella di vino puro si somigliano molto per intensità di colore. Dopo l'aggiunta di 10 ml di acqua, nella provetta 1 la differenza risulta evidente, mentre per la 2 e la 3 si apre una forbice: l'estratto con il vino risulta più chiaro del vino stesso. Infine dopo ulteriore diluizione con 10 ml di acqua, la forbice si apre ancora di più evidenziando le differenze.

**Discussione**

L'estratto non ha troppa affinità con l'etanolo: non si scioglie facilmente. Inoltre il colore conferito alla soluzione è un verde marcio, quando invece ci si aspettava un marrone scuro o un rosso. Ciò indipendentemente dall'acidità e quindi del pH; questo potrebbe significare che nell'estratto la quantità di antociani è veramente minima (gli antociani hanno infatti la proprietà di cambiare colore in funzione della concentrazione di ioni idronio  $H^+$  dell'ambiente circostante, vedi punto 5.3); questo giustificherebbe anche il debole risultato dell'analisi cromatografica. Nell'etanolo puro il risultato è leggermente migliore, si scorge una colorazione tendente al rosso, ma vi è comunque una debole affinità per il solvente evidenziata dalla lenta dissoluzione. Nel metanolo puro come ci si doveva già aspettare (l'estratto proviene da un processo di estrazione a base di metanolo), la solubilità è ottima e anche il colore, che tende al marrone-rosso. La solubilità dell'estratto direttamente in vino è anch'essa lenta e difficoltosa, d'altronde il vino è simile alla soluzione di etanolo al 10%; inoltre a solubilizzazione avvenuta non sembra avvenire un'alterazione della tonalità e dell'intensità della colorazione.

Per quanto riguarda la prova di colore in provetta mediante diluizione, di primo acchito non sembra esserci troppa differenza tra la soluzione di vino e quella di vino con l'estratto, tuttavia dopo una diluizione con 20 ml di acqua, appare una notevole differenza: il vino con l'estratto risulta di tonalità più chiara rispetto al vino puro. Ciò significa che l'estratto non solo è poco solubile in vino, ma lo schiarisce addirittura.

### **Conclusione**

L'estrazione in metanolo non si è rivelata efficace: se a prima vista l'estratto ottenuto dalla percolazione presenta un buon colore e una buona consistenza, in seguito alle analisi le prime impressioni vengono contraddette. Dall'analisi cromatografica viene evidenziata la presenza di antociani, tuttavia le proporzioni teoriche, smentiscono l'ipotesi che l'estratto sia composto esclusivamente da antociani, di conseguenza si deduce che esso contenga numerose sostanze estranee tra cui probabilmente tannini (anch'essi sono in parte responsabili della colorazione del vino, vedi punto 5.2), questa ipotesi viene confermata dalla prova organolettica di degustazione: l'estratto a contatto con la lingua presenta un gusto amaro e "lega" appunto come i tannini, gli antociani al contrario non dovrebbero dare sensazioni particolari (vedi punto 5.2). Si dovrebbe a questo punto cercare una conferma a questa ipotesi eseguendo sull'estratto un'analisi dei tannini mediante spettroscopia nell'infrarosso.

Queste conclusioni permettono quindi di stabilire che con ogni probabilità l'estrazione con alcol metilico è tutt'altro che selettiva. Le prove qualitative di solubilità e intensità di colore in provetta, evidenziano solo una debole solubilità dell'estratto in vino; inoltre l'aggiunta dell'estratto al vino non sortisce gli effetti attesi per quanto riguarda la colorazione e la sua intensità.

Gli obiettivi non sono quindi stati raggiunti, ed è impensabile di utilizzare a livello di produzione estratti ottenuti usando il metanolo. Non si può comunque negare le proprietà estrattive di questo solvente (vedi punto 10.1); il problema sta nel fatto che esso non è selettivo nei confronti degli antociani e che i composti estratti non sono in seguito ben solubili in un vino. Evidentemente la differenza di polarità tra metanolo e acqua/etanolo gioca un ruolo assai importante.

Tuttavia va comunque detto che è inammissibile l'idea di aggiungere dell'alcol metilico, che è tossico per l'uomo, al vino (è già successo in passato con produttori di vino Chianti, e le conseguenze sono state luttuose).

Nella prossima prova verrà tuttavia riutilizzato l'alcol metilico, più in particolare una macerazione in bagno a ultrasuoni: con questa esperienza si vuole capire se le proprietà estrattive dei solventi sono ostacolate da fattori fisici quali la struttura delle membrane che immobilizza fisicamente i composti di interesse, in questo caso gli antociani, in particolare se glicosidati. E' infatti risaputo che gli ultrasuoni possono concorrere a demolire le strutture cellulari.

A questo scopo verranno paragonate una macerazione in metanolo e una macerazione in metanolo eseguita in un bagno ad ultrasuoni. Per quanto riguarda l'idrolisi, non avendo un protocollo specifico per gli antociani glicosidati e non avendo bene in chiaro gli effetti prodotti da quello utilizzato al punto 10.1, si è deciso di operare in seguito senza idrolizzare le bucce fermentate.

### 10.3 Prova di estrazione mediante bagno ad ultrasuoni

Nelle conclusioni del precedente punto, è già stato accennato lo scopo di questa prova: si intende verificare se un'azione distruttiva sulle membrane e sulle pareti cellulari possano migliorare l'effetto estrattivo dei solventi (metanolo, etanolo, acqua) sugli antociani; per questo verranno confrontate una macerazione in metanolo in condizioni normali e una macerazione in metanolo in bagno ad ultrasuoni. Viene scelto il metanolo unicamente come solvente indicativo, in quanto ha mostrato proprietà estrattive migliori degli altri solventi presi in considerazione (vedi punto 10.1). L'estrazione mediante ultrasuoni non si può definire una tecnica estrattiva vera e propria, sarebbe più corretto affermare che gli ultrasuoni aiutino il processo estrattivo, come in questo caso, una macerazione. Impiegando gli ultrasuoni si immette energia nel sistema che si traduce in evaporazione locale del solvente con effetto devastante sulle superfici solide generati dall'implosione delle bollicine di vapore (cavitazione).<sup>34</sup>

#### **Principio**

Un campione di uva fermentata viene fatto macerare in metanolo in un bagno ad ultrasuoni; altri due campioni vengono invece fatti macerare semplicemente in acqua e metanolo. Alla fine del processo vengono confrontate le soluzioni ottenute e la colorazione (rispettivamente la scolorazione) delle bucce d'uva.

#### **Procedimento**

Tre campioni da 10 g di bucce di uva fermentate vengono posti in tre bicchieri diversi. Nei tre bicchieri vengono poi aggiunti i solventi: nel primo acqua e nei restanti due metanolo puro. I primi due bicchieri contenenti acqua e alcol metilico seguono un processo di macerazione normale, mentre l'ultimo, contenente metanolo, viene sottoposto ad una macerazione in un bagno ad ultrasuoni: il bicchiere viene immerso in acqua nell'apparecchio Sonorex TK 30 (vedi figura 29).

I tre processi di macerazione vengono protratti durante 90 minuti.



**Fig. 29** Macerazione in bagno ad ultrasuoni

#### **Risultati**

I tre bicchieri vengono affiancati e confrontati: dapprima viene presa in considerazione la tonalità della soluzione. Come previsto l'acqua ha dato scarsi risultati, il succo d'uva ottenuto ha una colorazione viola chiara, viene così confermata la debole proprietà estrattiva nei confronti degli antociani dell'acqua (vedi punto 10.1). La tonalità della soluzione di metanolo è, come ci si aspettava, più scura del succo d'uva, e uguale alla colorazione della soluzione di metanolo che ha subito l'effetto degli ultrasuoni. Per quanto riguarda il grado di colorazione delle bucce si nota che quelle sottoposte a macerazione in metanolo sono maggiormente scolorate rispetto a quelle macerate in acqua. Tra i due campioni macerati in metanolo non si notano differenze di tonalità (vedi figura 30).



**Fig. 30** I risultati delle diverse macerazioni: da sinistra, bucce + acqua, seguite da bucce + metanolo e bucce + metanolo dopo il bagno a ultrasuoni.

In tabella 7 vengono riassunti i risultati ottenuti:

Bicchiere	Quantità di uva	Tecnica estrattiva	Solvente	Durata	Colore soluzione	Scolorazione delle bucce
1	10 g	Macerazione	Acqua	90 min	Viola	Scarsissima
2	10 g	Macerazione	Metanolo	90 min	Viola intenso	Leggera
3	10 g	Macerazione in bagno ad ultrasuoni	Metanolo	90 min	Viola intenso	Leggera

**Tab. 7** I risultati delle prove di macerazione senza e con l'utilizzo degli ultrasuoni.

### Discussione

Evidentemente i risultati ottenuti dimostrano che l'azione degli ultrasuoni non sembra essere di grande aiuto per l'estrazione degli antociani dalle bucce d'uva. Lo si può dedurre per il fatto che la macerazione semplice e quella mediante bagno ad ultrasuoni ha prodotto soluzioni e bucce d'uva di uguale tonalità e intensità di colore pur lasciando agire gli ultrasuoni per un tempo relativamente lungo.

### Conclusione

La generazione di ultrasuoni non dimostra nel nostro caso, proprietà ausiliario-estrattive. A questo punto occorre procedere con altri solventi, perché come detto il metanolo non è selettivo e quindi inadeguato, e se necessario, cambiare tecnica estrattiva.

#### 10.4 Prove preventive di estrazione mediante impiego di CO<sub>2</sub> quale mezzo di trasporto di solventi ed estratti.

Sulla base degli esperimenti svolti da Dario Bottinelli si decide di indagare l'effetto sul potere estrattivo di un solvente (metanolo, etanolo, acqua) generato da un passaggio dalla fase liquida alla fase aeriforme. In fase aeriforme si ha una drastica diminuzione della viscosità e un aumento altrettanto importante della diffusività. Per mantenere un elevato potere solvente occorre però una densità elevata e diventa possibile generando una fase di gas denso (fluido supercritico), ciò che richiede di superare le condizioni critiche (pressione e temperatura critiche). Con metanolo, etanolo e acqua queste condizioni sono assai severe e difficilmente ottenibili. È altresì possibile ottenere fasi aeriformi dense sciogliendo questi solventi in anidride carbonica supercritica, in condizioni di pressione e temperatura più facilmente raggiungibili.

Tuttavia gli esperimenti condotti da Dario Bottinelli non hanno mostrato effetti spettacolari soprattutto per quanto riguarda la colorazione delle bucce a fine processo;

Si vedano negli allegati i tentativi preliminari di estrazione con Supelco SFE-400.

Sulla base di alcuni riferimenti bibliografici (vedi punto 5.6), si decide di indagare il possibile ruolo coadiuvante dell'anidride solforosa, composto facilmente ottenibile in fase aeriforme e supercritica, quindi facilmente trasportabile dalla CO<sub>2</sub> unitamente a solventi quali acqua e alcoli.

## 10.5 Prove preliminari di estrazione con l'impiego di SO<sub>2</sub> e verifica dell'estratto

### 10.5.1 Verifica delle proprietà estrattive dell'SO<sub>2</sub>

Prima di effettuare vere e proprie prove di estrazione con l'impiego di SO<sub>2</sub>, è opportuno verificarne il comportamento di questo composto su di una soluzione di antociani; in questo caso viene testato l'effetto dell'acido solforoso (soluzione acquosa di anidride solforosa al 5%) sul succo d'uva. Questo perché l'SO<sub>2</sub> potrebbe avere un duplice effetto:

1. scolorare gli antociani delle bucce senza effettivamente estrarli per effetto sul pH della presenza di acido solforoso in equilibrio evidenziando soltanto un illusorio effetto temporaneo.
2. Distruggere la parete cellulare facilitando l'accesso dei solventi e la mobilizzazione degli antociani

### Principio

Del succo d'uva, assieme alle bucce d'uva dal quale è stato prodotto, vengono messi a contatto con una soluzione contenente acido solforoso e anidride solforosa in equilibrio. In seguito bucce e succo d'uva vengono sottoposti a cambiamenti di pH.

### Procedimento

Viene preparato il succo d'uva: 43,27 g di uva sono messi in 200 ml di acqua; il tutto viene sottoposto a riscaldamento e agitazione per 30 minuti. Quindi la miscela viene filtrata per ottenere una soluzione omogenea di succo d'uva separatamente dalle bucce. 40 ml di filtrato e 5 g di uva vengono messi in due bicchieri; a questi vengono poi aggiunti 10 ml di acido solforoso. Dopo circa 10 minuti, con una pinzetta vengono prelevate le bucce d'uva sottoposte all'azione dell'SO<sub>2</sub> e vengono messe a contatto con una soluzione 2M di NaOH e in seguito con una soluzione 2M di HCl. Le due stesse soluzioni vengono aggiunte anche al succo d'uva miscelato con acido solforoso e alla soluzione di acido solforoso dal quale sono state tolte le bucce.

### Risultati



**Fig. 31** Bucce d'uva immerse in acido solforoso

Dopo l'aggiunta dell'acido solforoso, il succo d'uva, inizialmente di colore viola viene schiarito notevolmente, così come le bucce, che appaiono fortemente decolorate assieme all'acido solforoso stesso in cui sono immerse (vedi figura 31). Dopo l'aggiunta di idrossido di sodio, il succo d'uva diventa blu, poi verde e infine giallo e con l'aggiunta di acido cloridrico da giallo ridiventa verde, blu, viola, per poi divenire rosso e rosa. Lo stesso accade alla soluzione di acido solforoso dalla quale sono state tolte le bucce d'uva (vedi figura 32). Si tratta dei tipici colori assunti dagli antociani in funzione del pH<sup>35</sup>.

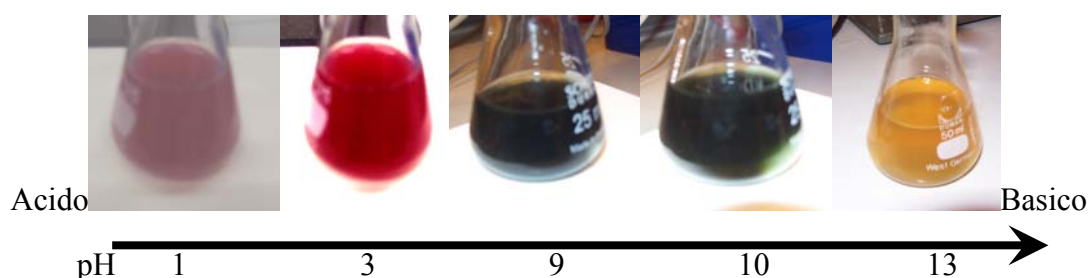
Quando sono però le bucce ormai decolorate a essere messe a contatto con NaOH e HCl, esse non mutano colore e rimangono biancastre.



**Fig. 32** Colorazione blu scura degli antociani a pH leggermente basico

### Discussione

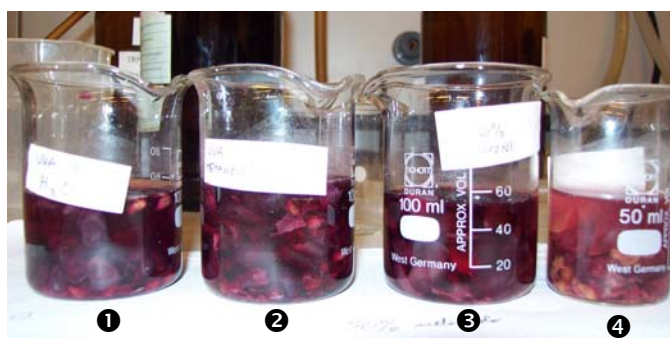
I risultati ottenuti sono promettenti e facilmente interpretabili: il succo d'uva che contiene antociani, quando viene messo a contatto con l'acido solforoso si schiarisce grazie alle proprietà decoloranti dell' $\text{SO}_2$ ; quando alla soluzione viene cambiato il pH essa muta però colore comportandosi proprio come gli antociani: con l'aumentare della basicità diventa rosa, rossa, blu, verde (somma del blu e del giallo) e gialla (vedi figura 33). Lo stesso accade alla soluzione di acido solforoso nella quale sono state immerse le bucce d'uva: ciò significa che anche questa soluzione contiene antociani, e che la trasparenza, così come nel caso precedente è dovuta all'azione decolorante sugli stessi antociani da parte dell'anidride solforosa. Quando sono però le bucce scolorate a essere sottoposte a cambiamenti di pH, esse rimangono tali e non cambiano quindi tonalità, segnale che in esse non vi è più (o almeno quasi) presenza di antociani, che sono quindi stati estratti.



**Fig. 33** Gli antociani cambiano colore in funzione del pH dell'ambiente in cui si trovano. Nell'immagine è illustrata la tendenza a vari pH.

### Conclusioni

L'anidride solforosa, come evidenziato nel succo d'uva, ha un forte e visibile effetto decolorante verso gli antociani, tuttavia possiede anche un forte potere estrattivo nei confronti di questi quando sono nelle bucce (per confronto vedi figura 34). In realtà, come viene citato dalla letteratura, non si tratta proprio di un potere estrattivo: l'azione dissolvente, con ogni probabilità è piuttosto un'azione distruttiva delle cellule delle bucce di uva, che cedono quindi più facilmente i loro componenti solubili come appunto gli antociani, a loro volta estratti poi dall'acqua o dai solventi.



**Fig. 34** L'effetto dell'acqua (1), del metanolo (2), del metanolo in bagno ad ultrasuoni (3) e dell'acido solforoso (4) sulle bucce d'uva. Si noti l'enorme differenza: se i primi 3 campioni sono pressoché uguali (vedi punto 10.3), l'ultimo si distingue per scolorazione delle bucce (azione estrattiva dell' $\text{SO}_2$ ) e tonalità più chiara della soluzione (azione candeggiante dell' $\text{SO}_2$ )

### 10.5.2 Macerazione in anidride solforosa ( $H_2SO_3/SO_2$ )

L'anidride solforosa è molto impiegata nei processi di vinificazione (vedi 5.6 e 5.9). Essa possiede infatti proprietà antisettiche e decoloranti. Sono descritte proprietà estrattive selettive<sup>36</sup>, in particolare verso l'enocianina, che è appunto un'antocianina.

Vengono quindi eseguite delle verifiche qualitative: una macerazione delle bucce d'uva fermentate in una soluzione di anidride solforosa al 5% (l'acido solforoso  $H_2SO_3$ ), e una macerazione mediante l'utilizzo del metabisolfito di sodio, un sale che sviluppa  $SO_2$ .

#### Principio

Un campione di uva fermentata viene lasciato a contatto con acido solforoso (soluzione acquosa di  $SO_2$  al 5%).

#### Procedimento

Sotto cappa, 10 ml di acido solforoso  $H_2SO_3$  vengono versati in un bicchiere contenente 10,4 g di uva fermentata. Il tutto viene agitato e lasciato in seguito a riposo per 90 minuti. Si osserva quindi il grado di colorazione delle bucce e la tonalità della soluzione ottenuta.

#### Risultati

Di primo acchito l'acido solforoso non sembra avere effetto solvente; vengono così aggiunti 10 ml di acqua: la soluzione non risulta molto colorata, ma in compenso il grado di scolorazione delle bucce è strabiliante, appaiono molto chiare e in alcuni punti addirittura bianche (vedi figura 35).

Sottoponendo la soluzione filtrata a riscaldamento in modo che l'anidride solforosa possa evaporare completamente si osserva la comparsa della colorazione scura della soluzione. Per contro le bucce che sembrano rimanere decolorate, dopo alcuni giorni riacquistano un po' di tonalità.



**Fig. 35** Se la soluzione di acido solforoso risulta più chiara rispetto a quella di metanolo osservata in precedenza, in compenso il grado di scolorazione delle bucce è evidente, in alcuni punti tendono al bianco.

#### Discussione

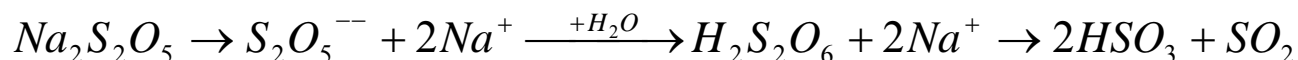
I risultati ottenuti fanno pensare ad un effetto scolorante della  $SO_2$ : le bucce di primo acchito appaiono infatti completamente decolorate analogamente alla soluzione, poi dopo alcuni giorni riprendono un po' di colore. Occorre verificare se parallelamente avviene pure estrazione oppure se nella forma decolorata gli antociani acquistano solubilità in acqua o alcol/acqua.

### **10.5.3 Macerazione con metabisolfito di sodio**

Viene impiegata di seguito una macerazione alternativa con l'impiego del metabisolfito di sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ), un sale contenente circa il 60-62% di anidride solforosa, che a contatto con acqua dovrebbe appunto venir liberata.

#### **Principio**

Uva fermentata viene messa in un bicchiere contenente acqua, al quale viene aggiunto del metabisolfito di sodio. Il sale in acqua dovrebbe liberare  $\text{SO}_2$  secondo la reazione seguente:



#### **Procedimento**

10 g di uva fermentata vengono messi in un bicchiere, al quale vengono aggiunti 100 ml di acqua e 3 cucchiaini di metabisolfito di sodio. Si agevola la dissoluzioni agitando e si lascia quindi riposare per 90 minuti. Si osserva quindi il grado di colorazione delle bucce e la tonalità della soluzione ottenuta.

#### **Risultati**

Non si nota nulla di significativo: le bucce non sono decolorate e la soluzione ha una tonalità violastra.

#### **Discussione**

Il mancato effetto potrebbe essere dovuto al fatto che la reazione di decomposizione del metabisolfito non generi una concentrazione sufficiente di  $\text{SO}_2$  all'equilibrio.

#### **Conclusioni**

La macerazione mediante l'impiego di  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  non ha avuto esito positivo. Occorre quindi scartare questo metodo per concentrarsi sulla macerazione mediante acido solforoso/anidride solforosa eseguita in precedenza approfondendo le osservazioni sull'effetto che si genera sulla soluzione e sulle bucce durante il riscaldamento delle stesse dopo la scolorazione per contatto.

### **10.5.4 Concentrazione del colore e dell'estratto**

Come già esposto in precedenza, la soluzione più o meno trasparente ottenuta dalla macerazione dell'uva in acido solforoso, viene sottoposta a riscaldamento per eliminare l'anidride solforosa e recuperare quindi il colore degli antociani dell'estratto.

#### **Principio**

La soluzione di acido solforoso viene riscaldata producendo l'evaporazione dell'anidride solforosa prima e dell'acqua poi; si osservano i cambiamenti di colore.

#### **Procedimento**

La miscela eterogenea contenente le bucce viene filtrata. Il filtrato, viene poi trasferito in una beuta, che viene sottoposta a riscaldamento a  $100^\circ\text{C}$  sotto cappa. Si lascia il tutto fino a secchezza.

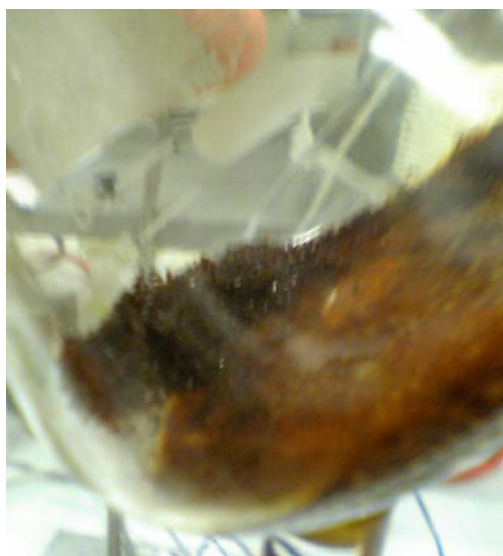
## Risultati

Durante il riscaldamento, con il proseguire dell'evaporazione, si osserva un progressivo scurimento della soluzione, che tende al marrone scuro (vedi figura 36). Inoltre vi è la presenza di particelle bianche in sospensione che precipitano in seguito.



**Fig. 36** La soluzione di acido solforoso e antociani sottoposta a riscaldamento. Come si nota dalla sequenza di immagini con l'avanzare del processo, la soluzione si scurisce progressivamente in funzione dell' $\text{SO}_2$  evaporata: gli antociani stanno recuperando colore.

A evaporazione terminata si ottiene sul fondo della beuta un concentrato solido di colore marrone molto scuro (vedi figura 37).



**Fig. 37** L'estratto secco ottenuto dall'evaporazione dell'acido solforoso e dell'acqua.

## Discussione

Durante il riscaldamento la soluzione si scurisce, recuperando e concentrando il colore: segnale che l'anidride solforosa sta evaporando, cessando così la sua azione decolorante. L'estratto ottenuto dall'evaporazione è molto scuro e ha natura pastosa come quello ottenuto dall'estrazione mediante Soxhlet (vedi punto 10.2.2. ); è probabile in esso la presenza di antociani, e più in particolare di enocianina, poiché è verificato che il solvente usato abbia proprietà estrattive e più o meno selettive verso i composti fenolici. Il problema però sta nel fatto che anche i tannini (sostanze poco desiderate) siano dei composti fenolici, ed è quindi probabile che anch'essi siano presenti nell'estratto ottenuto.

## Conclusioni

L'estratto ottenuto promette bene, presenta consistenza tipica degli antociani ed un colore molto scuro. L'impiego di  $\text{SO}_2$  è stato quindi appropriato ed ha avuto successo: il composto pastoso ottenuto ha le caratteristiche ottiche tipiche degli antociani. Tuttavia occorre effettuare le analisi qualitative per caratterizzare l'estratto e confermare questa prima impressione.

### 10.5.5 Caratterizzazione dell'estratto

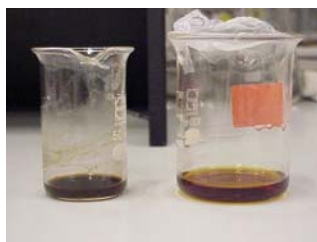
Vengono effettuate come in precedenza (vedi punto 10.2), le prove di solubilità, la prova organolettica e l'analisi cromatografica.

#### 10.5.5.1 Cromatografia TLC

##### Principio

Viene eseguita secondo lo stesso principio adottato per l'estratto soxhlet un'analisi cromatografica sull'estratto ottenuto dalla macerazione in anidride solforosa e dalla susseguente evaporazione: il protocollo utilizzato è lo stesso del punto 10.2.3). Come riferimento viene utilizzato l'estratto soxhlet già analizzato in precedenza. Vengono preparate di conseguenza due piastre: sulla prima si depositano campioni di estratto Soxhlet e campioni di estratto ottenuto con anidride solforosa, sull'altra piastra esclusivamente campioni di estratto ottenuto con anidride solforosa.

##### Procedimento



**Fig. 38** Le due soluzioni da analizzare: a sinistra estratto Soxhlet, a destra estratto macerazione  $\text{SO}_2$

Dell'estratto ottenuto dalla macerazione in  $\text{SO}_2$  viene sciolto in una soluzione di etanolo al 10% simile al vino (quest'ultima deve essere molto concentrata, si consiglia quindi di diminuire il solvente e aumentare il soluto fino a saturazione completa), mentre viene recuperata la soluzione di metanolo e estratto analizzata in precedenza (vedi figura 38), assieme alla soluzione-reagente di acetato di piombo (II) da impiegare poi sul cromatogramma.

Due piastre in gel di silice 60F25H vengono quindi preparate: con una matita si tracciano le linee dello start a circa un centimetro dall'inizio delle due piastre, queste vengono poi messe ad essiccare in forno a  $110^\circ\text{C}$ . Durante l'essiccazione si prepara la consueta soluzione eluente, composta da etilacetato, diclorometano, acido formico e acqua (35 + 15 + 5 + 3) e la si versa nella camera accuratamente risciacquata in precedenza. Nella camera sigillata viene quindi immersa della carta assorbente per alcuni minuti, per saturare l'ambiente con i vapori dell'eluente.

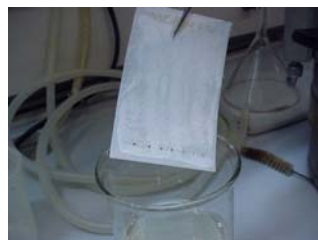
Si procede quindi all'analisi cromatografica:

Si preparano le due soluzioni da analizzare (è importante che non vi sia la presenza di particelle in sospensione: devono essere entrambe limpide) e si procede quindi al deposito. Le due piastre vanno trattate nel seguente modo: sulla prima, con l'aiuto di appositi capillari molto fini, vengono depositati sulla linea dello start 3 campioni di estratto vecchio (estrazione Soxhlet) e 3 campioni di estratto nuovo (macerazione in  $\text{SO}_2$ ), mentre sulla seconda esclusivamente campioni di estratto nuovo. Da ricordare che i depositi siano piccoli e molto concentrati e che tra una concentrazione e l'altra risulta utile asciugare la piastra con l'ausilio di un phon. Queste vengono quindi messe nella camera dell'eluente e ivi lasciate per circa 20 minuti (vedi figura 39).



**Fig. 39** Le piastre nella camera dell'eluente

A tempo trascorso, le piastre, vengono tolte dalla camera e con l'ausilio di una pinza vengono immerse una dopo l'altra nella soluzione di acetato di piombo per un secondo (vedi figura 40). Infine vengono messe in forno ad asciugare a 80°C per 20 minuti. A essiccazione avvenuta, le piastre possono essere quindi passate ai raggi UV di lunghezza d'onda  $\lambda = 365 \text{ nm}$  e essere analizzate (vedi figura 41).



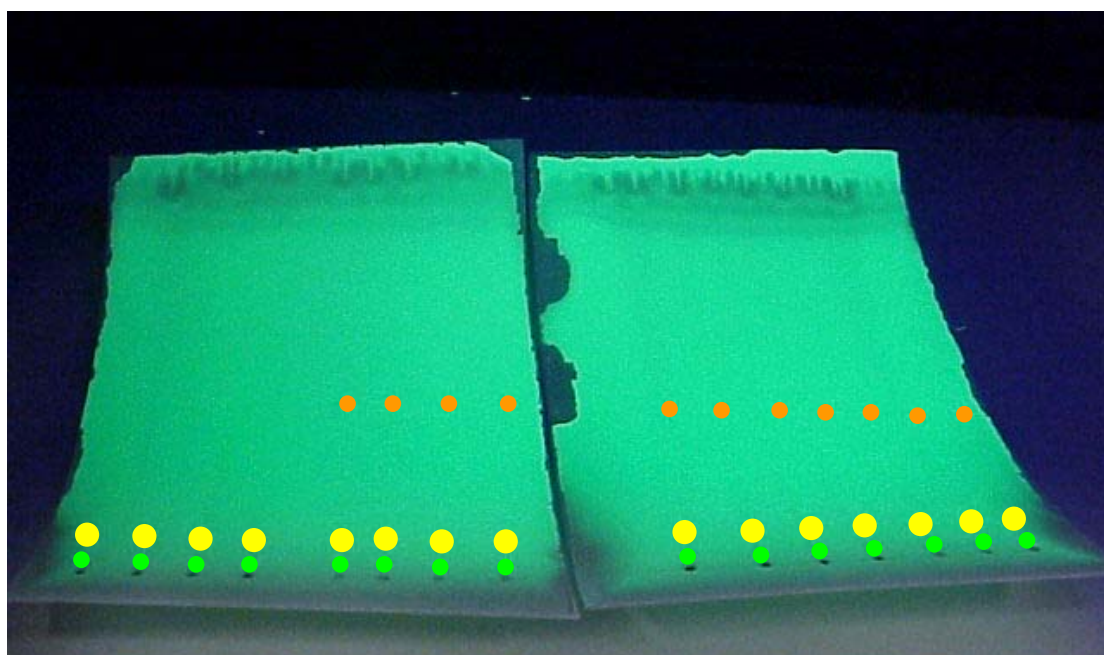
**Fig. 40** La piastra viene immersa nella soluzione-reagente di acetato di piombo



**Fig. 41** Lampada UV per analisi cromatografica

## Risultati

Si osserva che la soluzione di estratto soxhlet in metanolo risulta più scura della corrispondente soluzione ottenuta con l'estratto da anidride solforosa (confronto figura 38). Sulla prima piastra vengono rilevate le solite due deboli macchie fluorescenti gialla e verde in corrispondenza dei campioni di estratto soxhlet; in corrispondenza dei campioni di estratto da anidride solforosa si nota, oltre alle macchie verdi (hRF= 5-10) e gialle ben visibili (hRF= 10-15) (hRF=40-45), una macchia centrale tendente all'arancione. Sulla seconda piastra, esclusivamente composta da campioni di estratto ottenuti dalla macerazione, si ottiene lo stesso risultato ma più visibile nel caso della zona arancione (vedi figura 42).



**Fig. 42** Le piastre sotto l'azione dei raggi UV, anche questa volta nella fotografia non si notano le zone fluorescenti, vengono quindi aggiunte per elaborazione grafica. Si noti come la macchia arancione sia visibile solo per i campioni di estratto ottenuto dall'acido solforoso. Per un confronto guardare figura 21 che mostra il cromatogramma del protocollo seguito.

Anche la macchia arancione, è caratteristica dei flavonoidi. Tuttavia le macchie verdi e gialle dei campioni di estratto nuovo, risultano un'altra volta troppo poco visibili rispetto al risultato che ci si aspetterebbe in base alla letteratura.

**Discussione**

La tonalità più scura (tendente al marrone) della soluzione contenente l'estratto ottenuto dal Soxhlet, è probabilmente dovuta ad un effetto ossidante: la soluzione, così come l'estratto stesso, prima di essere riutilizzati sono stati a riposo parecchio tempo; questo spiegherebbe l'ancor più debole rilevazione (rispetto alla precedente analisi) delle due zone gialle e verdi sul cromatogramma.

I risultati ottenuti sono tuttavia interessanti: il confronto tra i due estratti mostra chiaramente che quello ottenuto dalla macerazione contiene più flavonoidi rispetto a quello prodotto mediante estrazione con soxhlet/metanolo in base alla più marcata fluorescenza delle macchie gialle e verdi e alla presenza di una macchia arancione. Tutte queste macchie hanno valori di RF compatibili con quelli riportati in letteratura.

Nonostante la presumibile maggior selettività dell'anidride solforosa rispetto al metanolo non può essere esclusa la presenza di componenti coestratti. Per questo motivo occorrono altre analisi, come ad esempio una degustazione e una spettrometria infrarossa dell'estratto per evidenziare un'eventuale e probabile presenza di tannini.

**10.5.5.2 Prova organolettica di degustazione****Principio**

Come eseguito in precedenza, al punto 10.2.4, per la caratterizzazione dell'estratto sarebbe utile eseguire anche delle analisi organolettiche: una semplice prova di degustazione. Si intende verificare un'eventuale presenza di tannini, che donerebbe all'estratto un gusto astringente ed amaro. Gli antociani non dovrebbero infatti possedere gusto.

Una piccola quantità di estratto viene posta sulla lingua e degustata; le papille gustative dovrebbero quindi entrare in azione e analizzare il gusto. Gli antociani non dovrebbero venir rilevati dalle papille, in quanto la loro conformazione strutturale non si addice a quella delle papille stesse.

**Procedimento**

Parte dell'estratto viene grattato dalla beuta, deposto sulla lingua e degustato. Ne viene in seguito caratterizzato il gusto: se si tratta di una sostanza salata, dolce, amara o acida.

**Risultati**

Il risultato ottenuto dalla degustazione è un gusto quasi neutro, con una punta però di amaro.

**Discussione**

La degustazione ha rilevato un leggero sapore amaro, segno che nell'estratto, vi è la presenza di composti tanninici. Essendo questi di natura flavonoidea, è possibile che siano stati estratti dall' $\text{SO}_2$  assieme agli antociani. Il risultato è comunque migliore rispetto al sapore dell'estratto precedente: se questo presentava una forte caratteristica astringente e amara nel gusto, il nuovo estratto esibisce solo una debole percezione amara. Questo tuttavia a delle papille gustative poco allenate e preparate, sarebbe opportuno far degustare l'estratto ad un esperto enologo.

## Conclusioni

La macerazione in  $\text{SO}_2$  si è rivelata un processo migliore per ottenere l'estrazione di flavonoidi e più in particolare di antociani. L'analisi cromatografica ne conferma infatti la presenza nell'estratto ottenuto, qualitativamente e quantitativamente migliore di quello prodottosi dall'estrazione Soxhlet.

La prova organolettica lascia supporre una debole presenza di composti tanninici; L'anidride solforosa sembra quindi dare risultati migliori rispetto al metanolo, anche come selettività.

Un'analisi quantitativa sia degli antociani, sia eventualmente dei tannini sarebbe comunque opportuna.

### 10.5.6 Prove qualitative di solubilità e colorazione

In seguito all'analisi cromatografica e organolettica, viene eseguita una prova qualitativa di solubilità e colorazione da parte dell'estratto di una soluzione di etanolo al 10%, simile alla composizione del vino.

#### Principio

Una quantità di estratto viene trasferita in una soluzione di etanolo al 10% per osservarne il comportamento: in particolare vengono prese in considerazione la solubilità e l'intensità di colorazione. L'intensità della colorazione dipende dalla facilità con cui l'estratto si solubilizza. Il colore è invece principalmente dovuto alla struttura molecolare che gli antociani assumono in seguito alle condizioni di acidità e basicità della soluzione che si genera.

#### Procedimento

piccole quantità di estratto vengono sciolte in 20 ml di una soluzione di alcol etilico al 10%. In seguito viene misurato il pH della soluzione ottenuta con il pH-metro, e con l'aiuto di miscele acide e basiche si porta il pH ad un valore tipico per i vini (3-4). Vengono quindi osservati i cambiamenti di colore col variare del pH (per un'ulteriore verifica della presenza di antociani) della soluzione, e la sua tonalità finale.

#### Risultati

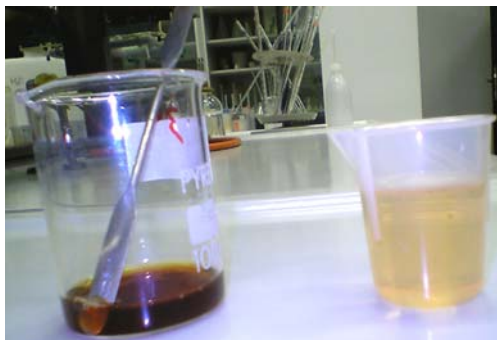


**Fig. 43** L'estratto sciolto in una soluzione di etanolo al 10%

L'estratto si scioglie senza difficoltà nella soluzione.

Dopo la solubilizzazione, il colore che appare è quello tipico del succo di mele (vedi figura 43) con un pH di 5.75. Viene quindi aggiunta qualche goccia di soluzione HCl concentrato (25%): il pH scende fino a 1.36, ma il colore della soluzione non cambia. Si riporta quindi il pH a valori basici con NaOH 2M: l'ambiente diventa fortemente basico (pH 13.18) e il colore sembra scurirsi leggermente. Viene di nuovo aggiunto dell'acido cloridrico fino a pH 2, con la conseguenza che la tonalità rimane invariata.

In 10 ml di un'altra soluzione di etanolo al 10%, nella quale vengono poi disciolti 0,25 g di estratto si osserva un colore marrone scuro a pH 4.8 (confronto figura 44).. Viene di nuovo aggiunto dell'acido cloridrico, fino a pH 3.13 e si osserva una colorazione marrone scura tendente al rosso.



**Fig. 44** Le due soluzioni ottenute di etanolo al 10% con estratto messe a confronto: il colore chiaro della soluzione a destra è dovuto esclusivamente ad un problema di concentrazione dell'estratto disciolto, troppo poco rispetto alla soluzione a sinistra.

### Discussione

Le mancate variazioni di tonalità riscontrate nella prima prova sono dunque correlate ad un'insufficiente concentrazione dell'estratto in soluzione. Risulta positivo il fatto che l'estratto non presenta difficoltà a miscelarsi con la soluzione di etanolo al 10%, questo potrebbe far pensare ad una futura aggiunta di questo a vino vero e proprio. Inoltre il comportamento della soluzione al variare del pH è analogo a quello degli antociani, verificato in precedenza con del succo d'uva (vedi punto 10.5.1), viene quindi confermata un'importante presenza di flavonoidi nell'estratto.

### Conclusioni

Il potere estrattivo selettivo dell'anidride solforosa verso i flavonoidi viene confermato: la macerazione in  $\text{H}_2\text{SO}_3$  / $\text{SO}_2$  ha dato risultati soddisfacenti per quanto riguarda il colore della soluzione e del concentrato ottenuto e il grado di scolorazione delle bucce sottoposte al processo: gli antociani, unici responsabili del colore del vino assieme ai tannini, vengono estratti in misura superiore rispetto al metanolo; l'analisi cromatografica ha infatti confermato una maggior presenza di flavonoidi, Il comportamento dell'estratto al variare del pH, ne riconferma inoltre la natura flavonoidea. La prova di degustazione ha però rivelato una probabile presenza di tannini. Il loro influsso è però limitato poiché il gusto percepito è minimo, sicuramente inferiore rispetto all'estratto in metanolo. Solo prove di solubilizzazione in vino con degustazione da parte di specialisti può dire se la selettività dell'estrazione è sufficiente. La prova di aggiunta ha dato risultati soddisfacenti, non sono state evidenziate alcune difficoltà di dissoluzione da parte del concentrato nella soluzione di etanolo al 10%, ciò significa che non si riscontrerebbero difficoltà di solubilizzazione dell'estratto in vino: viene così incrementata la speranza di un possibile utilizzo commerciale dell'estratto ottenuto dalla macerazione in  $\text{SO}_2$ . A completare il quadro vi è la prova di colore: la tonalità della soluzione ottenuta a pH 3.13 (molto simile all'ambiente del vino) è buona, un marrone scuro tendente al rosso che potrebbe rinforzare la colorazione del vino al quale verrebbe aggiunta. Una verifica in tal senso non è stata eseguita in quanto il vino da noi ottenuto fermentando le bucce non rappresenta un riferimento attendibile.

Per un'applicazione industriale del principio occorre a questo punto ottimizzare l'azione dell'anidride solforosa per quanto riguarda la selettività, i tempi di processo, e la totalità dell'estrazione.

Per rendere maggiormente efficace il contatto tra anidride solforosa e materia prima (bucce) e per migliorare la capacità di trasporto degli antociani estratti, viene verificata la fattibilità tecnica di una estrazione con anidride solforosa in fase di gas denso con l'utilizzo di  $\text{CO}_2$  supercritica quale solvente della stessa.

### 10.6 Prove di estrazione con CO<sub>2</sub> supercritica e SO<sub>2</sub> come cosolvente

La tecnica di estrazione con CO<sub>2</sub> supercritica si basa su una tecnologia innovativa; non sono descritti in letteratura lavori nei quali venga utilizzata anidride solforosa quale cosolvente in unione alla CO<sub>2</sub>. Il lavoro di Dario Bottinelli ha evidenziato una certa capacità estrattiva della CO<sub>2</sub>, probabilmente dovuta però all'azione dell'acqua quale cosolvente. Combinando questi risultati con i precedenti sulla macerazione in SO<sub>2</sub>, si ipotizza un potere solvente da parte di una miscela CO<sub>2</sub>/SO<sub>2</sub>/acqua oppure CO<sub>2</sub>/SO<sub>2</sub>/alcol.

Vengono quindi progettati degli esperimenti impiegando l'estrattore a fluidi supercritici Separex SFE-500.

Questo impianto pone una limitazione importante nel senso che non possiede una pompa secondaria per miscelare un cosolvente alla CO<sub>2</sub> prima dell'entrata del fluido di processo nella camera di estrazione.

Una seconda limitazione consiste nel fatto che con questo apparecchio non è possibile ottenere SO<sub>2</sub> supercritica, in quanto non è possibile raggiungere e superare la temperatura critica  $T_c=157,65^\circ\text{C}$ ; la si può comunque liquefare superando largamente la pressione critica  $P_c=78,84$  bar (si lavora a pressioni pari a 150 bar circa) e miscelare alla CO<sub>2</sub> supercritica creando una fase di gas denso.

Una terza limitazione imposta dalla procedura, è la mancanza di SO<sub>2</sub> gassosa che potrebbe essere direttamente immessa e miscelata all'apparecchio estrattore assieme alla CO<sub>2</sub>: la fornitura di bombole di SO<sub>2</sub> con relative valvole comporterebbe un investimento eccessivo.

Al posto del gas viene quindi usata la soluzione acquosa di anidride solforosa al 5% in l'acido solforoso già utilizzata per la prova di macerazione. Questo viene messo a contatto con le bucce direttamente nella camera di estrazione, dove avviene quindi una sorta di prima macerazione; in seguito viene immessa nella camera la CO<sub>2</sub> supercritica producendo una solubilizzazione dell'anidride solforosa nella fase supercritica. L'azione distruttiva da parte dell'SO<sub>2</sub> sulle cellule dell'uva fermentata dovrebbe liberare gli antociani, che verrebbero quindi trasportati dal fluido supercritico (CO<sub>2</sub> + SO<sub>2</sub>), per uscire poi dai separatori e venire quindi raccolti in un estratto. Risulta inoltre utile essiccare le bucce fermentate prima dell'estrazione, in modo che l'acqua in esse contenuta, venga eliminata e non vada quindi a interferire in qualità di ulteriore cosolvente durante il processo estrattivo, almeno nelle prime prove esplorative. In letteratura non ci è stato possibile trovare dati di solubilità dell'SO<sub>2</sub> in CO<sub>2</sub> supercritica, questo ci obbliga a lavorare con quantitativi e condizioni fissati empiricamente.

#### **Principio**

Un campione di uva fermentata ed essiccata viene caricato nel panierino, il quale è poi sistemato nella camera estrattiva dell'apparecchio SFE-500. Viene aggiunto direttamente alle bucce dell'acido solforoso. La camera viene quindi pressurizzata. Dopo un periodo di contatto in condizioni statiche viene attivata la circolazione a riciclo del fluido attraverso la camera.

#### **Procedimento**

Il panierino viene riempito fino a circa tre quarti della sua altezza con 40 g di uva fermentata ed essiccata. Viene quindi calcolato il quantitativo di acido solforoso da aggiungere alle bucce: impiegando una portata di 2 kg di CO<sub>2</sub> all'ora, si calcola che circa il 2% della massa totale di solvente circolante debba essere composto da SO<sub>2</sub>; vengono quindi quantificati 40 g di acido

solforoso. Questo viene versato nel panierino, che viene chiuso e posizionato nella camera dell'estrattore. Si preparano i recipienti raccoglitori da sistemare sotto i tre separatori: essendo l'anidride solforosa un gas tossico ed irritante, vengono impiegate tre beute sigillate, dalle quali fuoriescono tre rispettivi tubicini di plastica, che vengono convogliati in un recipiente lontano dall'impianto estrattore; in questo modo si evitano gli effetti dell' $\text{SO}_2$ . Si procede quindi all'estrazione: vengono impostati i parametri di temperatura sul display digitale, e si fa fluire l'anidride carbonica, regolandone la portata tramite le manopole della pompa. Durante l'estrazione di tanto in tanto vengono aperte le valvole dei tre separatori e dell'estrattore per raccogliere l'estratto e far diminuire la pressione dei separatori stessi. Dopo circa 60 minuti, si spegne l'apparecchio e quando la pressione dell'estrattore e dei tre separatori è uguale a 0 bar, si può aprire la camera e recuperare il panierino con il carico di uva che viene quindi analizzato.

### 10.6.1. Prima estrazione

#### Risultati

In tabella 8 è riassunto il protocollo della prima estrazione:

Tempo (min)	Portata (kg/h)	P estrattore (bar)	P S1 (bar)	P S2 (bar)	P S3 (bar)	T estrattore (°C)	T S1 (°C)	T S1/S2 (°C)
0	2	120	60	60	60	45	55.1	55
60	2.2	140	60	60	60	45	55.1	55.6
90	3.2	140	60	60	60	45	55.4	55.3
<u>100</u>	3.4	140	60	60	60	45	55.1	55.4
<u>110</u>	3.4	140	60	60	60	45	54.9	55
<u>120</u>	2.4	140	60	60	60	45	54.9	55

Tab. 8 Protocollo della prima estrazione SFE-500. "S"=separatori.

Durante l'estrazione dai separatori esce un estratto color marrone, più chiaro di quello che esce dalla valvola dell'estrattore e quindi direttamente dalla camera, che presenta una tonalità marrone molto scura (vedi figura 45). A estrazione terminata viene verificato il contenuto del panierino: le bucce sono decolorate ma non completamente (vedi figura 46); Tuttavia dopo qualche giorno di essiccazione esse ritornano scure; rispetto alle bucce di partenza la scolorazione appare a questo punto assai ridotta. Vengono quindi riuniti e messi in un bicchiere gli estratti dei tre separatori, accanto all'estratto della camera.



Fig. 45 Gli estratti riuniti dei tre separatori e l'estratto della camera ottenuti dalla prima estrazione mediante  $\text{CO}_2$  supercritica e  $\text{SO}_2$  come cosolvente



**Fig. 46** Le bucce d'uva dopo la prima estrazione con CO<sub>2</sub> supercritica e acido solforoso: nel panierino appaiono decolorate ma non totalmente.

### Discussione

Con l'impianto utilizzato per questi esperimenti, la prima prova svolta per una specifica applicazione è da ritenersi solo indicativa in quanto rappresenta un processo di condizionamento dell'impianto volto a eliminare possibili residui rimasti nell'impianto dalle applicazioni precedenti. Il colore più scuro dell'estratto della camera rispetto a quello dei separatori, è dovuto alla forte pressione che questa assieme alle bucce d'uva subisce durante il processo estrattivo: in sostanza la colorazione è dovuta alla compressione esercitata sulle bucce. Le bucce risultano a prima vista comunque molto decolorate, segno dell'effetto dell'SO<sub>2</sub>, tuttavia è probabile che l'anidride carbonica supercritica non abbia trasportato gli antociani. Il fatto che le bucce riacquistino una colorazione scura lascia supporre che gli antociani siano solo stati scolorati ma non estratti. Da quanto osservato relativamente alle prove di macerazione è possibile che la forma scolorata degli antociani sia parecchio polare e che richieda metanolo o etanolo per essere estratta. La CO<sub>2</sub> è invece un solvente apolare. La sua polarità può tuttavia essere aumentata sciogliendo in essa un alcol. Gli estratti mantengono invece la loro colorazione bruna originale.

Per una verifica delle ipotesi sopra espresse si decide di effettuare una seconda prova di estrazione con lo stesso campione di uva usato nella prima, sostituendone però una piccola quantità di bucce trattate nella prima prova con dell'uva fermentata ed essiccata fresca;

#### 10.6.2. Seconda estrazione

10 g di bucce precedentemente estratte vengono sostituiti con 10 g di bucce essiccate e fermentate. Viene quindi aggiunto un altro carico da 40 g di acido solforoso al panierino.

### Risultati

In tabella 9 è riassunto il protocollo della seconda estrazione:

tempo (min.)	Portata (kg/h)	P estrattore (bar)	P S1 (bar)	P S2 (bar)	P S3 (bar)	T estrattore (°C)	T S1 (°C)	T S1/S2 (°C)
0	2	120	120	120	120	45	50	55
15	2.23	260	75	75	75	45	56	55
30	2.4	260	60	60	60	45.3	48.9	56

**Tab. 9** Protocollo della seconda estrazione SFE-500.

Questa volta si è deciso di operare a pressioni maggiori pari a 260 bar, in questo modo l'azione solvente e trascicante dell'anidride carbonica dovrebbe essere incrementata.

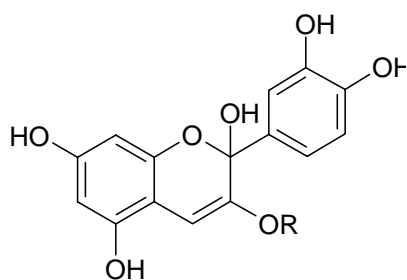
## Risultati

Si sono riscontrati gli stessi risultati della precedente estrazione: dopo una settimana, le bucce d'uva che sembravano totalmente decolorate e quindi prive di antociani, hanno ripreso la loro tonalità, sempre di intensità minore rispetto alle bucce originali e a quelle dopo la prima estrazione; si riescono a distinguere comunque i 10 g di uva sostituiti prima dell'esperienza: appaiono più colorati del resto delle bucce, segno che la prima estrazione ha davvero concentrato una parte di antociani negli estratti ottenuti dai separatori e dalla camera, che anche per questa seconda prova vengono raccolti e imbottigliati.

## Discussione

Sembra che l'azione combinata dell'anidride carbonica supercritica e dell'SO<sub>2</sub> liquida non funzioni come previsto: le bucce dovrebbero rimanere fortemente decolorate e non solo temporaneamente. A questo punto nasce il dubbio che l'impiego di acido solforoso sia improprio: probabilmente esso non rimane in circolo assieme alla CO<sub>2</sub>, ma viene scaricato dalla valvola della camera assieme all'estratto, producendo così solo un passeggero effetto di macerazione sulle bucce d'uva fermentate ed essiccate. A questo proposito viene eseguita una terza estrazione, effettuando poi una prova di solubilità delle bucce trattate in vari solventi.

### 10.6.3. Terza estrazione



**Fig. 47** Formula di struttura degli antociani incolore a pH 4-5

Dalla letteratura, risulta come gli antociani, nella loro forma incolore attorno a pH 4-5, presentino numerosi gruppi alcolici (idrossi) OH, che aumentano quindi la polarità della molecola e fanno pensare ad un aumento di solubilità in solventi più o meno polari come l'acqua e l'etanolo (vedi figura 47). A questo proposito, in questa prova di estrazione viene supposto che l'azione decolorante dell'SO<sub>2</sub> comporti anche una variazione di pH per le molecole di antociani, che come descritto dalla letteratura aumenterebbero la loro polarità. In seguito

all'estrazione mediante CO<sub>2</sub> supercritica e SO<sub>2</sub> come cosolvente le bucce fortemente decolorate, vengono messe in diversi bicchieri contenenti solventi a polarità decrescente: acqua, etanolo, dicloroetano ed esano. Dopo un periodo di contatto di un giorno, filtrazione e essiccazione delle bucce si osserva il grado di scolorazione delle bucce stesse.

## Risultati

In tabella 10 sono riassunte le condizioni di pressione e temperatura della terza estrazione:

tempo (min.)	Portata (kg/h)	P estrattore (bar)	P S1 (bar)	P S2 (bar)	P S3 (bar)	T estrattore (°C)	T S1 (°C)	T S1/S2 (°C)
0	2	100	70	70	70	40	52.3	52.7
10	2	100	70	70	70	40.5	53.6	54.9
30	2.3	100	70	70	70	42	54	55.6

**Tab. 10** Protocollo della terza estrazione SFE-500.

Dopo l'estrazione come previsto si riscontrano i risultati precedenti.

Dopo il contatto nei vari solventi per 24 ore si nota che le bucce immerse nell'esano e nel cicloesano hanno ripreso il loro colore così come in parte nell'acqua, con una conseguente

leggera colorazione della soluzione; il risultato nell'etanolo è sorprendente: la soluzione si è fortemente colorata di un marrone scuro (vedi figura 48) e le bucce sono rimaste decolorate (anche se meno rispetto a quando sono state tolte dal Separex SFE-500).



**Fig. 48** Le bucce dopo l'estrazione vengono immerse in etanolo: il solvente prende una tonalità marrone scura mentre le bucce rimangono decolorate.

Viene quindi filtrata la miscela eterogenea uva-etanolo per assicurarsi che le bucce rimangano permanentemente decolorate, e viene concentrato il filtrato (l'estratto) per evaporazione (vedi figura 49).



**Fig. 49** La miscela etanolo-antociani (filtrato) in fase di concentrazione per evaporazione.

Le bucce, anche dopo parecchi giorni, non cambiano colorazione (vedi figura 50); ciò che si ottiene dalla concentrazione dell'estratto è un solido di natura pastosa, dalla colorazione marrone molto scura.



**Fig. 50** Le bucce d'uva messe a contatto con l'etanolo dopo l'estrazione con Separex SFE-500 rimangono decolorate permanentemente (a sinistra). Si noti la differenza di tonalità rispetto a bucce fermentate ed essiccate non sottoposte ad estrazione (a destra).

**Discussione**

Le bucce sono rimaste decolorate e l'etanolo, si è ben concentrato in componenti colorati. La supposizione che SO<sub>2</sub> scolori alterando i valori di pH sembra essersi rivelata corretta, tuttavia sarebbe necessario misurare con il pH-metro l'ambiente in cui si trovano le bucce d'uva subito dopo l'estrazione. In seguito sarebbe opportuno analizzare l'estratto della soluzione di etanolo, caratterizzarlo, paragonarlo e se necessario aggiungerlo a quello uscito dall'estrattore SFE-500, verificando infine che le bucce restino effettivamente e permanentemente decolorate. Ancora sarebbe utile studiare le condizioni migliori per ottenere l'estrazione e la decolorazione massima possibile e inoltre risulterebbe molto più opportuna la costruzione di una pompa da aggiungere al Separex SFE-500 per miscelare le quantità di acido solforoso durante il processo estrattivo: in questo modo si è sicuri che l'SO<sub>2</sub> non venga dispersa e che circoli effettivamente assieme all'anidride carbonica supercritica. Purtroppo però, per motivi di tempo e di costi tutto ciò non risulta possibile.

**Conclusioni**

La CO<sub>2</sub> sembra dare buoni risultati quale fluido di trasporto della SO<sub>2</sub> nel tessuto delle bucce producendo la scolorazione degli antociani nella totalità della massa. Nella forma scolorata ad opera della SO<sub>2</sub> gli antociani risultano solubili in etanolo. Dopo contatto con CO<sub>2</sub>/SO<sub>2</sub> e immersione in etanolo le bucce rimangono scolorate in modo permanente mentre dalla soluzione etanolica si ottiene un solido scuro che si scioglie in seguito facilmente in vino. Questo procedimento in due fasi potrebbe però essere sostituito da un processo continuo sciogliendo nella CO<sub>2</sub> oltre alla SO<sub>2</sub> anche dell'etanolo, il cui uso quale cosolvente della CO<sub>2</sub> è ben descritto in letteratura<sup>37</sup>. In tal modo dovrebbe essere possibile decolorare permanentemente le bucce e trasportare gli antociani nel flusso di fluido supercritico composto dai tre componenti. Nel separatore dove viene scaricato l'estratto possono pure essere evaporati in buona parte i due cosolventi che possono essere quindi riciclati insieme alla CO<sub>2</sub> e ricircolati fino a completezza dell'estrazione.

Questo procedimento estrattivo è comunque da affinare con una pompa dosatrice per l'anidride solforosa e per l'etanolo in grado di miscelare questi cosolventi con la CO<sub>2</sub> prima dell'entrata nella camera di estrazione.

## 11. CONCLUSIONI FINALI

Con questo lavoro si è cercato di incrementare le proprietà salutari del vino Merlot e aumentare allo stesso tempo l'intensità della sua colorazione, recuperando, mediante un'estrazione massiccia e selettiva, gli antociani dalle bucce residue dopo la vinificazione.

Lo studio del processo di estrazione effettuato con vari solventi e con differenti tecniche ha permesso di appurare che lo stesso è determinato essenzialmente da tre fattori:

1. l'immobilizzazione degli antociani nella struttura cellulare.
2. la struttura molecolare assunta dalle molecole di antociani a seconda delle condizioni di pH della soluzione in cui si trovano e che ne determina la polarità.
3. il solvente utilizzato in funzione della struttura molecolare assunta dalle molecole di antociani nelle particolari condizioni di estrazione.

Il primo fattore richiede che la struttura cellulare venga demolita affinché i pigmenti possano essere rilasciati. Il secondo fattore è da associare al terzo: occorre creare delle condizioni di pH per le quali gli antociani assumano una forma ben solubile in un solvente compatibile con gli obiettivi alimentari, idealmente acqua o etanolo.

Il mezzo migliore per demolire la struttura molecolare sembra essere il contatto delle bucce con l'anidride solforosa (SO<sub>2</sub>) piuttosto che l'impiego degli ultrasuoni o l'ebollizione prolungata. Nelle condizioni di pH generate dall'anidride solforosa il solvente migliore per la separazione degli antociani dalla matrice sembra essere l'etanolo. D'altra parte il mezzo migliore per garantire un contatto capillare tra anidride solforosa e tessuto cellulare sembra essere l'anidride carbonica supercritica nella quale la SO<sub>2</sub> si scioglie apprezzabilmente. Importante appare in ogni caso che le bucce siano precedentemente fermentate a completezza. Non ci risulta del tutto chiaro se dopo la fermentazione e prima del contatto con la SO<sub>2</sub> sia o meno importante un processo di idrolisi in soluzione di acido cloridrico.

Il miglior risultato estrattivo è stato ottenuto trattando le bucce fermentate con una soluzione di anidride solforosa in anidride carbonica supercritica nell'impianto su scala laboratorio e sottoponendo in seguito le bucce a macerazione in etanolo. Le bucce sono risultate stabilmente decolorate e parallelamente si è ottenuto un estratto molto scuro con le caratteristiche chimiche degli antociani e con deboli caratteristiche tanniniche.

Al contrario estrazioni condotte su tempi molto lunghi con metanolo conducono a estratti con forti caratteristiche tanniniche lasciando nel contempo parecchio pigmento nelle bucce.

Abbiamo buoni motivi per credere che le bucce fermentate possano essere estratte direttamente (in un solo stadio) utilizzando una soluzione di anidride solforosa e etanolo in anidride carbonica supercritica.

In questo senso andrebbero effettuate :

1. una prova di estrazione con anidride carbonica supercritica dopo l'aggiunta alle bucce caricate nel panierino di una soluzione di anidride solforosa e di etanolo nelle stesse condizioni operative applicate nella prova 10.6.3.

2. prove di estrazione con soluzioni di anidride solforosa e etanolo (cosolventi) in anidride carbonica supercritica prodotte tramite pompa dosatrice e miscelazione prima dell'accesso alla camera di estrazione

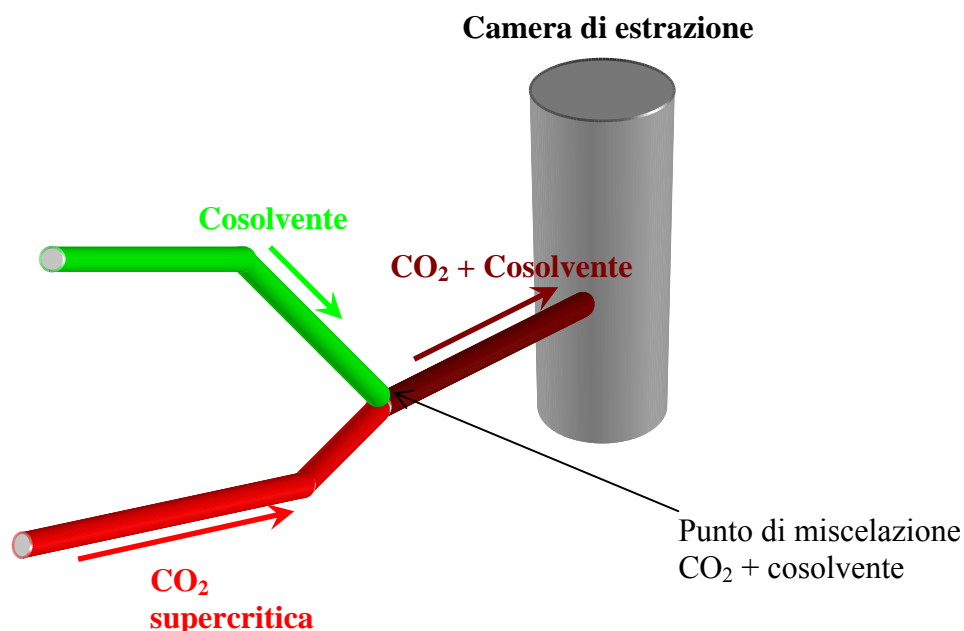
Questa seconda fase di esperimenti, da effettuarsi in caso di esito positivo della prova 1, richiede la modifica dell'impianto Separex con l'inserimento di una pompa dosatrice HPLC e di una condotta per la miscela di cosolventi con relativa valvola. In queste condizioni diventerebbe possibile eseguire uno studio di ottimizzazione dei parametri di processo per ottenere il massimo effetto estrattivo nel minor tempo possibile.

L'estrazione semplice mediante CO<sub>2</sub> supercritica è stata in parte abbandonata, poiché è stato appurato che è richiesto troppo per ottenere buoni risultati, e non sarebbe quindi atta ad essere utilizzata su scala produttiva. Dopo un'indagine preliminare sulla solubilità delle bucce d'uva in vari solventi, è stata eseguita una prova di estrazione Soxhlet e in seguito una macerazione mediante ultrasuoni usando come solvente il metanolo. I risultati di queste prove hanno però prodotto un concentrato scadente sia a livello di composizione, sia a livello di solubilità e colorazione del vino, appurando così la scarsa selettività dell'alcol metilico verso gli antociani.

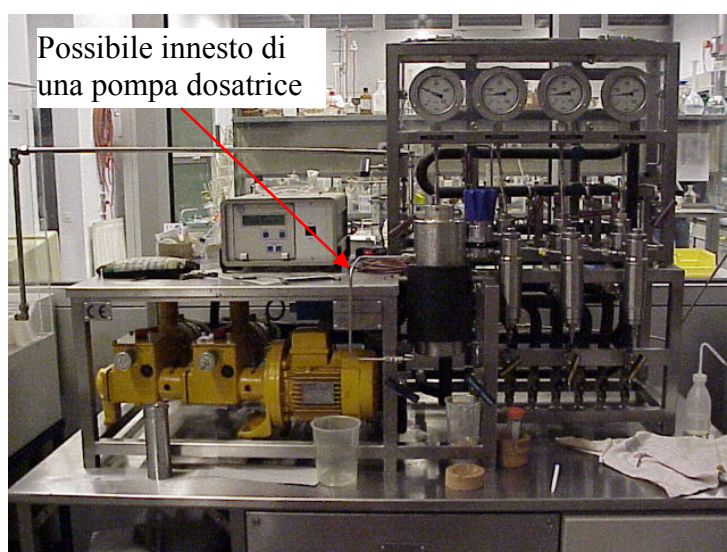
Dopo una ricerca in letteratura si è passati all'impiego dell'anidride solforosa, già utilizzata in vinificazione come antisettico e per le sue particolari proprietà estrattive e selettive verso i composti fenolici e in particolare l'enocianina, che è appunto un'antocianina. È stata quindi eseguita come verifica una macerazione in acido solforoso (soluzione acquosa di SO<sub>2</sub> al 5%), che ha dato buoni risultati consistenti in una buona scolorazione delle bucce d'uva e un estratto di qualità contenente antociani. Ciò nonostante questa tecnica è già conosciuta ed utilizzata in enologia, si è quindi optato per una soluzione alternativa, cercando di sfruttare le proprietà dell'anidride solforosa: questa soluzione si è concretizzata in una tecnica completamente nuova e probabilmente sconosciuta alla letteratura: un'estrazione con l'utilizzo di CO<sub>2</sub> supercritica e acido solforoso come cosolvente. Questa tecnica presenta tuttavia alcune lacune che hanno inciso sui risultati: l'acido solforoso innestato direttamente nella camera di estrazione non sembra un buon espediente, in quanto al primo passaggio di CO<sub>2</sub> viene portato via ed espulso tramite le valvole dei separatori assieme all'estratto. Il risultato è che l'uva non rimanendo permanentemente a contatto con l'anidride solforosa, ne subisce solo un forte ed immediato effetto decolorante, che svanisce dopo alcuni giorni dall'estrazione con la ripresa in parte della tonalità originaria. Questo imprevisto tecnico è stato smorzato impiegando un'immediata macerazione in etanolo delle bucce subito dopo il processo estrattivo. L'alcol comune si è verificato efficace come solvente, producendo un buon estratto (tuttavia da analizzare) e impedendo la ricolorazione dell'uva. Per i risultati ottenuti è stata formulata un'ipotesi plausibile: l'effetto dell'anidride solforosa, che consiste nella distruzione delle cellule delle bucce d'uva favorendo l'estrazione dei suoi componenti solubili (vedi punto 5.6), sarebbe solo temporaneo; dopo il primo passaggio di CO<sub>2</sub> supercritica, il cosolvente viene spazzato via con un'infima quantità di antociani, lasciandone però ancora parecchi e temporaneamente decolorati nelle cellule distrutte delle bucce; l'azione della sola CO<sub>2</sub> non sarebbe quindi sufficiente a proseguire l'estrazione. Una macerazione in etanolo delle bucce subito dopo l'azione dell'acido solforoso, permetterebbe all'alcol di estrarre gli antociani rimasti, permettendo i risultati osservati nella terza prova di estrazione sperimentale del punto 10.6.3.

In futuro sarebbe però possibile evitare la macerazione in etanolo, affinando la tecnica di estrazione mediante CO<sub>2</sub> supercritica e SO<sub>2</sub>: si tratterebbe solo di evitare la dispersione dell'acido solforoso durante il processo estrattivo. Per questo proposito sarebbe necessario un intervento sull'impianto Separex SFE-500: l'aggiunta di una pompa dosatrice. La condotta

pressurizzata sarebbe fissata tramite un raccordo a T, al tubo per il passaggio della  $\text{CO}_2$  supercritica il prima possibile dell'entrata nella camera di estrazione, in modo da garantire una sufficiente miscelazione tra solvente e cosolvente (si veda lo schema rappresentato in figura 51 e 52). La pompa sarebbe così in grado di miscelare costantemente, a concentrazione, pressione, temperatura e tempo desiderati, un qualsiasi cosolvente (in questo caso l'acido solforoso) nella camera di estrazione, impedendone l'immediato dilavamento da parte dell'anidride carbonica. Il risultato sarebbe un estratto molto più concentrato e di qualità, non bisognoso di altri trattamenti per aumentare l'estrazione come in questo caso la macerazione in etanolo.



**Fig. 51** L'intervento sull'impianto Separex schematizzato: occorrerebbe aggiungere una pompa dosatrice per far entrare e miscelare il cosolvente prima della camera di estrazione. In questo modo il cosolvente sarebbe in continuo circolo nella  $\text{CO}_2$  supercritica.



**Fig. 52** L'impianto Separex SFE-500 con indicato il possibile punto di innesto della pompa HPLC.

Per un lavoro di ricerca futuro, con conseguenti sperimentazioni, al fine di ottimizzare ulteriormente le estrazioni, occorrerebbe prima effettuare un'idrolisi acida sulle bucce d'uva, per deglicosidare gli antociani contenuti in esse; al momento della redazione di questo lavoro è stata infatti scoperta in letteratura, un'idrolisi esclusiva per i flavonoidi glicosidati<sup>38</sup>, che permetterebbe una sicura deglicosidazione, verificabile poi tramite un saggio (sempre rintracciato di recente) apposito per i flavonoidi glicosidati<sup>39</sup>: se l'analisi cromatografica non dovesse presentare risultato alcuno, allora significherebbe che le code di zuccheri degli antociani sarebbero effettivamente state eliminate.

Nonostante non si sia riusciti a raggiungere pienamente gli obiettivi prefissatisi all'inizio del lavoro, si può essere pienamente soddisfatti dei risultati ottenuti considerando il tempo avuto a disposizione: è infatti spesso noto che per raggiungere a degli ottimi risultati e conseguire delle scoperte scientifiche, ci vogliono a volte parecchi anni; si ritiene comunque che questa ricerca sperimentale abbia gettato delle ottime basi per un lavoro futuro nel campo dell'estrazione degli antociani dalle bucce d'uva.

## ALLEGATI

### **10.4.1 Prove preventive di estrazione mediante impiego di CO<sub>2</sub> quale mezzo di trasporto di solventi ed estratti.**

In seguito a queste considerazioni viene tentata un'estrazione di prova mediante CO<sub>2</sub> supercritica e metanolo come cosolvente. Per questa esperienza verrà usato in un primo tempo l'estrattore Supelco SFE-400.

#### **Principio**

Campioni di bucce fermentate ed idrolizzate vengono impregnate con del metanolo e lasciate esposte al contatto con CO<sub>2</sub> supercritica che avviene per diffusione a condizioni variabili.

#### **Procedimento**

Prima di procedere con l'estrazione, viene lasciata fermentare nuovamente in un pallone da 500 ml la massa di uva da utilizzare, questo per assicurarsi che non vi sia più la presenza di zuccheri liberi generati dal processo di idrolisi, che andrebbero ad ostacolare l'estrazione. Viene preparato un campione di 10 ml di uva fermentata ed idrolizzata: dopo essere stato messo nel piccolo cilindro di estrazione, evitando l'eccessiva compressione che andrebbe ad ostacolare il passaggio dell'anidride carbonica, le bucce vengono impregnate di metanolo. Il cilindro viene chiuso e inserito nella camera di estrazione.

Si accende l'estrattore e si scalda il capillare di uscita con l'ausilio della camera, che nel frattempo si è riscaldata fino alla temperatura impostata; viene posizionato un bicchierino sotto il capillare per raccogliere il futuro estratto. Dopo aver raggiunto i parametri di pressione impostati, viene lasciata circolare l'anidride carbonica e si inizia quindi con l'estrazione.

#### **Risultati**

Dopo l'idrolisi non si è più osservato sviluppo di CO<sub>2</sub>.

La prima estrazione non ha avuto esito positivo, non si è infatti riusciti a raccogliere alcun estratto. È stata quindi eseguita una seconda prova cambiando il capillare di uscita, ma anch'essa non ha avuto un riscontro positivo. In tabella 3 vengono riassunti i risultati dell'esperienza:

<b>Estrazione</b>	<b>Temperatura CO<sub>2</sub></b>	<b>Pressione CO<sub>2</sub></b>	<b>Particolarità</b>	<b>Osservazioni e risultati</b>
1	50°C	200 bar	Il capillare di uscita viene riscaldato.	Estrazione fallita
2	50°C	200 bar	Il capillare di uscita viene sostituito e quindi riscaldato.	Estrazione fallita

**Tab. 3** La tabella riassume i risultati dell'estrazione mediante CO<sub>2</sub> supercritica.

#### **Discussione**

Come si è potuto constatare dai risultati, le due prove di estrazione non sono andate a buon fine. Questo non significa però che l'anidride carbonica non abbia proprietà estrattive. In realtà l'esito negativo si deve attribuire con ogni probabilità all'otturazione del capillare di uscita: infatti immergendo l'estremità dello stesso in acqua non è stato possibile osservare

l'uscita della CO<sub>2</sub>. Questo inconveniente è tipico dell'estrattore Supelco che presenta un vero e proprio punto debole nel sistema di depressurizzazione mediante capillare libero.

**Conclusioni**

Non si è purtroppo potuto verificare l'azione estrattiva dell'anidride carbonica supercritica con l'aggiunta di metanolo come cosolvente, almeno per quanto riguarda il piccolo estrattore Supelco SFE-400. Ciò non toglie l'ipotesi di una futura estrazione utilizzando l'impianto Separex SFE-500 dotato di un sistema di depressurizzazione e di scarico dell'estratto molto più affidabile ed efficace.

## RINGRAZIAMENTI

Ringraziamo tutte le persone che ci hanno aiutato in questo lavoro di ricerca: dalla preparazione, allo svolgimento e alla redazione finale.

In particolare i nostri più sentiti ringraziamenti sono rivolti a:

- l'enologo e presidente ORPI Bruno Botta, che ha gentilmente messo a disposizione il suo tempo fornendo testi e preziosissimi aiuti e consigli, indispensabili all'indirizzamento del lavoro e al raggiungimento dei risultati ottenuti;
- il presidente della Commissione culturale Federviti (Federazione Viticoltori della Svizzera Italiana) Gabriele A. Losa, per aver gentilmente messo a disposizione i suoi testi personali;
- i professori di chimica del LiLu2 per i consigli fornitici, ed in particolare il professor Devittori, per il materiale, i suggerimenti, la pazienza e l'assistenza gentilmente fornita;
- il professor Ivo Maroni per averci fatto conoscere e apprezzare la chimica.

---

## BIBLIOGRAFIA

---

- <sup>1</sup> Losa, Gabriele, "Salutari questi polifenoli", in Ticino vino, la rivista di chi ama i sapori della tavola, n. 4, dicembre 2003, pag.43
- <sup>2</sup> Losa, Gabriele, "Salutari questi polifenoli", in Ticino vino, la rivista di chi ama i sapori della tavola, n. 4, dicembre 2003, pag.43
- <sup>3</sup> Ribéreau-Gayon P., Glories Y, Maujean A., Dubourdieu D., "Trattato di enologia II", Edagricole Bologna 2003, pag. 144
- <sup>4</sup> Losa, Gabriele, "Action antioxydante et modulation de l'apoptose par le resvératrol dans les cellules humaines immunocompétentes mononucléaires du sang", in Bulletin de l'O.I.V. Revue internationale, vol. 46-871-872, settembre-ottobre 2003, pag. 817-819
- <sup>5</sup> Losa, Gabriele, "La straordinaria proprietà dei polifenoli", in Ticino vino, la rivista di chi ama i sapori della tavola, n. 4, dicembre 2003, pag. 51
- <sup>6</sup> Bossi, Giancarlo, "Teoria e pratica della degustazione dei vini", Dyanthus Edizioni, Castelvetro Piacentino 1988, pag. 31-36
- <sup>7</sup> Divisione di Didattica della Società Chimica Italiana, Gruppo Nazionale di Fondamenti e Storia della Chimica, Dipartimento di Chimica Generale ed Organica Applicata, Università di Torino, "Dizionario di Chimica e Chimica Industriale", <<http://www.minerva.unito.it/Chimica&Industria/Dizionario/DizF.htm>>, consultazione 10.1.2005
- <sup>8</sup> Ribéreau-Gayon P., Glories Y, Maujean A., Dubourdieu D., "Trattato di enologia II", Ed agricole, Bologna 2003, pag. 144
- <sup>9</sup> Ribéreau-Gayon P., Glories Y, Maujean A., Dubourdieu D., "Trattato di enologia II", Ed agricole, Bologna 2003, pag. 145
- <sup>10</sup> Ribéreau-Gayon P., Glories Y, Maujean A., Dubourdieu D., "Trattato di enologia II", Ed agricole, Bologna 2003, pag. 145
- <sup>11</sup> Ribéreau-Gayon P., Glories Y, Maujean A., Dubourdieu D., "Trattato di enologia II", Ed agricole, Bologna 2003, pag. 145-146
- <sup>12</sup> Valla, Claudio, "Vitis vinifera (uva, vino)", <[http://www.lecurenaturali.com/uva\\_vino\\_propriet%C3%A0.htm](http://www.lecurenaturali.com/uva_vino_propriet%C3%A0.htm)>, consultazione 11.1.2005
- <sup>13</sup> Brady James E., John R. Holum, "Chimica: I fatti e i perché", Zanichelli, Bologna 1996, pag. 204-205
- <sup>14</sup> Exenia Group S.r.l., "Fluidi Supercritici", <<http://www002.portalis.it/67/products.htm>>, consultazione 15.9.2004
- <sup>15</sup> Bottinelli Dario, "Estrazione selettiva di antociani dalle bucce d'uva mediante tecnologie innovative", lavoro di maturità in chimica LiLu2 Savosa, 2003, pag. 8
- <sup>16</sup> Dott. Paronetto Lamberto.,Dott. Dal Cin Gildo, "I prodotti chimici nella tecnica enologica", Scuola d'arte tipografica Don Bosco, Verona, 1954, pag. 58-64 e 73-86
- <sup>17</sup> Azienda Villa Martina, "Approfondimenti: l'anidride solforosa", <<http://www.villamartina.it/bignami/tecnici/solforosa.htm>>, consultazione 18.1.2005
- <sup>18</sup> Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud A. "Trattato di enologia I", Ed agricole, Bologna, 2004, pag. 213

- 
- <sup>19</sup> Ribéreau-Gayon P., Dubourdiou D., Donèche B., Lonvaud A. "Trattato di enologia I", Ed agricole, Bologna, 2004, pag. 214
- <sup>20</sup> Air Liquide Corporation, "Gas Data", <<http://www.airliquide.com/en/business/products/gases/gasdata/index.asp>>, consultazione 15.11.2004
- <sup>21</sup> Merck Research Laboratories, "The Merck Index \* Twelfth Edition", BOH, White House Station N.J., 1996, pag. 1534
- <sup>22</sup> Consiglio federale svizzero, "Ordinanza sulle derrate alimentari", UFCL, Distribuzione pubblicazioni, Berna, 1° luglio 2004, pag. 144-146
- <sup>23</sup> Dott. Paronetto Lamberto., Dott. Dal Cin Gildo, "I prodotti chimici nella tecnica enologica", Scuola d'arte tipografica Don Bosco, Verona, 1954, pag. 244-248
- <sup>24</sup> Dott. Paronetto Lamberto., Dott. Dal Cin Gildo, "I prodotti chimici nella tecnica enologica", Scuola d'arte tipografica Don Bosco, Verona, 1954, pag. 245
- <sup>25</sup> Ribéreau-Gayon P., Dubourdiou D., Donèche B., Lonvaud A. "Trattato di enologia I", Ed agricole, Bologna, 2004, pag. 213
- <sup>26</sup> Bottinelli Dario, "Estrazione selettiva di antociani dalle bucce d'uva mediante tecnologie innovative", lavoro di maturità in chimica, LiLu2 Savosa, 2003, pag. 10
- <sup>27</sup> Guidotti Marcello, "Tecnologia farmaceutica: sonicazione", <<http://www.galenotech.org/sonicazione.htm>>, consultazione 13.1.2005
- <sup>28</sup> Bottinelli Dario, "Estrazione selettiva di antociani dalle bucce d'uva mediante tecnologie innovative", lavoro di maturità in chimica, LiLu2 Savosa, 2003, pag. 10-11
- <sup>29</sup> Bottinelli Dario, "Estrazione selettiva di antociani dalle bucce d'uva mediante tecnologie innovative", lavoro di maturità in chimica, LiLu2 Savosa, 2003, pag. 27-28
- <sup>30</sup> Bottinelli Dario, "Estrazione selettiva di antociani dalle bucce d'uva mediante tecnologie innovative", lavoro di maturità in chimica, LiLu2 Savosa, 2003, pag. 28
- <sup>31</sup> Jork, Funk et al, "Dünnschicht-Chromatographie: Reagenzien und Nachweismethoden", Band 1a, VHC, 1990, pag. 277-280
- <sup>32</sup> Jork, Funk et al, "Dünnschicht-Chromatographie: Reagenzien und Nachweismethoden", Band 1a, VHC, 1990, pag. 219-221
- <sup>33</sup> Bottinelli Dario, "Estrazione selettiva di antociani dalle bucce d'uva mediante tecnologie innovative", lavoro di maturità in chimica, LiLu2 Savosa, 2003, pag. 3
- <sup>34</sup> Guidotti Marcello, "Tecnologia farmaceutica: sonicazione", <<http://www.galenotech.org/sonicazione.htm>>, consultazione 13.1.2005
- <sup>35</sup> Steinegger, Hänsel, "Pharmakognosie", 5. Auflage, Springer-Lehrbuch, Berlin, 1992, pag. 402
- <sup>36</sup> Ribéreau-Gayon P., Dubourdiou D., Donèche B., Lonvaud A. "Trattato di enologia I", Ed agricole, Bologna, 2004, pag. 214
- <sup>37</sup> E.Reverchon, A.Schiraldi, P.Fantozzi, "Fluidi Supercritici: applicazioni agroalimentari", Raisa, Milano, 1993, pag.38
- <sup>38</sup> Jork, Funk et al, "Dünnschicht-Chromatographie: Reagenzien und Nachweismethoden", Band 1a, VHC, 1990, pag. 62

<sup>39</sup> Jork, Funk et al, "Dünnschicht-Chromatographie: Reagenzien und Nachweismethoden", Band 1b, VHC, 1990, pag. 271 e seguenti