

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
“AMEDEO AVOGADRO”**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche

TESI DI LAUREA

**Estrazione assistita da ultrasuoni: sviluppo di sistemi in
batch e in circolo per la valorizzazione di foglie di vite e di
melo**

Relatore

Prof.ssa Monica LOCATELLI



Firmato digitalmente da Monica Locatelli
Data: 25.09.2026 15:56:53 CEST
Organizzazione: UNIVERSITA' DEGLI
STUDI DEL PIEMONTE
ORIENTALE/01943490027

Candidato

Alberto ROVERE

Correlatore

Dott.ssa Francesca CARRÀ

Anno Accademico 2025/2026

Sessione autunnale

*Ai miei genitori, per gli enormi sacrifici fatti e per aver sempre creduto in me, anche
quando il traguardo sembrava lontano,
A Martina, che ha camminato accanto a me fino a questo traguardo.*

Sommario

ABBREVIAZIONI	VII
1 INTRODUZIONE	1
1.1 Sottoprodotti della “filiera del verde”	1
1.1.1 Il concetto di economia circolare.....	2
1.1.2 Pratiche agronomiche: potatura, diradamento e gestione delle biomasse residuali.....	3
1.2 Le filiere della vite e del melo e la valorizzazione dei loro sottoprodotti	5
1.2.1 Foglie di vite.....	6
1.2.1.1 Studi sulla valorizzazione delle foglie di vite	8
1.2.1.2 Attività biologiche delle foglie di vite	9
1.2.2 Foglie di melo.....	12
1.2.2.1 Studi sulla valorizzazione delle foglie di melo	13
1.2.2.2 Attività biologiche delle foglie di melo	14
1.3 Estrazione assistita da ultrasuoni (UAE).....	16
1.3.1 Principi di cavitazione	16
1.3.2 Settaggio e ottimizzazione delle condizioni di estrazione	17
1.3.3 Configurazione del processo estrattivo.....	23
1.3.3.1 Estrazione in bagnetto.....	23
1.3.3.2 Estrazione batch con sonotrodo	24
1.3.3.3 Estrazione in sistema di circolo (flow system)	25
1.3.4 Vantaggi e limiti della tecnica.....	26
2 SCOPO DELLA TESI.....	27
3 MATERIALI E METODI.....	29
3.1 Campioni e preparazione dei campioni	29
3.2 Caratterizzazione della componente polifenolica.....	30
3.2.1 Estrazione componente polifenolica.....	30
3.2.1.1 Estrazioni assistite ad ultrasuoni condotte in batch	30
3.2.1.2 Estrazione ad ultrasuoni condotte in circolo	32
3.2.2 Polifenoli totali (saggio di Folin-Ciocalteu).....	34
3.2.3 Antociani totali	35
3.2.4 Proantocianidine totali (BL-DMAC).....	36
3.2.5 Attività antiossidante	38
3.2.5.1 Saggio DPPH	38
3.2.5.2 Saggio FRAP	39

3.2.6	Caratterizzazione della frazione degli antociani, dei principali acidi fenolici e flavonoidi mediante RP-HPLC-DAD	41
3.3	Analisi statistica	43
4	RISULTATI E DISCUSSIONI	45
4.1	Foglie di vite.....	45
4.1.1	Estrazione in batch.....	45
4.1.1.1	Polifenoli totali e attività antiossidante.....	46
4.1.1.2	Analisi cromatografica.....	53
4.1.2	Estrazione in circolo	58
4.1.2.1	Impostazione dei parametri operativi del sistema in circolo.....	58
4.1.2.2	Polifenoli totali e attività antiossidante.....	61
4.1.2.3	Analisi cromatografica.....	67
4.1.3	Confronto batch-circolo.....	70
4.2	Foglie di melo.....	72
4.2.1	Estrazione in batch.....	72
4.2.1.1	Polifenoli totali e attività antiossidante.....	73
4.2.1.2	Analisi cromatografica.....	79
4.2.2	Estrazione in circolo	82
4.2.2.1	Impostazione dei parametri operativi del sistema in circolo.....	82
4.2.2.2	Polifenoli totali e attività antiossidante.....	83
4.2.2.3	Analisi cromatografica.....	86
4.2.3	Confronto batch-circolo.....	88
5	CONCLUSIONI	93
6	BIBLIOGRAFIA	97

ABBREVIAZIONI

ARE: Antioxidant Response Element

CE: Catechin Equivalents – equivalenti di catechina

DAD: Diode Array Detector – rivelatore a serie di diodi

DMAC: 4-(dimetilammino)cinnamaldeide

DOPA: 3,4-diidrossifenilalanina

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilidrazile

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power

GAE: Gallic Acid Equivalents – equivalenti di acido gallico

GRAS: Generally Recognized As Safe

GRL: GoldRush Leaves – foglie di melo cultivar GoldRush

GWL: Galiwa Leaves – foglie di melo cultivar Galiwa

HDL: High-Density Lipoprotein

IC₅₀: concentrazione inibitoria al 50%

ICH: International Council for Harmonisation

IL-8: interleuchina-8

IPA: idrocarburi policiclici aromatici

Keap1: Kelch-like ECH-associated protein 1

LCA: Life Cycle Assessment – valutazione del ciclo di vita

LDL: Low-Density Lipoprotein

LSR: Liquid-to-Solid Ratio – rapporto liquido/solido

MAE: Microwave-Assisted Extraction – estrazione assistita da microonde

MAL: Malvidin-3-O-glucoside Equivalents – equivalenti di malvidina-3-O-glucoside

mTOR: mechanistic Target Of Rapamycin – bersaglio della rapamicina

NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, forma ridotta

NF- κ B: Nuclear Factor kappa B – fattore nucleare kappa B

NOX: NADPH ossidasi

Nrf2: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

PM: Particulate Matter – particolato

PPAR γ : recettore γ attivato dai proliferatori dei perossisomi

RNS: Reactive Nitrogen Species – specie reattive dell’azoto

ROS: Reactive Oxygen Species – specie reattive dell’ossigeno

RVL: Red Vine Leaves – foglie di vite rossa

SGLT: Sodium-Glucose Cotransporter – cotrasportatore sodio-glucosio

SGLT1: Sodium-Glucose Cotransporter 1

SGLT2: Sodium-Glucose Cotransporter 2

SLR: Solid-to-Liquid Ratio – rapporto solido/liquido

TAC: Total Anthocyanin Content – contenuto di antociani totali

TC: Total Cholesterol – colesterolo totale

TE: Trolox Equivalents – equivalenti di Trolox

TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha – fattore di necrosi tumorale alfa

TPC: Total Phenolic Content – contenuto di polifenoli totali

TPrC: Total Proanthocyanidin Content – contenuto di proantocianidine totali

TPTZ: tripiridil-triazina

UAE: Ultrasound-Assisted Extraction – estrazione assistita da ultrasuoni

UE: Unione Europea

1 INTRODUZIONE

1.1 Sottoprodotti della “filiera del verde”

La sostenibilità rappresenta una sfida fondamentale per i sistemi alimentari globali, soprattutto nel contesto delle perdite e degli sprechi alimentari. Circa un terzo del cibo prodotto a livello mondiale (1,3 miliardi di tonnellate all'anno) viene perso o sprecato, contribuendo all'8-10% delle emissioni globali di gas serra, con una quota considerevole che si verifica durante la gestione post-raccolta e la trasformazione degli alimenti (Boudalia et al., 2026; Galanakis, 2012; Panzella et al., 2020). I sottoprodotti della filiera del verde comprendono i materiali residuali derivanti dalla gestione del verde urbano, forestale e agricolo, nonché dalle attività di trasformazione delle biomasse vegetali. Sebbene tradizionalmente siano stati considerati materiali di scarto destinati prevalentemente allo smaltimento o alla produzione di energia, oggi rappresentano una risorsa strategica nell'ambito della bioeconomia circolare. La crescente attenzione verso la sostenibilità ambientale e l'uso efficiente delle risorse ha infatti favorito lo sviluppo di approcci orientati alla loro valorizzazione (Cazier et al., 2024)

I sottoprodotti vengono generati in tutte le diverse fasi della catena di approvvigionamento alimentare e comprendono un'ampia varietà di materiali, tra cui residui vegetali (bucce, polpa, semi, gusci, steli, foglie). Questi materiali possono essere considerati una fonte ampiamente disponibile e a basso costo non solo di energia per la produzione di biocarburanti, ma anche di composti a valore aggiunto, il cui recupero rappresenta quindi una preziosa opportunità (Boudalia et al., 2026).

Tra le sostanze bioattive dai sottoprodotti agroalimentari, un ruolo di primo piano è occupato dai composti fenolici, ben noti per i loro effetti benefici sulla salute umana, ad esempio nella prevenzione del cancro e delle malattie cardiovascolari. Questi effetti sono in parte attribuibili alla loro capacità di agire come potenti antiossidanti, proteggendo le cellule dalle specie reattive dell'ossigeno, generate in condizioni di stress ossidativo e responsabili dell'insorgenza di diverse malattie infiammatorie e degenerative (Panzella et al., 2020).

I composti fenolici sono ampiamente rappresentati nel regno vegetale e la loro presenza in fonti facilmente accessibili ed economiche, come gli scarti della produzione agroalimentare, ha portato negli ultimi dieci anni a un crescente interesse per il loro recupero e ulteriore sfruttamento.

In questo contesto, è evidente che, per rispettare i principi dell'*economia verde*, il recupero dei composti fenolici dai sottoprodotti agroalimentari dovrebbe essere realizzato utilizzando procedure ecocompatibili, sostenibili e possibilmente a basso costo (Galanakis, 2012; Panzella et al., 2020).

1.1.1 Il concetto di economia circolare

L'economia circolare rappresenta un modello economico fondato su strategie produttive e gestionali che superano il concetto tradizionale di “fine vita” dei prodotti, promuovendo la riduzione degli sprechi, il riutilizzo, il riciclo e il recupero dei materiali lungo l'intera filiera di produzione, distribuzione e consumo. Tale approccio è finalizzato al perseguimento di uno sviluppo sostenibile, inteso come miglioramento della qualità ambientale e promozione di una maggiore equità economica e sociale, a beneficio delle generazioni presenti e future.

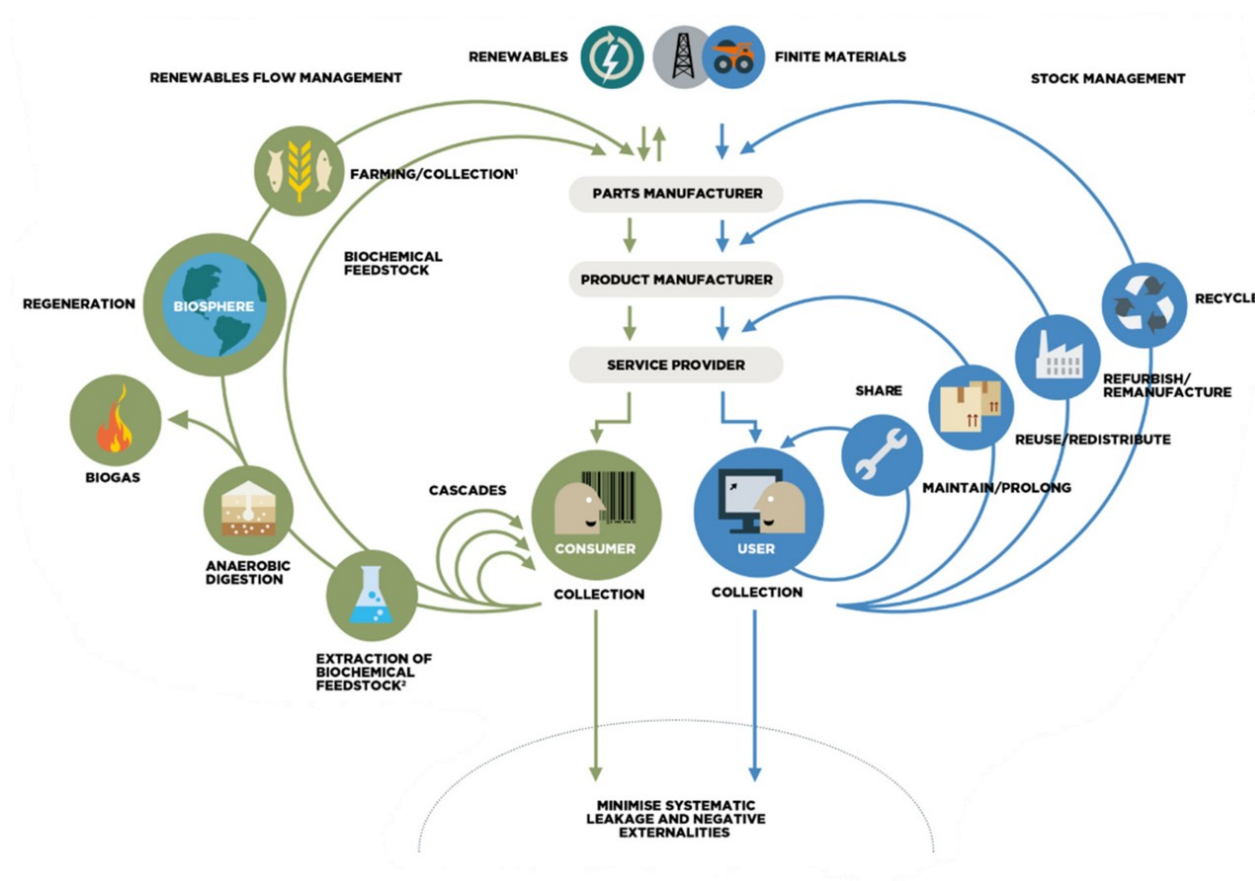


Figura 1. Schema economia circolare (Preut et al., 2021).

Negli ultimi anni, il settore agroalimentare ha prestato notevole attenzione a questioni quali la sicurezza alimentare, la tracciabilità della produzione, la qualità del prodotto e il rispetto per l'ambiente. Ciò ha portato i sistemi di produzione a orientarsi verso approcci più sostenibili. La

produzione di residui agroalimentari lungo la catena di approvvigionamento mondiale nel 2019 ha raggiunto circa 1,3 miliardi di tonnellate. Nell'attuale contesto di scarsità di risorse, cambiamenti climatici globali, degrado ambientale e crescente domanda di cibo, l'economia circolare rappresenta una strategia promettente a supporto di un'agricoltura sostenibile (Hamam et al., 2021).

Le biomasse agroalimentari svolgono un ruolo sostanziale nell'energia sostenibile. Il potenziale energetico globale della biomassa è molto elevato. Si stima che la biomassa terrestre presente a livello mondiale (ovvero la biomassa rinnovabile fuori terra che potrebbe essere raccolta e utilizzata come risorsa energetica) sia circa 100 volte superiore al consumo energetico annuo totale mondiale. (Cataldo et al., 2022)

Tuttavia molti scarti dell'industria agroalimentare, ricchi di molecole ad alto valore aggiunto, offrono un ampio spettro di possibilità di valorizzazione, considerando il loro utilizzo non solo come biomassa, ma anche come potenziale fonte di composti bioattivi.

1.1.2 Pratiche agronomiche: potatura, diradamento e gestione delle biomasse residuali

Nell'Unione Europea (UE), un totale di 11.301.345 (Aliaño-González et al., 2022) ettari di terreno sono dedicati alla coltivazione di alberi da frutto, principalmente oliveti, vigneti, ma anche meli e peri, alberi di frutta a guscio (mandorlo, noce, castagno, nocciolo e pistacchio), drupe (pesco, nettarina, albicocco, ciliegio e susino) e agrumi (arancio, clementina, mandarino, limone, pompelmo e pomelo). Processi agronomici come la potatura e il diradamento, insieme alla rimozione delle piantagioni, producono un'enorme quantità di sottoprodotti che non sono ancora appieno valorizzati. Un calcolo teorico nell'Unione Europea stima circa 2 e 25 milioni di tonnellate di scarti legnosi all'anno, derivanti rispettivamente dalla rimozione delle colture e dalla potatura (Aliaño-González et al., 2022; Florindo et al., 2022).

La potatura e il diradamento negli alberi da frutto sono fondamentali per aumentare la resa frutticola, e possono rappresentare una fonte di scarto importante da prendere in considerazione nello sviluppo di un'economia circolare e sostenibile.

La potatura è una pratica essenziale che modifica il microclima intorno agli alberi; aiuta a controllare la crescita dei rami e a ottimizzare le dimensioni dei frutti, aumentando la produttività.

Gli alberi da frutto soffrono di un calo di produttività dopo un certo numero di anni dall'impianto. Infatti, con l'invecchiamento della pianta, l'infoltirsi della chioma impedisce gradualmente la penetrazione della luce, ostacolando così l'infiorescenza e di conseguenza l'allegagione dei frutti. L'intensità luminosa deve essere infatti sufficiente per mantenere la salute degli alberi, la fotosintesi, la crescita vegetativa e riproduttiva, e ridurre la suscettibilità agli agenti patogeni. Pertanto, per mantenere un'elevata produzione di frutti di dimensioni ottimali e di buona qualità, la gestione della chioma è di primaria importanza (Al-Saif et al., 2023; Win et al., 2025).

Il diradamento precoce, è necessario per garantire frutti di alta qualità e per ottenere rese elevate. I frutti durante la fase iniziale del loro sviluppo richiedono un elevato investimento da parte della pianta, di carboidrati e risorse nutritive minerali. Pertanto il diradamento massimizza l'apporto nutrizionale ai frutti rimanenti migliorandone la qualità, elemento cruciale per la sostenibilità economica dell'industria agroalimentare. Ad esempio, la gestione del carico di frutti è un aspetto fondamentale della moderna produzione di mele. Molti alberi da frutto, tra cui il melo, producono un numero di fiori considerevolmente superiore a quello che sono in grado di sostenere fino alla maturazione dei frutti. Per una buona resa commerciale, è sufficiente che solo il 7-10% circa dei fiori iniziali produca frutti; i meli perdono naturalmente una parte dei loro fiori, ma ciò di solito non è sufficiente per ottenere una produzione desiderabile e costante con dimensioni e qualità ottimali (Sidhu et al., 2022).

Tradizionalmente, tali residui vengono smaltiti mediante combustione in campo, compostaggio o interrimento. Tuttavia, queste pratiche possono presentare criticità ambientali contribuendo ad esempio all'incremento dell'inquinamento e dell'effetto serra. (Silva et al., 2025)

Sebbene la combustione di biomassa sia considerata a impatto zero in termini di emissioni di carbonio, sussiste il rischio di un aumento delle emissioni di particolato fine (PM) e gas che influiscono sulla qualità dell'aria, sul clima e sulla salute umana. La combustione di biomassa e legna è una delle principali fonti di emissioni di PM, sia in ambito urbano (Guerreiro et al., 2011) ma anche e soprattutto nelle aree rurali, dove si osservano frequentemente casi di combustione a cielo aperto di residui agricoli e dove sono state riscontrate anche enormi quantità di inquinanti, come gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) (Atzei et al., 2019; Kim et al., 2021).

La combustione dei residui emette inoltre grandi quantità di gas serra (GHG) e altri inquinanti atmosferici, tra cui monossido di carbonio (CO), anidride carbonica (CO₂), ossidi di azoto (NO_x), ossidi di zolfo (SO_x) e idrocarburi peggiorando la qualità dell'aria. I gas serra sono

inquinanti atmosferici, che assorbono e intrappolano le radiazioni infrarosse emesse dalla superficie terrestre, contribuendo così all'effetto serra impedendo al calore di disperdersi nello spazio (Parambil-Peedika et al., 2025).

Secondo l'OMS, l'inquinamento atmosferico, rappresenta il principale fattore di rischio ambientale per la salute della popolazione a livello mondiale. È noto che la combustione significativa dei residui delle colture può avere un impatto negativo sulle comunità locali (Raza et al., 2022).

1.2 Le filiere della vite e del melo e la valorizzazione dei loro sottoprodotti

L'industria vinicola è una delle filiere agroalimentari più studiate in termini di sostenibilità ambientale, a causa del suo ruolo significativo nella produzione economica e nel commercio internazionale (Provenzano et al., 2024). Le pratiche viticole generano grandi quantità di scarti e sottoprodotti, tra cui tralci di vite, foglie, vinacce e raspi. Tra questi, i tralci di vite e le foglie rappresentano il principale prodotto di scarto generato durante la pratica agronomica della potatura (Troilo et al., 2021). Per quanto riguarda l'industria vinicola, il principale sottoprodotto è la vinaccia, ovvero il residuo solido che rimane dopo la pigiatura. Essa rappresenta quasi il 20% del peso dell'uva ed è composta da buccia e polpa, raspi e semi (Iuga and Mironeasa, 2020).

Anche nel settore della melicoltura, la produzione di derivati quali succhi di mela, sidro, confetture e prodotti dolciari comporta la generazione annuale di ingenti quantità di sottoprodotti e scarti di lavorazione. La mela rappresenta uno dei frutti maggiormente consumati a livello mondiale (Ghinea and Leahu, 2022) e l'attuale diffusione di prodotti "pronti all'uso", nonché di altri prodotti derivati, ha determinato un incremento significativo dei residui derivanti dalla trasformazione industriale, quali bucce, semi e torsoli. Tali sottoprodotti, che rappresentano circa il 16–36% del peso totale del frutto, costituiscono una rilevante criticità nella gestione dei residui solidi agroindustriali (Gaharwar et al., 2023).

L'impiego di tali sottoprodotti come fonte di ingredienti funzionali rappresenta una delle principali strategie per incrementare la sostenibilità delle filiere agroalimentari. In particolare, il recupero di composti bioattivi mediante tecnologie estrattive "green" permette di ottenere estratti standardizzati utilizzabili nella formulazione di integratori alimentari, cosmetici e

preparazioni farmaceutiche, contribuendo alla sostenibilità e alla promozione di un'economia sempre più circolare (Aliaño-González et al., 2022).

1.2.1 Foglie di vite

La vite (*Vitis vinifera* L.) è una delle colture arboree più importanti e diffuse al mondo, visto la vastità nella produzione vitivinicola, il cui prodotto principale è il vino. Oltre al valore economico legato alla produzione di vino e uva da tavola, numerosi studi hanno evidenziato il potenziale delle biomasse residuali generate dalla viticoltura. Ad esempio, le foglie di vite vengono consumate da tempo sia fresche che in conserva; le cucine turca, balcanica e mediorientale sono da tempo note per i loro piatti a base di foglie di vite fresche e ripiene (*dolma*) (Banjanin et al., 2021). Inoltre, le foglie di *Vitis vinifera* rivestono un crescente interesse non solo come sottoprodotto della filiera vitivinicola, ma anche come *botanicals* destinati all'impiego nel settore nutraceutico e fitoterapico. Grazie all'elevato contenuto di composti fenolici, quali flavonoidi (quercetina, quercetina 3-*O*-glucoside e rutina), antociani, acidi fenolici e stilbeni, le foglie di vite rossa possiedono spiccate proprietà antiossidanti, antinfiammatorie e vasoprotettive. Tali caratteristiche hanno favorito il loro utilizzo nella preparazione di tisane, estratti secchi, integratori alimentari. La tisana di vite rossa trova impiego nella medicina tradizionale per il trattamento dei sintomi associati all'insufficienza venosa cronica, quali edema, senso di pesantezza, dolore e affaticamento degli arti inferiori. Il beneficio è attribuito principalmente alla capacità dei polifenoli di stabilizzare la parete capillare, ridurre la permeabilità vascolare e migliorare il microcircolo, contribuendo così alla diminuzione della stasi venosa e dell'edema (Azhdari et al., 2020; Stücker et al., 2019). Le foglie di vite, quindi, rappresentano una matrice vegetale particolarmente ricca di metaboliti secondari biologicamente attivi. La loro composizione fitochimica include flavonoidi, acidi fenolici, stilbeni, tannini e antociani. Tra i principali composti identificati figurano quercetina, kaempferolo, rutina, catechina, epicatechina, acido gallico, acido caftarico e resveratrolo (**Figura 2**). La presenza e la concentrazione di tali molecole dipendono da numerosi fattori, tra cui cultivar, condizioni pedoclimatiche, esposizione alla luce, stadio fenologico e tecniche colturali (Goufo et al., 2020). I polifenoli presenti nelle foglie di vite svolgono un ruolo fisiologico fondamentale nella protezione della pianta nei confronti di stress biotici e abiotici. Tali molecole possiedono inoltre notevoli proprietà biologiche che ne rendono interessante il recupero per applicazioni nutraceutiche e cosmetiche (Goufo et al., 2020; Singh et al., 2023).

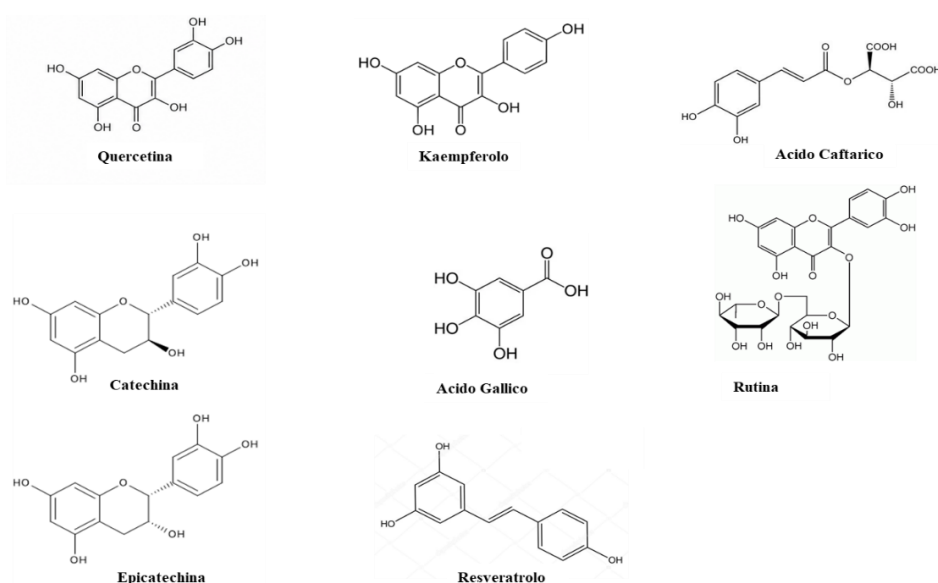


Figura 2. Struttura chimica dei principali composti fenolici nelle foglie di vite.

Nell'ultimo decennio è stata segnalata una quantità significativa di composti fenolici negli organi vegetativi della vite. Nelle radici, nel legno, nei tralci, nei fusti e nelle foglie sono stati identificati almeno 183 composti fenolici, tra cui 78 stilbeni (23 monomeri, 30 dimeri, 8 trimeri, 16 tetrameri e 1 esamero), 15 acidi idrossicinnamici, 9 acidi idrossibenzoici, 17 flavan-3-oli (di cui 9 proantocianidine), 14 antocianine, 8 flavanoni, 35 flavonoli, 2 flavoni e 5 cumarine. La distribuzione di queste sostanze chimiche lungo la pianta di vite presenta una grande variabilità (Goufo et al., 2020).

Nelle foglie della vite, in particolare, le concentrazioni più alte sono state registrate per la quercetina-3-*O*-glucuronide (10.305 mg/kg in media), seguito da quercetina-3-*O*-galattoside (7437 mg/kg), quercetina-3-*O*-glucoside (7256 mg/kg), acido caftarico (4152 mg/kg), quercetina-3-*O*-ramnoside (2709 mg/kg), kaempferolo-3-*O*-glucoside (1730 mg/kg), kaempferolo-3-*O*-glucuronide (662 mg/kg), acido cutarico (636 mg/kg), miricetina-3-*O*-glucoside (291 mg/kg), quercetina-3-*O*-rutinoside (258 mg/kg) e kaempferolo-3-*O*-rutinoside (200 mg/kg). Tra i composti con livelli compresi tra 10 e 100 mg/kg ci sono alcuni flavan-3-oli (gallo catechina gallato, gallo catechina, epigallo catechina, epigallo catechina gallato, catechina) e due acidi fenolici (acido caftarico, e acido *p*-idrossibenzoico). Nelle foglie di *V. vinifera* sono stati segnalati 40 stilbeni, tutti in quantità meno abbondanti rispetto agli acidi fenolici e ai flavonoidi. Gli stilbeni predominanti nelle foglie, con livelli superiori a 50 mg/kg sono il *trans*-resveratrolo (138 mg/kg), l'isomero simile al vaticanol C (97 mg/kg), il *cis*-piceide (78 mg/kg),

il *trans*-piceatannolo (78 mg/kg), l'ampelopsina H (76 mg/kg), l' α -viniferina (72 mg/kg) e il *cis*-miyabenolo C (50 mg/kg) (Goufo et al., 2020).

1.2.1.1 Studi sulla valorizzazione delle foglie di vite

Le foglie di *Vitis vinifera* costituiscono un sottoprodotto agricolo ad alto potenziale di valorizzazione, soprattutto riguardante la loro componente polifenolica. L'obiettivo è sviluppare fitoestratti da questa matrice vegetale, destinati all'impiego nei settori nutraceutico e farmaceutico. I fitoestratti possono essere formulati in diverse preparazioni a carattere salutistico contenenti una fase liquida, come idrogel, emulsioni per uso topico e forme farmaceutiche orali liquide, tra cui elisir e sciroppi. Inoltre, possono essere convertiti in estratti secchi mediante differenti tecnologie, quali evaporazione, liofilizzazione o spray-drying, con lo scopo di migliorarne la stabilità fisica, chimica e microbiologica. In ogni caso, il processo di trasformazione deve essere progettato per ottenere un prodotto finale conforme ai requisiti del mercato, garantendo al contempo efficacia, sicurezza e qualità (Esposito et al., 2021; Florindo et al., 2022; Perra et al., 2022).

Per recuperare i composti fenolici dalla matrice vegetale, l'estrazione è un processo essenziale: macerazione, percolazione, digestione, decozione, estrazione esaustiva seriale, infusione ed estrazione Soxhlet sono le tecniche convenzionali utilizzate per l'estrazione dei composti fenolici. La maggior parte di questi metodi si basa sulla capacità estrattiva di vari solventi, nonché sull'uso del calore o della miscelazione. Queste tecniche non sono sempre ottimali, in quanto in genere implicano l'uso di grandi quantità di solventi (Singh et al., 2023). Sebbene sia indubbio che vi sia una chiara necessità di sviluppare metodi di estrazione economici, sicuri, efficienti e innovativi dal punto di vista ambientale, rimane comunque importante garantire buone rese di estrazione, con un impatto minimo sulla qualità del prodotto finito (Tiwari, 2015). Su questi principi si basano le moderne tecniche di estrazione *green* come l'estrazione assistita da microonde (MAE, *Microwave-Assisted Extraction*) e l'estrazione assistita da ultrasuoni (UAE *Ultrasound-Assisted Extraction*).

Ad esempio, la MAE è stata utilizzata per estrarre alcuni componenti bioattivi nelle foglie di vite, tra cui acidi gallico e caftarico, fitosteroli, quercetina-3-glucuronide, quercetina-3-glucoside e kaempferolo-3-rutinoside (Djemaa-Landri et al., 2020). In questo studio è stato confermato che la MAE riduce i tempi di estrazione e utilizza una quantità minore di solvente,

ma soprattutto aumenta la resa della quercetina in confronto alla tecnica di estrazione tradizionale in Soxhlet. La quercetina è associata alla melanogenesi e offre anche altri effetti farmacologici come attività antinfiammatorie, antiaterosclerotiche, antiossidanti, antitumorali e protettive per la pelle (Singh et al., 2023). Un altro esempio è l'utilizzo dell'estrazione assistita da ultrasuoni (UAE) per migliorare la resa polifenolica e aumentare il potere antiossidante di un estratto. Rispetto all'applicazione alle foglie di vite, l'UAE con miscele acqua/etanolo ha consentito di aumentare la resa di estrazione del resveratrolo e altri polifenoli rispetto all'estrazione tramite Soxhlet. Sono stati studiati diverse variabili tra cui la concentrazione di etanolo, la temperatura di estrazione, il rapporto solido/liquido e il tempo di estrazione, nonché la cinetica di estrazione (Carrera et al., 2012; Sun et al., 2018).

1.2.1.2 Attività biologiche delle foglie di vite

Gli estratti ottenuti dalle foglie di vite possiedono numerose attività biologiche attribuite principalmente, come descritto in precedenza, alla presenza di polifenoli.

L'attività antiossidante rappresenta una delle proprietà maggiormente investigate. I composti fenolici sono infatti in grado di neutralizzare le specie reattive dell'ossigeno (ROS), contribuendo alla prevenzione dello stress ossidativo e dei danni cellulari.

Studi *in vitro* hanno evidenziato come alcuni derivati dell'acido idrossicinnamico (acido caffeico e clorogenico) e flavonoidi come la quercetina e i suoi derivati, si sono dimostrati più efficaci di vitamina C ed E, e dei carotenoidi, nell'esercitare il loro effetto di protezione dagli effetti negativi dei ROS (Acero et al., 2025). Uno dei componenti bioattivi dell'estratto di vite, la quercetina, è responsabile dell'aumento intracellulare dei livelli di antiossidanti enzimatici (glutazione perossidasi o GSH-Px) e non enzimatici (glutazione ridotto o GSH), riducendo così lo stress ossidativo e migliorando il meccanismo di difesa antiossidante. La quercetina ha la capacità inoltre di neutralizzare direttamente alcuni radicali liberi, in particolare i radicali superossido, i radicali idrossilici e i radicali perossilici lipidici. Uno degli impieghi degli estratti di quercetina è in integratori per favorire le funzioni depurative del fegato, proteggendo il fegato stesso dai danni causati dallo stress ossidativo normalizzando i livelli di ossido nitrico, glutazione e glutazione perossidasi (Teskey et al., 2018).

Diversi studi hanno evidenziato anche un'attività antinfiammatoria degli estratti di foglie di vite. L'effetto antinfiammatorio è dovuto ai componenti in esse presenti, tra cui kaempferolo,

resveratrolo, acido chinico e quercetina (Muhamad Insanu et al., 2021). Il processo infiammatorio coinvolge specie reattive dell'ossigeno (ROS) e specie reattive dell'azoto (RNS) causando danni cellulari. È dimostrato che i polifenoli negli estratti di *Vitis vinifera* esercitano un'attività antinfiammatoria attraverso la modulazione della via di segnalazione mediata dal fattore nucleare kappa B (NF- κ B). Tale azione si associa a una riduzione dell'espressione di mediatori pro-infiammatori, tra cui l'interleuchina-8 (IL-8) e il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α). NF- κ B rappresenta un importante fattore di trascrizione coinvolto nella regolazione di numerosi processi fisiologici, quali la risposta infiammatoria e immunitaria, la proliferazione cellulare e l'apoptosi. Inoltre, l'attivazione anomala di NF- κ B è stata correlata a numerose patologie infiammatorie cutanee, tra cui la psoriasi, una dermatosi cronica caratterizzata da elevati livelli di espressione e attività di questo fattore di trascrizione (Ali et al., 2023). Nello studio di Singh et al. (2023), si è dimostrato che la dose più elevata di estratto di foglie di *Vitis vinifera* provoca una riduzione dei livelli di interleuchina IL-8 fino al 40% esercitando così un'importante attività antinfiammatoria.

Diverse piante tra cui la vite contengono un fitosterolo insaturo noto come stigmasterolo o stigmasterina. Lo stigmasterolo è un battericida presente nell'estratto di foglie di vite. Sia i batteri Gram-positivi che quelli Gram-negativi sono fortemente inibiti dallo stigmasterolo, il che significa che lo stigmasterolo ha un potenziale come agente antimicrobico. I componenti batterici vengono degradati dallo stigmasterolo attraverso due meccanismi: l'interazione superficiale dello stigmasterolo con i batteri e la formazione di pori nella parete cellulare batterica. Questo conferisce alle foglie di vite un ottimo spunto per sfruttare l'estrazione di stigmasterolo per proporlo come antimicrobico. (Mohan et al., 2026; Singh et al., 2023)

Inoltre, l'estratto di foglie di vite ha anche mostrato una forte attività antivirale contro due importanti patogeni umani, ovvero l'HSV-1 e il coronavirus 2 della sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV-2) (Zannella et al., 2021). L'estratto di foglie di *V. vinifera* inibisce l'attacco di entrambi i virus, ovvero HSV-1 e SARS-CoV-2, alla cellula ospite, ostacolando alcuni siti di interazione all'interno della glicoproteina virale deputata alla fusione, cioè la glicoproteina b di HSV-1 e la proteina spike di SARS-CoV-2, impedendo il processo di formazione dell'infezione e il legame dell'involucro virale con la membrana cellulare. Questo effetto rende l'estratto di foglie possibilmente utile nel trattamento profilattico per infezioni erpetiche. (Singh et al., 2023; Zannella et al., 2021)

Alcuni acidi fenolici nelle foglie di vite sono di particolare interesse come potenziali adiuvanti nel trattamento dell'obesità. L'acido vanillico, ad esempio, è in grado di attivare la via AMPK

(AMP-*activated protein kinase*). L'AMPK agisce come enzima per l'omeostasi energetica ed è coinvolta nel metabolismo energetico del fegato, dei muscoli e del tessuto adiposo. L'inibizione dell'AMPK è una delle cause più importanti dell'accumulo di grasso nel fegato (Singh et al., 2023).

Le malattie neurodegenerative come morbo di Parkinson o il morbo di Alzheimer sono caratterizzate sintomaticamente dalla compromissione delle funzioni cognitive o motorie. Gli antociani si sono dimostrati utili nel migliorare le prestazioni cognitive, esercitare effetti neuroprotettivi contro questi disturbi minimizzando il declino cognitivo, suggerendo un loro importante utilizzo nella prevenzione di malattie neurologiche. Ciononostante, i meccanismi alla base della loro azione non sono completamente noti. La plasticità sinaptica, la neurogenesi, il passaggio attraverso la barriera emato-encefalica, la modulazione delle vie di segnalazione cellulare e l'espressione di geni coinvolti nella neuroinfiammazione sono alcuni dei meccanismi proposti.(Câmara et al., 2022)

In ambito cosmetico, alcuni polifenoli come gli antociani derivanti dalle foglie di vite vengono utilizzati nella formulazione di prodotti anti-age e protettivi grazie alla loro capacità di contrastare i fenomeni ossidativi indotti dai raggi UV. Questo effetto è stato recentemente esplorato anche utilizzando standard puri di cianidina- e malvidina-3-*O*-glucoside e anche estratti di antociani di sambuco e vino rosso. Nel complesso, è stato riscontrato che la maggior parte dei composti presenta capacità di filtro UV, attenua la produzione di specie reattive dell'ossigeno nei cheratinociti e nei fibroblasti della pelle umana e ha mostrato attività inibitoria degli enzimi che degradano la pelle. Considerando questo, una formulazione che contenga antociani beneficerebbe di una doppia funzione di fotoprotezione combinata con un effetto anti-invecchiamento.(Câmara et al., 2022)

Inoltre, nel mercato cosmetico asiatico, l'estratto di foglie di vite viene utilizzato per la formulazione di prodotti per la pelle utili in caso di iperpigmentazione. Questa condizione è causata dall'enzima tirosinasi, responsabile della pigmentazione cutanea. Questo enzima catalizza la reazione di ossidazione della L-tirosina in DOPA e successivamente in dopacromo. Al termine di questo processo, viene prodotta la melanina, responsabile della pigmentazione della pelle. L'estratto di foglie di vite rossa ottenuto con acqua deionizzata in un bagno ultrasonico è in grado di inibire l'attività della tirosina con un valore di IC50 pari a 3,84 mg/mL, risultando quindi di interesse per l'uso in ambito cosmetico per ridurre gli effetti della iperpigmentazione (Lin et al., 2017; Singh et al., 2023).

Le proprietà biologiche degli estratti di foglie di vite rendono pertanto questo sottoprodotto una promettente fonte di ingredienti funzionali per differenti applicazioni in ambito farmaceutico, nutraceutico e cosmetico.

1.2.2 Foglie di melo

È ampiamente riconosciuto che le specie a pomo sono tra i frutti più popolari e ricchi di composti bioattivi, tanto che è noto che mangiare "una mela al giorno toglie il medico di turno". Mentre questi frutti sono importanti alimenti per il consumo umano e materie prime per l'industria alimentare, le foglie vengono lasciate inutilizzate come scarti agricoli; tuttavia, nell'interesse del recupero e della valorizzazione dei sottoprodotti agroalimentari, le foglie di melo rappresentano una matrice di grande interesse. Numerosi studi hanno evidenziato come le foglie di *Malus domestica* costituiscano una fonte particolarmente abbondante di polifenoli, flavonoidi e diidrocalconi, composti associati a importanti attività antiossidanti, antinfiammatorie e antidiabetiche (Gosch et al., 2010; Wojdyło et al., 2021).

Il melo accumula polifenoli in tutti i suoi organi come protezione contro i parassiti o le radiazioni UV, ma ogni parte morfologica della pianta contiene una quantità diversa di questi composti. La maggior parte di essi si trova solitamente in foglie, frutti, corteccia, fiori e semi. La ricerca condotta da (Wojdyło et al., 2021) ha dimostrato che le foglie contengono molti più composti polifenolici dei frutti. I frutti contengono maggiormente procianidine e nei frutti a buccia rossa sono contenute anche molte antocianine, mentre le foglie contengono quasi 33 volte più glicosidi di quercetina, 3,5 volte gli acidi fenolici (acido clorogenico, neoclorogenico, criptoclorogenico e p-cumarico) e oltre 218 volte i diidrocalconi floretina e florizina (6331 mg di diidrocalconi su 100 g di sostanza secca rispetto a meno di 29 mg su 100 g di sostanza secca nella mela) (Cendrowski et al., 2024)

Le foglie di melo contengono quantità significative di floretina e del suo glicoside florizina (**Figura 3**), composti polifenolici caratteristici del genere *Malus*, il cui contenuto totale varia dal 5,4% al 14% del peso secco della foglia. Il contenuto di florizina e floretina nelle foglie non è influenzato in modo significativo dalla varietà di mela, ma dal periodo di raccolta delle foglie (Ni et al., 2024). Il momento più favorevole per la raccolta è determinato dall'attività della polifenolossidasi, che aumenta alla fine di settembre e raggiunge il suo massimo dopo la prima gelata. Questo enzima scompone questi diidrocalconi e, pertanto, per ottenere una materia

prima con il più alto contenuto di florizina e floretina, le foglie dovrebbero essere raccolte da giugno ad agosto (Ni et al., 2024)(Cendrowski et al., 2024).

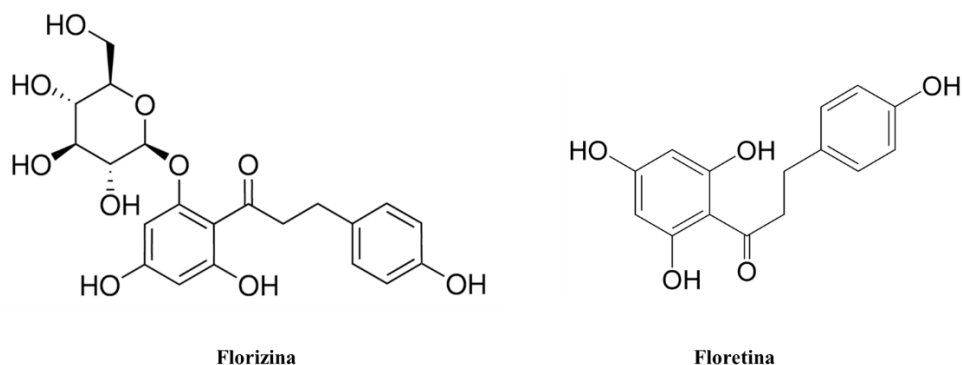


Figura 3. Struttura chimica dei principali composti fenolici nelle foglie di melo.

Le foglie di melo sono anche un'ottima fonte di amminoacidi e minerali (in particolare Ca, Mg, Fe e K), con un alto contenuto di acidi organici e un basso contenuto di zuccheri rispetto ai frutti (Wojdyło et al., 2021).

1.2.2.1 Studi sulla valorizzazione delle foglie di melo

Analogamente alle foglie di vite, l'interesse scientifico verso le foglie di melo si inserisce nel più ampio contesto della valorizzazione degli scarti agricoli e agroindustriali, cercando di migliorare la resa estrattiva di bioattivi e tecniche con sempre meno impatto ambientale (Wojdyło et al., 2021).

Diversi studi hanno sviluppato metodiche estrattive innovative finalizzate al recupero di composti fenolici, utilizzando solventi green e tecniche ecosostenibili quali estrazione assistita da ultrasuoni, microonde e fluidi supercritici; l'obiettivo principale di tali approcci è massimizzare la resa in bioattivi preservandone stabilità e attività biologica (Adamcová et al., 2022; Rashid et al., 2023). Inoltre, l'elevata concentrazione di florizina presente nelle foglie di melo ha incentivato studi orientati all'impiego industriale di questo sottoprodotto come materia prima per la produzione di ingredienti nutraceutici e cosmetici (Dhyani et al., 2025). Ad oggi, gli studi incentrati sul recupero di estratti polifenolici dalle foglie di melo sono relativamente pochi e le informazioni sui metodi e le condizioni di estrazione ottimali sono limitate, in quanto altri sottoprodotti della filiera della mela, come buccia e/o sansa, sono stati maggiormente valorizzati tramite l'estrazione con tecniche *green* (Arshad et al., 2025). Un esempio è lo studio di Ben-Othman et al. (2021), che ha avuto come obiettivo quello di valutare il potenziale delle

foglie di melo (cultivar autunnali e invernali) come fonte per il recupero di composti polifenolici, cercando di ottenere la massima resa di floretina e preservare la massima attività antiossidante degli estratti, migliorando la resa estrattiva rispetto le tecniche di estrazione convenzionali come Soxhlet e macerazione. L'estrazione è stata condotta mediante l'utilizzo di un sonotrodo, esponendo i campioni di foglie, precedentemente essiccate all'aria, a sonicazione diretta. Per l'estrazione sono stati ottimizzati alcuni parametri come l'ampiezza di sonicazione, il tempo di estrazione e il rapporto campione/solvente, confrontando gli estratti di diverse cultivar di mele in termini di attività antiossidante, contenuto fenolico totale e concentrazione dei singoli composti fenolici.

1.2.2.2 Attività biologiche delle foglie di melo

Negli ultimi anni, sono state condotte ricerche approfondite sull'attività farmacologica della florizina. L'effetto antiossidante della florizina è stato ampiamente studiato ed è considerato un aspetto importante per alleviare lo stress ossidativo. Lo stress ossidativo è una caratteristica comune di molte patologie, tra cui malattie cardiovascolari, cancro e diabete. Studi hanno dimostrato che la florizina può aumentare l'attività degli enzimi antiossidanti nell'organismo, come la superossido dismutasi (SOD), la catalasi (CAT), la glutatione perossidasi (GSH-Px), la glutatione glicopeptide perossidasi (GPx) e la glutatione reduttasi (GR). Ciò porta a una riduzione dello stress ossidativo nelle cellule della pelle con conseguente ritardo dell'invecchiamento. Attivando questi enzimi, i radicali liberi dannosi accumulati nell'organismo possono essere efficacemente rimossi, mantenendo l'equilibrio redox intracellulare e riducendo il danno cellulare causato dallo stress ossidativo. Inoltre, è stato scoperto che la florizina inibisce vari percorsi di segnalazione correlati allo stress ossidativo, tra cui NF- κ B, PPAR γ (recettore γ attivato dai proliferatori dei perossisomi) e la NADPH ossidasi (NOX). Attraverso questi meccanismi, la florizina può inibire le risposte infiammatorie e l'apoptosi, proteggendo così le cellule dai danni dello stress ossidativo. Studi di docking molecolare hanno anche rivelato che la florizina può legarsi alla proteina Keap1, che interagisce con la proteina Nrf2. L'attivazione di Nrf2 porta alla sua traslocazione nel nucleo e al legame alla regione ARE dei geni bersaglio per l'apoptosi (Ni et al., 2024; Wojdyło et al., 2021). La florizina ha inoltre evidenziato attività antidiabetica: riduce i livelli di glicemia a digiuno, diminuisce i livelli sierici di colesterolo totale, trigliceridi e colesterolo LDL e aumenta i livelli di colesterolo HDL. La florizina, inibisce selettivamente e in modo competitivo i trasportatori

sodio-glucosio SGLT1 e SGLT2, portando a un aumento dell'escrezione urinaria di glucosio e a una riduzione dei livelli di glucosio nel sangue. Sebbene la florizina sia stata impiegata nel trattamento del diabete per oltre un secolo, i suoi precisi meccanismi molecolari non sono stati completamente chiariti. (Lu et al., 2012) hanno scoperto che la florizina riduce significativamente l'aumento del peso corporeo e i livelli ematici di glucosio, colesterolo totale (TC) e trigliceridi (TG), facendo luce sulle informazioni essenziali sul meccanismo della florizina nel trattamento del diabete, in particolare nel fegato. Il suo meccanismo di azione come inibitore dei trasportatori sodio-glucosio (SGLT) ha rappresentato il modello farmacologico per lo sviluppo di farmaci antidiabetici di nuova generazione. (Ni et al., 2024; Wojdyło et al., 2021) La florizina ha dimostrato la capacità di inibire vari batteri Gram-positivi e Gram-negativi, tra cui *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhimurium*. Tuttavia, lo specifico meccanismo inibitorio della florizina contro i batteri rimane poco chiaro. Zhao et al., (2022) hanno concluso che la florizina mostra la capacità di inibire la crescita di *Listeria monocytogenes*. Si ritiene che il meccanismo inibitorio della florizina sui batteri coinvolga l'agglutinazione del DNA, la riduzione della sintesi proteica ed energetica e l'interruzione del metabolismo intracellulare.

Numerosi studi hanno dimostrato gli effetti inibitori della florizina sulla crescita di vari tipi di cellule tumorali (leucemia, adenocarcinoma vescicale, esofageo, polmonare e mammario). Nonostante l'ampia ricerca sulle proprietà antitumorali della florizina, essa è caratterizzata da scarsa solubilità nei lipidi e nell'acqua, un bersaglio d'azione poco chiaro e un'efficacia limitata. Nel tentativo di affrontare queste limitazioni Wang and Weller (2006) hanno sintetizzato una serie di derivati della florizina, che hanno mostrato una citotossicità moderata contro diverse linee cellulari tumorali, come A549 (adenocarcinoma polmonare umano), SPC-A1 (carcinoma spinocellulare), EC109 (adenocarcinoma esofageo umano), MCF-7 (adenocarcinoma mammario umano) e MDA-MB-231 (adenocarcinoma mammario umano). Questi risultati evidenziano il potenziale della florizina e dei suoi derivati come efficaci inibitori delle cellule tumorali. Inoltre, Wang et al., (2014) hanno scoperto che la florizina riduceva significativamente i tumori maligni nei topi con cancro al fegato indotto da dietilnitrosamina e CCl₄, normalizzando al contempo gli indicatori biochimici del sangue, dimostrando così la sua promettente attività antitumorale *in vivo* (Dhyani et al., 2025; Ni et al., 2024).

Si ipotizza che la florizina abbia anche un grande potenziale nella riparazione delle ferite, inibendo l'attivazione della via di segnalazione del bersaglio della rapamicina (mTOR) e migliorando l'autofagia. In questo contesto, impiegando modelli sperimentali innovativi

nell'ambito delle nanotecnologie biomedicali, è stato studiato l'utilizzo di nanofibre caricate con florizina per ottenere medicazioni avanzate per il trattamento di ferite e ustioni. La struttura nanofibrosa, unita alle proprietà antinfiammatorie e antiossidanti della florizina, promuove la riepitelizzazione, favorisce il deposito di collagene e accelera notevolmente i tempi di guarigione delle ferite (Sun et al., 2022).

1.3 Estrazione assistita da ultrasuoni (UAE)

L'applicazione degli ultrasuoni alle tecniche estrattive (UAE, *Ultrasound-Assisted Extraction*) è ampiamente studiata e, in particolare, è spesso proposta per il recupero di composti bioattivi da sottoprodotti agroalimentari. Infatti, l'estrazione assistita da ultrasuoni è una tecnica *green* sviluppata al fine di ridurre i tempi di estrazione, diminuire il consumo di solventi, aumentare la resa di estrazione e migliorare la qualità degli estratti rispetto alle tecniche di estrazione convenzionali. La tecnica di estrazione assistita da ultrasuoni è una tecnica ormai relativamente matura ed è una delle tecniche *green* con maggiori applicazioni per l'estrazione di nutraceutici da matrici vegetali solide (Hayta and İşçimen, 2018; Luque-Alcaraz et al., 2024; Wang and Weller, 2006). Di seguito sono descritti i principi fisici alla base dell'estrazione assistita da ultrasuoni, con particolare attenzione al fenomeno della cavitazione acustica, nonché i principali parametri operativi che ne influenzano l'efficienza, tra cui frequenza e potenza degli ultrasuoni, temperatura, tempo di estrazione, rapporto solido/liquido, natura del solvente e configurazione dell'apparecchiatura.

1.3.1 Principi di cavitazione

L'estrazione assistita da ultrasuoni utilizza energia ultrasonica per estrarre, in opportuni solventi, composti target da varie matrici, generalmente di origine vegetale. Il principio fisico alla base di questa tecnica è la cavitazione acustica, generata dalla propagazione di onde sonore con frequenza >20 kHz, ovvero superiore alla gamma di frequenze udibili dall'orecchio umano (da 20 Hz a 100 kHz), attraverso un mezzo liquido. Durante il passaggio delle onde ultrasoniche si alternano cicli di compressione e rarefazione del liquido, che determinano la formazione, la crescita e il successivo collasso di microbolle di gas o vapore. L'implosione di tali bolle produce localizzati aumenti di temperatura e pressioni (punti caldi), accompagnate dalla generazione di microgetti liquidi (*microjets*) e intense forze di taglio (**Figura 4**) (Chemat et al., 2017). Questi effetti meccanici inducono uno o più combinazioni di fenomeni quali frammentazione, erosione

localizzata e formazione di pori sulle pareti cellulari della matrice vegetale, inoltre provocano un aumento della permeabilità delle membrane biologiche favorendo la penetrazione del solvente all'interno dei tessuti. Di conseguenza, il trasferimento di massa tra il materiale vegetale e il solvente risulta significativamente accelerato, consentendo un rilascio più rapido ed efficiente dei composti target (Shen et al., 2023; Tiwari, 2015; Vilkhue et al., 2008; Wang and Weller, 2006).

I cosiddetti punti caldi generati durante il collasso delle bolle non causano danni termici ai composti termosensibili perché sono di brevissima durata con velocità di raffreddamento nell'ordine di 10^{10} K/s. Per questo motivo l'UAE è considerata una tecnica non termica e quindi può essere utilizzata per l'estrazione di composti termosensibili. Tuttavia, va notato che l'irradiazione ultrasonica per periodi di tempo superiori a circa 5 minuti ad alta potenza genera calore (Saleh et al., 2016).

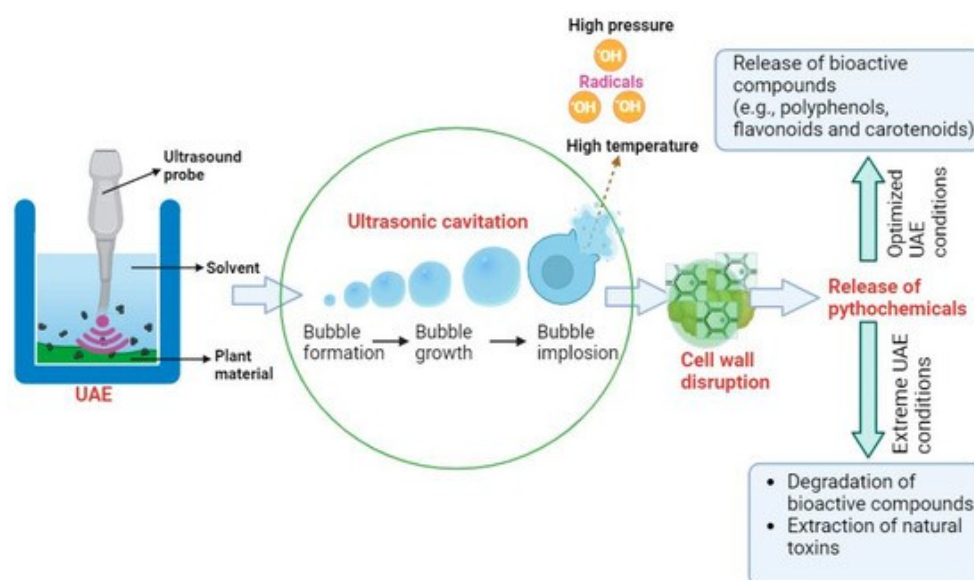


Figura 4. Meccanismo dell'estrazione assistita da ultrasuoni (UAE): formazione e collasso delle bolle di cavitazione, disgregazione della parete cellulare e rilascio dei composti bioattivi (Demesa et al., 2024).

1.3.2 Settaggio e ottimizzazione delle condizioni di estrazione

Per ottenere un'estrazione assistita da ultrasuoni efficiente ed efficace, è necessario tenere conto delle caratteristiche della matrice vegetale, come il contenuto di umidità e la dimensione delle particelle, nonché del solvente utilizzato. Inoltre, numerosi fattori influenzano l'azione degli ultrasuoni, tra cui la frequenza, la pressione, la temperatura e il tempo di sonicazione (Wang and Weller, 2006). Di seguito sono descritti alcuni parametri da prendere in considerazione e ottimizzare per un'estrazione con UAE da matrici vegetali.

Solvente di estrazione

Il tipo o la polarità del solvente utilizzato è strettamente legato alla natura dei composti da estrarre. Inoltre, a causa delle attuali preoccupazioni per l'ambiente, si preferiscono solventi ecocompatibili. Generalmente, per l'estrazione di composti polari utilizzati nelle matrici alimentari si sceglie prevalentemente un mezzo acquoso, mentre nel caso di altri composti organici si utilizzano solitamente etanolo e metanolo.

Diversi solventi, come acqua acidificata, etanolo, alcoli, acetone, acqua, ecc., sono stati utilizzati per l'estrazione di diversi composti mediante UAE.

È stato riscontrato che l'etanolo possiede la più alta affinità per i fenoli in molti sistemi studiati e quindi è la prima scelta per l'estrazione di composti fenolici da scarti di frutta e verdura. Altri motivi per cui l'etanolo è preferito ad altri solventi sono la sua economicità, la sua origine da una fonte rinnovabile (canna da zucchero) e la sua classificazione come solvente riconosciuto sicuro (GRAS, *Generally Recognized As Safe*). L'estrazione di composti bioattivi da matrici vegetali con etanolo è generalmente preferita rispetto al metanolo per diversi motivi, soprattutto quando gli estratti sono destinati ad applicazioni alimentari, nutraceutiche, cosmetiche o farmaceutiche. Questo è dovuto alla minor tossicità che rappresenta l'etanolo secondo la linea guida ICH Q3C(R9), relativa ai solventi residui nei prodotti farmaceutici; l'etanolo è infatti classificato come solvente di Classe 3, categoria comprendente solventi a basso potenziale tossico per l'uomo. Il metanolo è invece incluso nella Classe 2, che comprende solventi il cui contenuto residuo deve essere limitato a causa della loro tossicità intrinseca; per il metanolo è indicata un'esposizione giornaliera consentita, o *Permitted Daily Exposure*, pari a 30 mg/die e un limite di concentrazione di 3000 ppm secondo l'Opzione 1. Sebbene il metanolo possa mostrare, per alcune matrici e specifiche classi di composti fenolici, una maggiore capacità estrattiva, si preferisce l'etanolo per la sua minore tossicità, confinando l'utilizzo del metanolo nella ricerca analitica, ad esempio per preparare campioni destinati ad analisi mediante HPLC o LC-MS (Carreira-Casais et al., 2021). La concentrazione di etanolo rappresenta uno dei principali fattori in grado di influenzare l'efficienza del processo estrattivo. Nelle miscele acqua/etanolo, infatti, l'aumento della percentuale di etanolo determina generalmente un incremento della resa di estrazione dei composti polifenolici fino al raggiungimento di una concentrazione ottimale; oltre tale valore, la resa tende invece a diminuire. Questo andamento è attribuibile alla variazione delle proprietà fisico-chimiche del solvente: l'aumento della concentrazione di etanolo comporta una diminuzione della costante dielettrica della miscela, favorendo la solubilità e la diffusività dei composti fenolici. Tuttavia, a concentrazioni prossime

al 100%, l'elevata purezza dell'etanolo induce la disidratazione del tessuto vegetale e la denaturazione delle proteine, limitando il trasferimento di massa e determinando una riduzione dell'efficienza estrattiva. Sebbene questo solvente garantisca elevate rese di estrazione, negli ultimi anni la ricerca scientifica si è orientata verso strategie volte a ridurne l'impiego, in linea con i principi della chimica verde e della sostenibilità ambientale. Ad oggi, l'UAE ha consentito una significativa riduzione del volume di etanolo necessario, ma non la sua completa sostituzione. A conferma di ciò, González-Centeno et al. (2014) hanno impiegato l'acqua come unico solvente per l'estrazione di composti fenolici, flavonoidi e molecole ad attività antiossidante dalla vinaccia, osservando che l'UAE in ambiente acquoso permetteva di recuperare soltanto il 12–38% dei composti fenolici ottenuti mediante estrazione con solventi organici. Questi risultati evidenziano come la completa eliminazione dell'etanolo rappresenti ancora una sfida significativa e un importante obiettivo della ricerca nel campo delle tecnologie estrattive. La concentrazione di etanolo è uno dei fattori più importanti che influenzano la resa di estrazione; nonostante queste caratteristiche, attualmente si sta cercando di ridurne l'utilizzo (Kumar et al., 2021).

Rapporto solido / solvente

La quantità di solvente da utilizzare nel processo di estrazione può essere espressa sia come rapporto solido-liquido (SLR), ovvero il rapporto tra la quantità di campione prelevato per l'estrazione (g) e il volume del solvente (mL), sia come liquido-solido (LSR), che è il reciproco del SLR. A parità di volume di solvente, la resa dell'estrazione con ultrasuoni aumenta con l'aumentare del peso della matrice fino a raggiungere un picco massimo, per poi diminuire (Figura 5).

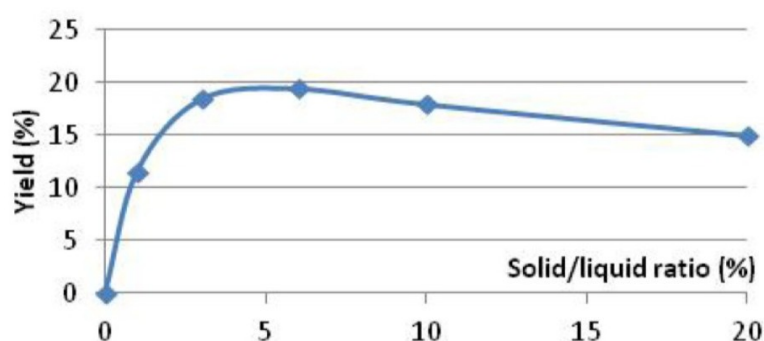


Figura 5. Andamento della resa di estrazione (%) in funzione del rapporto solido/liquido (SLR) durante l'estrazione assistita da ultrasuoni (Petigny et al., 2013).

Ad alti valori di SLR (minor volume di solvente a parità peso di matrice), la viscosità della soluzione è alta, il che rende più difficile l'effetto di cavitazione. Con la diminuzione dell'SLR, aumentando il volume di solvente, la viscosità e la concentrazione del mezzo di estrazione diminuiscono, il che porta a un maggiore effetto di cavitazione, potenziando il processo di estrazione. Inoltre a bassi valori di SLR, la propagazione delle onde ultrasoniche è più efficiente, causando una maggiore frammentazione, erosione e formazione di pori, aumentando così la resa (Petigny et al., 2013)

Potenza

La potenza erogata durante l'UAE è espressa come percentuale di ampiezza nell'intervallo da 0 a 100%, dove il 100% di ampiezza indica la potenza nominale dell'apparecchiatura. Un ulteriore parametro di rilievo è la densità di potenza (W/mL), definita come il rapporto tra la potenza dissipata e il volume del mezzo di estrazione e la densità di potenza (W/mL) (Kumar et al., 2021). La resa dell'estrazione UAE aumenta con l'aumento della potenza o della densità di potenza e poi diminuisce dopo aver raggiunto un picco, ciò può essere spiegato da un aumento della potenza che incrementa l'intensità della cavitazione, favorendo la disgregazione cellulare e il rilascio dei metaboliti. Tuttavia, potenze troppo elevate possono causare degradazione termica o ossidativa dei composti sensibili, come polifenoli e pigmenti naturali. Diversi studi mostrano che esiste un valore ottimale di potenza oltre il quale la resa tende a diminuire (Carreira-Casais et al., 2021; Duan et al., 2025; Khadhraoui et al., 2021; Kumar et al., 2021).

Frequenza

La frequenza degli ultrasuoni rappresenta il numero di cicli di compressione e rarefazione generati dall'onda ultrasonica nell'unità di tempo ed è espressa in hertz (Hz). La frequenza utilizzata nell'estrazione assistita da ultrasuoni (UAE) di composti bioattivi da sottoprodotti di frutta e verdura è compresa tra 20 e 120 kHz. Gli ultrasuoni a bassa frequenza e alta potenza generano una forte forza di taglio e meccanica desiderabile nel processo di estrazione, mentre l'alta frequenza a bassa densità di potenza produce un gran numero di radicali reattivi non auspicabili nel processo estrattivo. Esistono pochissimi studi sull'effetto della variazione di frequenza sulla resa e sulla qualità dell'estrazione, e la maggior parte degli studi si è concentrata sulla frequenza costante. Una frequenza selezionata nell'intervallo da 30 a 40 kHz è stata applicata sui sottoprodotti dell'uva per l'estrazione di antocianine. La selezione di una frequenza bassa costante potrebbe essere dovuta al concetto di formazione di un numero minore di bolle di cavitazione con diametro maggiore, favorendo un grande effetto di cavitazione che

diminuisce con l'aumento della frequenza degli ultrasuoni. Le bolle di cavitazione richiedono una certa durata minima del ciclo di compressione-rarefazione per formarsi e crescere e se questo ciclo è troppo breve, la bolla di cavitazione non verrà indotta e non crescerà. La frequenza degli ultrasuoni e la durata della fase di rarefazione sono inversamente proporzionali tra loro; quindi, ad alta frequenza la bolla di cavitazione ha un tempo molto breve per crescere, il che impedisce il suo effetto di implosione (Khadhraoui et al., 2021; Kumar et al., 2021).

Temperatura

La temperatura rappresenta un parametro operativo di fondamentale importanza nell'estrazione assistita da ultrasuoni, poiché influenza sia le proprietà del solvente sia il processo di trasferimento di massa. La temperatura del processo ultrasonico è un parametro che dipende da diversi fattori operativi, tra cui:

- Potenza degli ultrasuoni: un aumento della potenza determina una maggiore conversione dell'energia ultrasonica in calore, con conseguente incremento della temperatura del mezzo di estrazione.
- Tempo di sonicazione: esposizioni più prolungate favoriscono l'accumulo di calore nel sistema.
- Frequenza degli ultrasuoni: sebbene il suo effetto sia meno marcato rispetto alla potenza, la frequenza influenza l'efficienza della cavitazione e, indirettamente, la quantità di energia dissipata sotto forma di calore.
- Volume del solvente e rapporto solido/liquido: volumi maggiori richiedono una quantità superiore di energia per aumentare la temperatura, mentre volumi ridotti si riscaldano più rapidamente.

L'aumento della temperatura inizialmente incrementa la resa dell'UAE e un ulteriore aumento della temperatura la diminuisce, in modo simile all'effetto causato dall'aumento della potenza. L'aumento della temperatura incrementa la resa dell'UAE grazie a un duplice effetto, sia sul soluto che sul solvente: da un lato, aumenta la proprietà di desorbimento e la solubilità del soluto nel solvente, mentre dall'altro diminuisce la viscosità del solvente stesso, il che porta a una maggiore diffusività del solvente nella matrice tissutale. Tuttavia, oltre a un certo limite la temperatura diminuisce la resa a causa dell'indebolimento dell'effetto di cavitazione. Questo è dovuto dall'incremento della pressione di vapore del solvente, durante l'aumento della

temperatura, che determina un aumento del riempimento delle bolle di cavitazione durante la fase di rarefazione. Ciò comporta una riduzione del gradiente di pressione tra l'interno e l'esterno delle bolle, che implodono quindi con minore intensità. Di conseguenza, l'azione meccanica esercitata sulle pareti cellulari risulta meno efficace, con una conseguente diminuzione della resa estrattiva. Quindi, anche se il numero di bolle di cavitazione è elevato ad alta temperatura, esse implodono con minore intensità causando minori danni alla cellula e diminuendo la resa (Kumar et al., 2021).

Oltre agli effetti sul processo estrattivo, le alte temperature, possono avere effetti negativi sui composti termolabili; è tuttavia possibile evitare il surriscaldamento del mezzo, controllando la temperatura attraverso sistemi di raffreddamento per consentire una migliore resa di bioattivi. Per questi motivi, l'ottimizzazione della temperatura di estrazione deve essere focalizzata sia sulla protezione della struttura e della funzione dei componenti target sia sul miglioramento delle proprietà estrattive del solvente (Carreira-Casais et al., 2021).

Tempo di estrazione

Il tempo di estrazione determina la durata dell'esposizione della matrice vegetale all'azione combinata del solvente e degli ultrasuoni. In generale, l'aumento iniziale del tempo di sonicazione migliora l'effetto di cavitazione degli ultrasuoni favorendo il rigonfiamento, l'idratazione, la frammentazione e la formazione di pori nella matrice del tessuto vegetale da cui estrarre il soluto, facilitando il rilascio nel solvente incrementando il trasferimento di massa e, di conseguenza, portando a un incremento della resa estrattiva. Tuttavia, oltre un determinato intervallo, il prolungamento del trattamento può non apportare ulteriori benefici, poiché il sistema tende a raggiungere l'equilibrio tra matrice e solvente. Inoltre, tempi di estrazione eccessivamente lunghi possono favorire la degradazione dei composti più sensibili, dovuta alla prolungata esposizione agli effetti meccanici degli ultrasuoni e all'aumento della temperatura del sistema. Pertanto, l'ottimizzazione del tempo di estrazione è essenziale per massimizzare la resa e preservare l'integrità dei composti di interesse (Carreira-Casais et al., 2021; Kumar et al., 2021).

1.3.3 Configurazione del processo estrattivo

L'estrazione con ultrasuoni può essere implementata in differenti configurazioni operative, variabili in funzione della scala di processo, del tipo di matrice e degli obiettivi estrattivi.

1.3.3.1 Estrazione in bagnetto

L'estrazione in bagnetto ultrasonico rappresenta la configurazione più semplice e diffusa su scala di laboratorio. In questo sistema, il campione viene posto in un contenitore immerso in un bagno d'acqua dotato di trasduttori ultrasonici, generalmente operanti a frequenze comprese tra 20 e 40 kHz. Gli ultrasuoni vengono trasmessi indirettamente al solvente estrattivo attraverso il mezzo acquoso circostante (Chemat et al., 2017).

Questa configurazione (**Figura 6**) presenta numerosi vantaggi, tra cui semplicità d'uso, basso costo e possibilità di trattare simultaneamente più campioni. Inoltre, il bagno ultrasonico garantisce una distribuzione relativamente uniforme dell'energia sonora e un rischio ridotto di degradazione termica localizzata. Tuttavia, l'intensità ultrasonica trasmessa al campione risulta inferiore rispetto ai sistemi a sonda, con conseguente minore efficienza estrattiva e tempi di processo generalmente più lunghi (Shen et al., 2023).

L'estrazione in bagnetto è particolarmente utilizzata per matrici sensibili al calore o per screening preliminari di laboratorio. Tuttavia, la difficoltà nel controllare accuratamente la densità energetica e la limitata scalabilità rappresentano importanti limiti applicativi in ambito industriale (Carreira-Casais et al., 2021; Chemat et al., 2017).

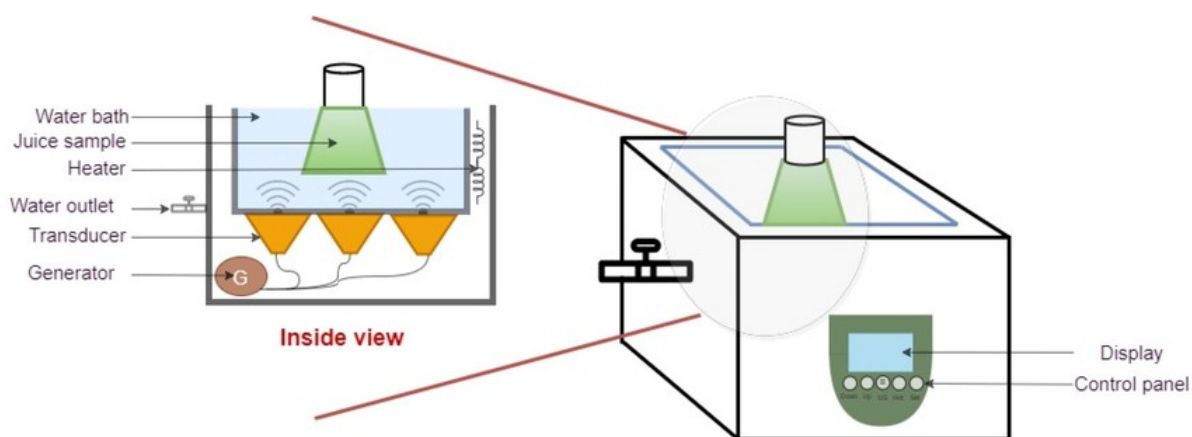


Figura 6. Schema di un bagnetto ultrasonico (Kalsi et al., 2022).

1.3.3.2 Estrazione batch con sonotrodo

Nei sistemi batch con sonotrodo, detti anche *probe systems*, l'energia ultrasonica viene trasmessa direttamente al mezzo estrattivo mediante una sonda metallica immersa nel campione (**Figura 7**). Questa configurazione consente di ottenere elevata intensità di cavitazione e maggiore efficienza nel trasferimento di massa, favorendo la rottura delle pareti cellulari e il rilascio dei composti bioattivi (Chemat et al., 2017; Shen et al., 2023).

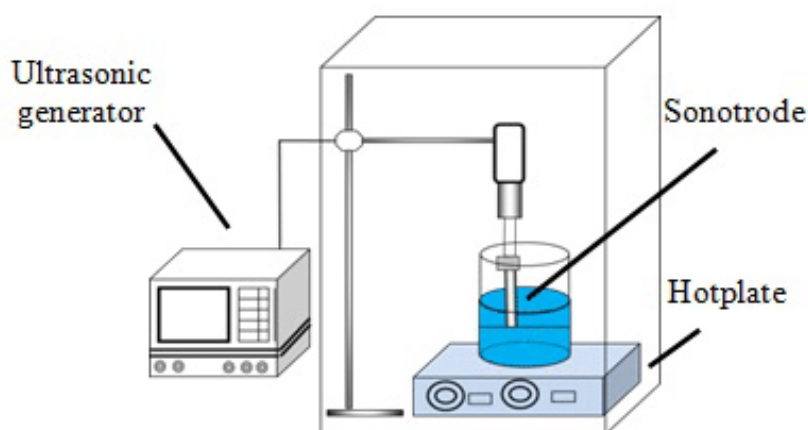


Figura 7. Schema di estrazione in batch con sonotrodo (Sulaiman Phd, 2016).

Rispetto al bagnetto ultrasonico, il sonotrodo permette tempi di estrazione più brevi e rese estrattive superiori, grazie alla trasmissione diretta dell'energia. I sistemi *batch* con sonda vengono frequentemente impiegati nell'estrazione di polifenoli, alcaloidi, flavonoidi e metaboliti secondari da matrici vegetali (Carreira-Casais et al., 2021; Shen et al., 2023).

Tuttavia, l'elevata intensità locale può causare fenomeni di surriscaldamento e degradazione di composti termolabili, rendendo utile un accurato controllo della temperatura mediante sistemi di raffreddamento. Inoltre, l'erosione della punta metallica del sonotrodo può determinare contaminazioni metalliche del campione, soprattutto durante processi di estrazione prolungati (Chemat et al., 2017; Panda and Manickam, 2019). Dal punto di vista industriale, i sistemi batch con sonotrodo risultano più facilmente scalabili rispetto ai bagni ultrasonici, ma possono presentare criticità legate alla non omogenea distribuzione dell'energia ultrasonica nei grandi volumi (Cauduro V.H. et al., 2025).

1.3.3.3 Estrazione in sistema di circolo (*flow system*)

I sistemi a circolo o *flow systems* rappresentano l'approccio più avanzato per l'applicazione industriale della UAE. In questa configurazione, il solvente e la matrice scorrono continuamente attraverso una cella ultrasonica, consentendo un trattamento costante e controllato del materiale (**Figura 8**).

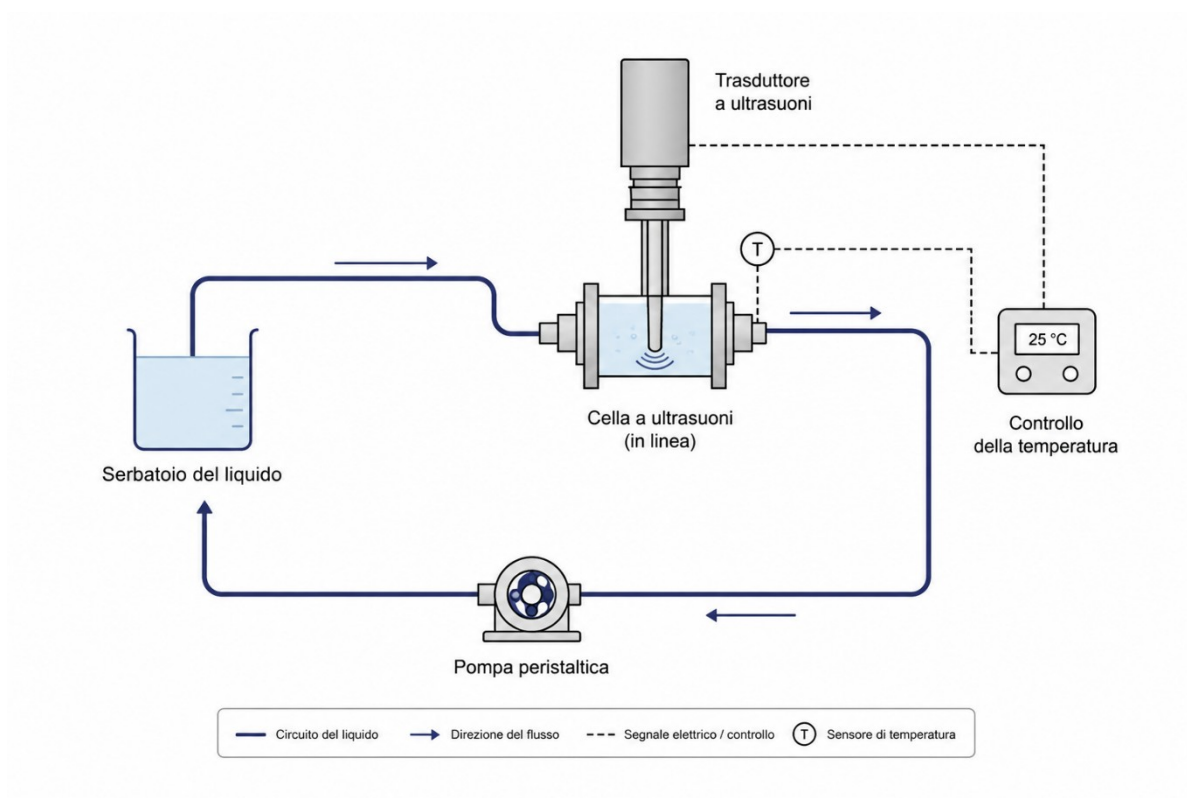


Figura 8. Schema di un sistema continuo (*flow system*) di estrazione in ultrasuoni. Figura elaborata dall'autore con il supporto di ChatGPT (OpenAI) e successivamente rifinita mediante Microsoft PowerPoint.

L'impiego di sistemi a circolo offre numerosi vantaggi, tra cui migliore omogeneità della distribuzione energetica, incremento della produttività, maggiore riproducibilità e possibilità di integrazione con altri processi industriali. Le *flow cells* consentono inoltre un più efficace controllo dei parametri operativi, come tempo di residenza, temperatura e intensità ultrasonica. Secondo le più recenti revisioni scientifiche, i reattori a flusso rappresentano oggi la configurazione maggiormente utilizzata nei processi di *scale-up* della UAE, soprattutto per l'estrazione di composti fenolici e sostanze bioattive da matrici naturali. Nonostante gli evidenti vantaggi industriali, i sistemi continui richiedono investimenti tecnologici più elevati e una maggiore complessità impiantistica. Inoltre, l'ottimizzazione dei parametri di processo risulta

fondamentale per evitare fenomeni di cavitazione non uniforme o riduzione dell'efficienza estrattiva a elevate portate di flusso (Khadhraoui et al., 2021; Shen et al., 2023).

1.3.4 Vantaggi e limiti della tecnica

Tra i principali vantaggi della UAE si annoverano la riduzione dei tempi di estrazione, il minor consumo di solventi organici, la diminuzione dell'energia richiesta e l'incremento della resa estrattiva rispetto alle metodiche convenzionali. Inoltre, la tecnica può essere condotta a temperature controllate usando bagni refrigeranti, caratteristica particolarmente importante per l'estrazione di composti termolabili. La UAE si distingue inoltre per l'elevata versatilità applicativa, potendo essere associata ad altre tecnologie innovative quali microonde, enzimi o fluidi supercritici. La possibilità di impiegare solventi *green*, come acqua o miscele idroalcoliche, contribuisce ulteriormente alla sostenibilità ambientale del processo. Nonostante i numerosi vantaggi, la tecnica presenta alcune limitazioni. L'elevata intensità ultrasonica può causare degradazione ossidativa o termica dei composti bioattivi più sensibili. Inoltre, il controllo dei parametri operativi risulta fondamentale, poiché variazioni di frequenza, potenza, temperatura e tempo di esposizione influenzano significativamente l'efficienza estrattiva. Ulteriori criticità riguardano la difficoltà di standardizzazione dei processi e la complessità dello scale-up industriale. In particolare, la distribuzione non uniforme dell'energia ultrasonica nei grandi volumi può compromettere la riproducibilità del processo (Carreira-Casais et al., 2021; Chemat et al., 2017; Khadhraoui et al., 2021; Shen et al., 2023).

2 SCOPO DELLA TESI

Le attività del presente lavoro di tesi si inseriscono nel contesto del progetto “AGRIHEALTH - AGRIfood by-product for enhanced sustainable Human hEAlth and pLanT defense”, finanziato dal programma Interreg Italia-Svizzera 2021-27, focalizzato sulla valorizzazione di sottoprodotti e matrici vegetali derivanti dalla filiera agroalimentare, con particolare attenzione al recupero di composti bioattivi mediante tecniche estrattive innovative e sostenibili.

In questo contesto, il presente lavoro di tesi ha avuto come obiettivo principale lo studio e l’ottimizzazione dell’estrazione assistita da ultrasuoni (UAE, *Ultrasound-Assisted Extraction*), valutando il trasferimento del processo da una configurazione batch a un sistema in circolo. Tale passaggio riveste particolare interesse in prospettiva di scale-up, in quanto i sistemi in circolo risultano maggiormente compatibili con processi continui o semicontinui e, pertanto, potenzialmente più adatti a una futura applicazione su scala industriale. Come matrici vegetali sono stati selezionati sottoprodotti derivanti dalle attività agricole di potatura, nello specifico foglie di vite rossa (*Vitis vinifera L.*) e foglie di melo (*Malus domestica L.*) delle cultivar Galiwa e Goldrush, con particolare attenzione al recupero della componente polifenolica.

La prima fase delle attività ha riguardato l’ottimizzazione dell’estrazione in configurazione batch, mediante la variazione dei principali parametri operativi, quali ampiezza e tempo di trattamento. Gli estratti ottenuti sono stati caratterizzati mediante analisi spettrofotometriche e cromatografiche, al fine di individuare le condizioni più favorevoli al recupero dei composti polifenolici di interesse. Successivamente, tali condizioni sono state trasferite al sistema UAE in circolo. Nel passaggio alla nuova configurazione è stata mantenuta l’ampiezza selezionata in batch, mentre il tempo di trattamento è stato valutato sia mantenendo la durata precedentemente individuata sia applicando un fattore di correzione, come suggerito in letteratura, al fine di ottenere un’esposizione cumulativa teorica agli ultrasuoni equivalente a quella della configurazione batch. Nel sistema in circolo è stato inoltre valutato l’effetto della portata.

Il confronto tra le due configurazioni è stato quindi finalizzato a stabilire in quale misura le condizioni ottimizzate in batch potessero essere trasferite al sistema in circolo mantenendo prestazioni estrattive comparabili e a verificare l’eventuale necessità di un’ulteriore ottimizzazione in funzione della matrice e della classe di composti considerata.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Campioni e preparazione dei campioni

I campioni analizzati in questo lavoro sono costituiti da foglie di vite rossa (*Vitis vinifera* L.) (RVL), foglie di melo (*Malus Domestica*) di varietà GoldRush (GRL) e Galiwa (GWL). I campioni di mela sono stati gentilmente forniti dall'Institut Agricole Régional (Aosta), mentre i campioni di foglie di vite sono prodotti presenti in commercio.

Prima delle analisi, le foglie sono state macinate con un mulino a sfere (Retsch® MM400) per 30 secondi a una frequenza di 30 Hz e la polvere ottenuta è stata conservata a temperatura ambiente fino all'utilizzo. I campioni tal quali e quelli ottenuti a seguito della macinazione sono riportati in **Figura 9**.



Figura 9. Campioni di foglie oggetto di studio: a) foglie Galiwa; b) foglie Galiwa post macinazione; c) foglie vite rossa; d) foglie di vite rossa post macinazione; e) foglie GoldRush; f) foglie GoldRush post macinazione.

3.2 Caratterizzazione della componente polifenolica

Per le analisi spettrofotometriche e cromatografiche sono stati utilizzati tutti gli estratti ottenuti dalle foglie di vite e di mela.

3.2.1 Estrazione componente polifenolica

I processi di estrazione in batch e in continuo sono stati condotti sulle foglie macinate. È stato utilizzato come solvente di estrazione etanolo al 50% (v/v) con un rapporto matrice-solvente di 1:20, scelto basandosi su dati presenti in letteratura e su precedenti analisi condotte nel laboratorio di Chimica degli Alimenti, e utilizzando per tutti i processi estrattivi il sonotrodo S24d14D (Hielscher UP400St). Per la preparazione dell'etanolo al 50% (v/v), sono stati misurati 500 mL di etanolo e portati a volume con acqua deionizzata in un matraccio da 1000 mL. Per tutti i processi estrattivi è stato misurato l'andamento della temperatura.

3.2.1.1 Estrazioni assistite ad ultrasuoni condotte in batch

Le estrazioni assistite ad ultrasuoni (ultrasound assisted extraction, UAE) sono state effettuate in batch (**Figura 10**), utilizzando come variabili l'ampiezza dell'ultrasuoni (20, 60, 100%) e il tempo di estrazione (5 e 15 min) come riportato in **Tabella 1**.

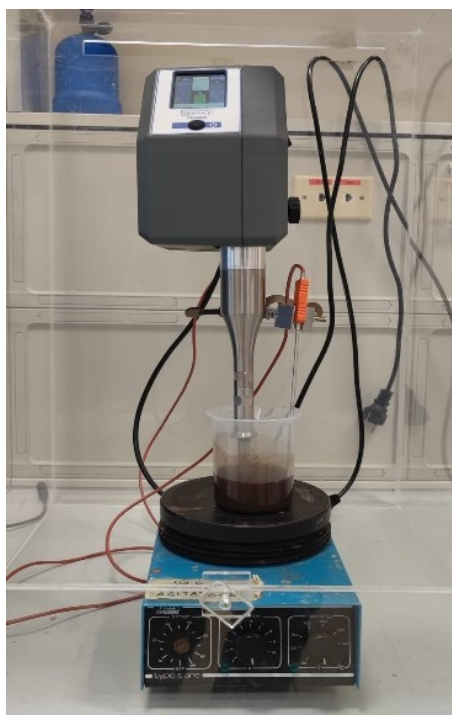


Figura 10. Configurazione del processo di estrazione in batch

Per la procedura di estrazione 5 g di foglie macinate sono state pesate mediante bilancia analitica (Precisa XB 220 A). Al campione trasferito in un becher da 250 mL, sono stati addizionati 100 ml di etanolo al 50% (v/v). Successivamente il sonotrodo è stato inserito nel becher e sono state impostate ampiezza opportuna e il tempo di estrazione (**Tabella 1**). Al termine dell'estrazione, l'estratto ottenuto è stato suddiviso in falcon da 50 mL e lasciato in bagno di ghiaccio per 10 min, al fine di favorire il raffreddamento del campione. Successivamente l'estratto è stato centrifugato (centrifuga Eppendorf 5804R) a 11000 rpm per 10 min, alla temperatura di 4°C. Il surnatante è stato recuperato e conservato in freezer a -20°C fino ad analisi.

Sigla campioni	Ampiezza (%)	Tempo (min)
RVL_20_5	20	5
RVL_20_15	20	15
RVL_60_5	60	5
RVL_60_15	60	15
RVL_100_5	100	5
RVL_100_15	100	15
GWL_20_5	20	5
GWL_20_15	20	15
GWL_60_5	60	5
GWL_60_15	60	15
GWL_100_5	100	5
GWL_100_15	100	15
GRL_20_5	20	5
GRL_20_15	20	15
GRL_60_5	60	5
GRL_60_15	60	15
GRL_100_5	100	5
GRL_100_15	100	15

Tabella 1. Parametri sperimentali utilizzati per le estrazioni assistite ad ultrasuoni in batch.

3.2.1.2 Estrazione ad ultrasuoni condotte in circolo

Le estrazioni condotte in circolo sono state eseguite applicando la combinazione di parametri che ha permesso di ottenere gli estratti migliori in batch. Per le foglie di vite sono stati utilizzati il 20% di ampiezza e 15 min di tempo di estrazione, mentre per le foglie di mela sono state applicate 100% di ampiezza e 15 min di tempo. Successivamente, basandosi sul lavoro di (Tamminen et al., 2022), è stato applicato il fattore di correzione del tempo di estrazione, che consente di stimare la tempistica di processo necessaria per ottenere un tempo di esposizione del campione agli ultrasuoni equivalente a quello dell'estrazione in batch. Infine, per valutare se il flusso potesse incidere sul processo estrattivo, sulle foglie di vite sono state eseguite due prove aggiuntive impiegando due diversi flussi, 40 e 140 mL/min. Gli esperimenti condotti con UAE in circolo sono riportati in **Tabella 2**.

Sigla campioni	Ampiezza	Tempo (min)	Flusso (mL/min)
RVL_15_40	20	15	40
RVL_15_140	20	15	140
RVL_46_40	20	46,875	40
RVL_46_140	20	46,875	140
GWL_15_140	100	15	140
GWL_46_140	100	46,875	140
GRL_15_140	100	15	140
GRL_46_140	100	46,875	140

Tabella 2. Parametri sperimentali utilizzati per le estrazioni assistite ad ultrasuoni in circolo.

Per l'estrazione in circolo è stata allestita la configurazione presente in **Figura 11**, composta da becher con ancoretta magnetica, pompa peristaltica (IKA HABITAT VERSION 0.1.6), tubi in silicone (Sint-gobain Pharmed BPT) di lunghezza 50 cm e diametro di 3.2 mm, camera di estrazione di volume 32 mL e sonotrodo.



Figura 11. Configurazione del processo di estrazione in circolo

Sono stati pesati 5 g di foglie macinate mediante bilancia analitica (Precisa XB 220 A). Il campione, trasferito in un becher da 250 mL, contenente 100 mL di etanolo al 50% (v/v), è stato mantenuto in agitazione con ancoretta magnetica per tutta la durata di estrazione. L'avvio dell'ultrasuoni è avvenuto dopo 1 minuto, tempo necessario affinché l'estratto fosse condotto dal becher alla camera di estrazione, in cui era presente il sonotrodo. Al termine del processo, l'estratto ottenuto è stato suddiviso in falcon da 50 mL, lasciato in bagno di ghiaccio per 10 min e centrifugato (10 min, 11000 rpm, 4 °C). mediante centrifuga (centrifuga Eppendorf 5804R). Il surnatante è stato recuperato e conservato a -20°C fino ad analisi.

3.2.2 Polifenoli totali (saggio di Folin-Ciocalteu)

Il contenuto totale di polifenoli (TPC) è stato determinato mediante il saggio di Folin-Ciocalteu. Questo metodo prevede l'utilizzo di un reagente ossidante costituito da una miscela di acido fosfotungstico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) e acido fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$). In ambiente basico (ottenuto con Na_2CO_3 al 5% p/v), il reagente ossidante reagisce con i gruppi riducenti dei composti polifenolici, provocandone l'ossidazione. La reazione determina un cambiamento di colore del reagente da giallo a blu-verde nei campioni contenenti polifenoli.

Preparazione dei reagenti:

Preparazione della soluzione di Na_2CO_3 al 5% (p/v): pesare circa 5 g di Na_2CO_3 con una bilancia analitica (Precisa XB 220 A) e solubilizzare con acqua deionizzata in un matraccio da 100 mL, portando a volume.

Preparazione della soluzione standard di acido gallico (1 mg/mL): pesare esattamente 1 mg di acido gallico alla bilancia analitica (Precisa XR 205SM-DR) e solubilizzare con 1 mL di etanolo ottenendo una concentrazione finale di 1 mg/mL; Questa soluzione viene utilizzata per la costruzione di una seconda retta di taratura.

Procedura:

Preparazione dei bianchi: inserire in una cuvetta da 2 mL, 50 μL di reagente di Folin-Ciocalteu, 175 μL di Na_2CO_3 al 5% (p/v) e portare al volume finale di 1450 μL con acqua deionizzata.

Preparazione della retta di taratura: inserire in cuvette da 2 mL 50 μL di reagente di Folin-Ciocalteu e rispettivamente 2,5 μL , 5 μL , 7,5 μL , 10 μL , 12,5 μL , 15 μL e 20 μL di soluzione di acido gallico (1 mg/mL). Aggiungere quindi 175 μL di soluzione di Na_2CO_3 al 5% (p/v). Infine, portare le cuvette al volume finale di 1450 μL con acqua distillata. Lasciare reagire per 60 minuti al riparo dalla luce. (**Figura 12**).

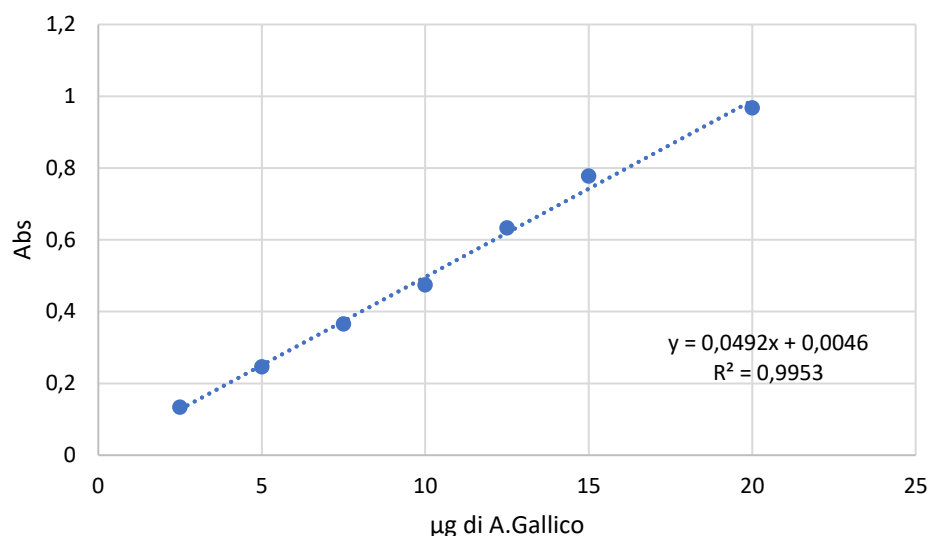


Figura 12. Retta di calibrazione con acido gallico per saggio Folin-Ciocalteu.

Preparazione dei campioni: inserire in una cuvetta da 2 mL 50 µL di reagente di Folin-Ciocalteu, il volume di campione, opportunamente diluito, e 175 µL di Na₂CO₃ al 5% (p/v); portare al volume finale di 1450 µL con acqua distillata. Lasciare reagire per 60 minuti al riparo dalla luce e leggere l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 760 nm con lo spettrofotometro (Shimadzu UV-1900).

I risultati ottenuti sono stati espressi in mg di acido gallico equivalenti per grammo di sostanza (mg GAE/g campione), mediante interpolazione con la retta di calibrazione dello standard di riferimento. L'analisi è stata effettuata in triplicato.

3.2.3 Antociani totali

Il saggio degli antociani mediante l'uso di etanolo acidificato è una tecnica analitica comune per l'estrazione e la quantificazione dei pigmenti antocianici. L'ambiente acido è fondamentale per stabilizzare le forme colorate (flavilio) degli antociani, garantendo una lettura spettrofotometrica accurata nel visibile, solitamente a 540 nm. L'analisi per la quantificazione degli antociani totali è stata effettuata sugli estratti di foglie di vite rossa, poiché gli estratti di mela non presentavano questa componente al loro interno.

Preparazione dei reagenti:

Preparazione dell'etanolo acidificato: in una beuta aggiungere rispettivamente 70 mL di etanolo assoluto (95-96%), 30 mL di acqua deionizzata e 1 mL di HCl 37%.

Procedura:

Preparazione dei bianchi: inserire in una cuvetta da 3,5 mL, 2450 μ L di etanolo acidificato.

Preparazione dei campioni: inserire in una cuvetta da 3,5 mL, 150 μ L di estratto, 2450 μ L di etanolo acidificato ed effettuare la lettura dell'assorbanza a 540 nm con lo spettrofotometro (Shimadzu UV-1900).

I risultati ottenuti sono stati espressi in mg di malvidina equivalente per grammo di sostanza (mg MAL/g campione). I campioni sono stati analizzati in triplo.

3.2.4 Proantocianidine totali (BL-DMAC)

Per la quantificazione delle proantocianidine totali è stato utilizzato il reagente 4-(dimetilammino) cinnamaldehyde (DMAC) che in ambiente acido forma un complesso colorato misurato a 640 nm.

Preparazione dei reagenti:

Preparazione del solvente (PAC): in un cilindro di vetro, aggiungere 75 mL di acetone, 24.5 mL di acqua deionizzata e 0.5 mL di acido acetico al 98% (v/v). La soluzione è stata conservata a T °C ambiente.

Preparazione dell'etanolo acidificato: in un matraccio da 100 mL, aggiungere 12.5 mL di acqua deionizzata, 75 mL di etanolo assoluto e quindi aggiungere 12.5 mL di HCl al 36% (p/p) sotto cappa. Dopo l'aggiunta di HCl, posizionare il matraccio in un contenitore con ghiaccio per raffreddare la soluzione acquosa.

Preparazione del reagente (DMAC): pesare 50 mg di DMAC in una provetta di plastica da 50 mL e aggiungere 50 mL di etanolo acidificato allo 0,01% (p/p). Agitare con un vortex (Analog Vortex Mixer VWR) e conservare la soluzione a -20 °C. Preparare la soluzione fresca ogni giorno.

Preparazione dello standard di catechina: pesare esattamente 1 mg di catechina sulla bilancia analitica (Precisa XR 205SM-DR) e aggiungere 1 mL di etanolo al 95% (p/v) per ottenere una concentrazione di 1 mg/mL.

Procedura:

Preparazione dei bianchi: inserire in una cuvetta 840 μ L di reagente DMAC e aggiungere 280 μ L di solvente PAC.

Preparazione della retta di taratura: prelevare 2,5 μ L, 5 μ L, 10 μ L, 15 μ L e 20 μ L della soluzione standard di catechina e trasferirli in cinque eppendorf; aggiungere rispettivamente 997,5 μ L, 995 μ L, 990 μ L, 985 μ L, 980 μ L di solvente PAC. In una cuvetta inserire 840 μ L di reagente DMAC e successivamente aggiungere 280 μ L di ciascuna soluzione precedentemente preparata. Lasciare riposare le cuvette al buio per 20 minuti. (**Figura 13**)



Figura 13. Cuvette della retta di calibrazione per saggio BL-DMAC.

Preparazione dei campioni: inserire in eppendorf i volumi appropriati degli estratti e portare a volume finale di 300 μ L con solvente PAC. Prelevare 280 μ L di queste soluzioni e trasferirli in cuvetta, quindi aggiungere 840 μ L di DMAC. Lasciare riposare le cuvette al buio per 20 minuti e leggere l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 640 nm con lo spettrofotometro.

I risultati ottenuti sono stati espressi in mg di catechina equivalente per grammo di campione (mg CE/g campione), mediante interpolazione con la retta di calibrazione dello standard di riferimento. L'analisi è stata effettuata in triplicato.

3.2.5 Attività antiossidante

Per la determinazione dell'attività antiossidante dei campioni sono state utilizzate le metodiche DPPH e FRAP.

3.2.5.1 Saggio DPPH

Il DPPH• (2,2 difenil-1-picrilidrazilico) è un composto soggetto al trasferimento di un atomo di idrogeno da parte di sostanze antiossidanti che, in questo modo, lo riducono. La riduzione del DPPH• è rilevabile grazie ad una decolorazione della molecola da viola a giallo proporzionale all'attività antiossidante del campione analizzato.

Preparazione dei reagenti:

Preparazione della soluzione di DPPH•: pesare, alla bilancia analitica (*Precisa XR 205SM-DR*), esattamente 2 mg di DPPH• in una provetta da 2 mL, quindi solubilizzarli in metanolo mediante trasferimento quantitativo in un matraccio da 50 mL.

Per valutare la funzionalità porre in cuvetta 700 µL di metanolo e 700 µL della soluzione di DPPH• e misurare l'assorbanza a 515 nm; l'assorbanza rilevata deve rientrare in un range di valori compreso tra 0,460-0,540. Se il valore di assorbanza è troppo elevato diluire ulteriormente la soluzione di DPPH• con metanolo al fine di ottenere il valore corretto. Conservare la soluzione in freezer al riparo dalla luce.

Procedura:

Preparazione dei bianchi: porre in una cuvetta da 1,5 mL, 1400 µL di metanolo.

Preparazione della retta di taratura: pesare esattamente 1 mg di Trolox e aggiungere 1 mL metanolo al fine di ottenere una concentrazione di 1 mg/mL. Preparare diluizioni scalari partendo dalla soluzione iniziale prelevando 1 µL, 2 µL, 4 µL, 6 µL, 8 µL, 10 µL, 12 µL e portando il volume finale a 1 mL con metanolo. Quindi aggiungere 700 µL della soluzione a concentrazione scalata nella cuvetta e 700 µL di soluzione di DPPH•. Lasciare reagire per 30 minuti al riparo dalla luce, prima di effettuare la lettura a 515 nm.

Preparazione dei campioni di controllo: inserire in una cuvetta da 1,5 mL, 700 µL di metanolo e 700 µL della soluzione di DPPH• e lasciare reagire per 30 minuti al riparo dalla luce, prima di effettuare la lettura a 515 nm con lo spettrofotometro (Shimadzu UV-1900).

Preparazione dei campioni: prelevare volumi appropriati degli estratti e diluire con metanolo in provette da 2-5 mL. Le diluizioni sono state determinate attraverso diverse prove, finalizzate a ottenere valori di assorbanza che rientrassero nella retta di calibrazione. Quindi, in cuvette da 2 mL, aggiungere 700 µL di soluzione di DPPH• e 700 µL di campione diluito, miscelando accuratamente e lasciare reagire per 30 minuti al riparo dalla luce prima di effettuare le letture di assorbanza alla lunghezza d'onda di 515 nm.

La percentuale di inibizione viene calcolata utilizzando la seguente formula:

$$\% \text{ inibizione} = (\text{Abs controllo} - \text{Abs campione}) / \text{Abs controllo} * 100$$

Utilizzando l'equazione della retta è possibile determinare i µg di Trolox necessari per esprimere i risultati ottenuti in mg di Trolox equivalenti (TE) su grammo di sostanza (mg TE/g campione).

3.2.5.2 Saggio FRAP

Il saggio FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) è un metodo colorimetrico per misurare la capacità antiossidante totale. Si basa sulla riduzione del complesso ferrico-tripiridil-triazina (Fe^{3+} -TPTZ) alla forma ferrosa (Fe^{2+} -TPTZ) a pH acido, sviluppando un colore blu proporzionale all'attività antiossidante del campione analizzato e misurabile con spettrofotometro a 593 nm.

Preparazione dei reagenti:

Preparazione della soluzione tampone di acetato 0,3 M: preparare una soluzione di acido acetico 0,6 M e una soluzione di acetato di sodio 0,6 M. Per la soluzione di acido acetico 0,6 M, pesare 34,65 mL di acido acetico e aggiungere acqua distillata fino a raggiungere un volume finale di 1 L. Per la soluzione di acetato di sodio 0,6 M, pesare 24,61 g di acetato di sodio in 500 mL di acqua distillata. Per preparare la soluzione di tampone acetato 0,3 M, in una beuta, aggiungere 463 mL di soluzione di acido acetico 0,6 M, 37 mL di soluzione di acetato di sodio e 500 mL di acqua distillata.

Preparazione della soluzione di TPTZ 10 mM: pesare 0,01562 g di TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) e scioglierlo in 5 mL di acqua distillata. Infine, aggiungere 17,6 μ L di HCl al 37% (p/p). Per la preparazione del TPTZ è necessario lavorare al buio.

Preparazione della soluzione di FeCl_3 20 mM: pesare 0,027 g di $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ e scioglierlo in 5 mL di acqua distillata.

Preparazione della soluzione FRAP (10:1:1): unire, in una beuta, 50 mL di tampone acetato 0,3 M, 5 mL di soluzione di TPTZ 10 mM e 5 mL di soluzione di $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 20 mM. Conservare la soluzione al buio.

Procedura:

Preparazione dei bianchi: aggiungere in cuvetta 1550 μ L di acqua deionizzata.

Preparazione della retta di taratura: preparare una soluzione madre in una provetta da 15 mL sciogliendo 5 mg di Trolox in 10 mL di metanolo. Eseguire una diluizione 1:2 della soluzione madre al fine di ottenere una soluzione con una concentrazione di 0.25 mg/mL. Dalla soluzione con concentrazione 0.25 mg/mL prelevare 0 μ L, 50 μ L, 100 μ L, 150 μ L, 200 μ L, 250 μ L, 300 μ L, 350 μ L e trasferirli in Eppendorf da 2 mL aggiungendo etanolo fino a raggiungere il volume finale di 500 μ L. Prelevare 50 μ L da ciascun punto della retta e trasferirli in cuvetta; ed aggiungere 1500 μ L di soluzione di FRAP. (**Figura 14**) Lasciare riposare per 6 minuti al buio e leggere le assorbanze alla lunghezza d'onda di 593 nm.

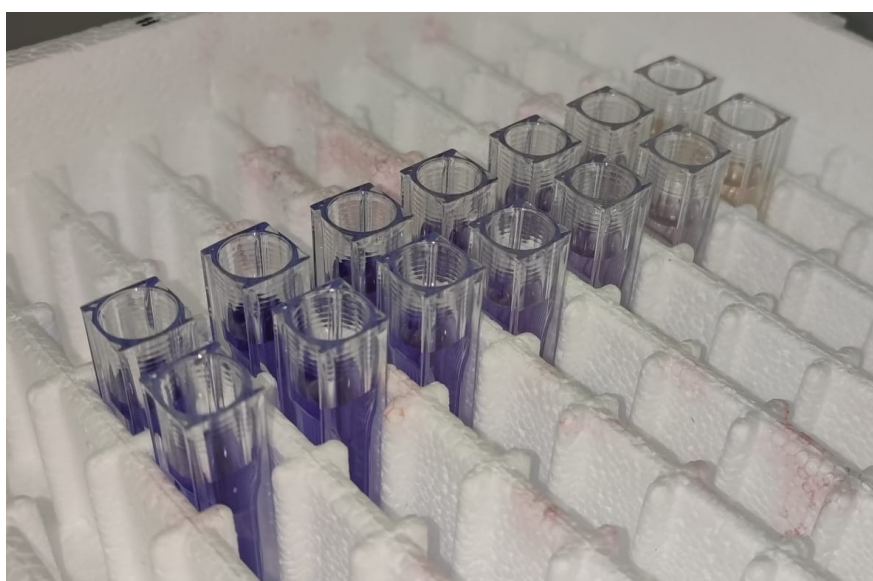


Figura 14. Retta di calibrazione per saggio FRAP.

Preparazione dei campioni: in una Eppendorf da 2 mL, diluire opportunamente l'estratto con etanolo al 50%. Aggiungere 50 µL di campioni opportunamente diluiti e 1,5 mL di soluzione FRAP in cuvette da 2 mL. Lasciare riposare per 6 minuti al buio e leggere le assorbanze alla lunghezza d'onda di 593 nm (spettrofotometro Shimadzu UV-1900).

I risultati ottenuti sono stati espressi in mg di Trolox equivalente (TE) per grammo di sostanza (mg TE/g campione).

3.2.6 Caratterizzazione della frazione degli antociani, dei principali acidi fenolici e flavonoidi mediante RP-HPLC-DAD

L'analisi cromatografica mediante RP-HPLC-DAD ha permesso di determinare il quantitativo di antocianine, acidi fenolici e flavonoidi presenti nei campioni oggetto dello studio. Tutti gli eluenti utilizzati sono di grado HPLC.

Nella **Tabella 3** sono riportate le specifiche del sistema cromatografico utilizzato.

Strumento	HPLC Shimadzu LC-20 A Prominence
Pompa	Pump System LC-20AB
Degassatore	DGU_20 A5
Campionatore automatico	Auto Injector SIL-20-A
Termostato per colonne	Column Oven CTO-20-A
Colonna	Phenomenex Synergi™ 4 µm Max-RP 80 Å, 250 x 4,6 mm I.D.
Temperatura Colonna (°C)	35
Rilevatore	DAD detector SPD-M20A
Rilevazione (nm)	280-330-520
Scansione (nm)	210-600
Eluente A	acqua/acetonitrile/acido formico al 87:3:10 (v/v/v)
Eluente B	acqua/acetonitrile/acido formico al 40:50:10 (v/v/v)
Volume campione iniettato (µL)	1 - 3
Flusso (mL/min)	0.5
Durata analisi (min)	80

Tabella 3. Specifiche del sistema cromatografico.

La programmata di eluizione in gradiente è riportata di seguito nella **Tabella 4**.

Tempo (min)	% eluente B
0	6
20	20
35	40
40	60
45	90
50	90
53	6

Tabella 4. Gradiente cromatografico applicato

Preparazione degli standard

Gli standard sono stati pesati su bilancia analitica (Precisa XB 220A) e solubilizzati singolarmente in metanolo grado HPLC, in modo da ottenere soluzioni di concentrazione 1 mg/mL, quindi sono stati opportunamente diluiti prima dell'analisi cromatografica.

In **Tabella 5** sono riportati i composti identificati con il relativo tempo di ritenzione.

Standard	Classe fenolica	t_r (min)	λ (nm)
Delfinidina-3-O-glucoside	Antocianine	16,1	520
Cianidina-3-O-glucoside		19,8	520
Petunidina-3-O-glucoside		22,9	520
Peonidina-3-O-glucoside		27,4	520
Malvidina-3-O-glucoside		29,8	520
Acido caftarico	Acidi idrossicinnamici	11,3	330
Acido clorogenico		16,2	330
Acido ferulico		33,8	330
Quercetina	Flavonoli	46,7	330
Quercitrina		38,7	330
Rutina		33,0	330
Iperoside		33,0	330
Florizina	Diidrocalconi	37,6	280
Floretina		49,3	280

Tabella 5. Composti polifenolici utilizzati come standard; t_r: tempo di ritenzione, λ: lunghezza d'onda di assorbimento.

La quantificazione dei composti analizzati è stata effettuata utilizzando la retta di calibrazione dello standard di riferimento, fatta eccezione per per la petunidina, che è stata quantificata come malvidina equivalente, e per i glicosidi della quercetina (rutina, iperoside e quercitrina), quantificati sulla retta del corrispondente aglicone. Inoltre, a seguito della metodica impiegata, la rutina e l'iperoside sono stati quantificati come somma dei due composti.

Preparazione dei campioni

Gli estratti ottenuti sono stati centrifugati per 5 minuti a 11000 rpm alla temperatura di 4 °C. Successivamente, il surnatante è stato filtrato a 0,45 µm e trasferito in vial per l'analisi cromatografica. Il volume di campione iniettato varia da 1 a 3 µL a seconda del campione.

3.3 Analisi statistica

I risultati ottenuti sono stati espressi come valore medio $\pm$ deviazione standard, basandosi su almeno tre determinazioni indipendenti.

Per valutare differenze significative tra i campioni è stata condotta un'analisi statistica impiegando l'analisi della varianza (ANOVA) e il test di Tukey. L'analisi di correlazione tra variabili è stata svolta secondo il metodo di Pearson. Sono stati considerati statisticamente significativi valori di $p < 0,05$.

L'analisi statistica è stata eseguita mediante il software R (versione 4.5.0), utilizzando il pacchetto "Agricolae" per il test di Tukey e ANOVA e il pacchetto "pgirmess" per l'analisi di correlazione di Pearson.

4 RISULTATI E DISCUSSIONI

4.1 Foglie di vite

La prima parte del lavoro di ricerca ha riguardato la caratterizzazione di estratti di da foglie di *Vitis vinifera* ottenuti con procedimenti *green*, in particolare UAE (*ultrasound assisted extraction*), con lo scopo di ottimizzare il processo estrattivo. Le foglie di vite sono state selezionate in quanto ricche di composti polifenolici, principali responsabili delle loro proprietà biologiche. L'estrazione è stata inizialmente effettuata in modalità batch e, successivamente, la condizione sperimentale ottimale è stata trasferita al sistema in circolo.

4.1.1 Estrazione in batch

L'ottimizzazione del processo di estrazione assistita da ultrasuoni in modalità batch è stata condotta prendendo come punto di partenza le condizioni sperimentali precedentemente individuate all'interno del nostro gruppo di ricerca come le più idonee per l'estrazione della frazione polifenolica dalle foglie di *Vitis vinifera*. In particolare, è stato impiegato come solvente una miscela etanolo/acqua al 50% (v/v), utilizzando un rapporto solido/liquido (SLR) pari a 1:20 (g/mL). A partire da tali condizioni, l'ottimizzazione è stata focalizzata sulla valutazione dell'influenza di due parametri operativi dell'estrazione assistita da ultrasuoni: l'ampiezza dell'onda ultrasonica, impostata a tre diversi livelli (20%, 60% e 100%), e il tempo di estrazione, valutato a 5 e 15 minuti; in **Tabella 6** sono riportate le sigle dei campioni ottenuti alle diverse condizioni di estrazione.

Sigla campione	Ampiezza (%)	Tempo di estrazione (min)
RVL_20_5	20	5
RVL_20_15	20	15
RVL_60_5	60	5
RVL_60_15	60	15
RVL_100_5	100	5
RVL_100_15	100	15

Tabella 6. Campioni di foglie di vite analizzati in batch.

4.1.1.1 Polifenoli totali e attività antiossidante

Ogni estratto ottenuto è stato caratterizzato determinando il contenuto di polifenoli, antociani e proantocianidine totali, nonché valutandone le proprietà antiossidanti mediante i metodi DPPH e FRAP (Tabella 7).

Campione	TPC (mg GAE/g)	TAC (mg MAL/g)	TPrC (mg CE/g)	DPPH (mg TE/g)	FRAP (mg TE/g)
RVL_20_5	14,8±2,3b	1,58±0,01f	3,04±0,15c	51,1±1,3b	29,5±0,1c
RVL_20_15	36,9±2,2a	3,08±0,02a	5,66±0,25ab	103±2a	54,1±2,1b
RVL_60_5	34,9±2,1a	2,66±0,02b	5,38±0,24b	102±6a	55,1±1,4ab
RVL_60_15	34,2±1,4a	2,53±0,03d	6,16±0,27a	109±3a	56,1±1,4ab
RVL_100_5	34,0±2,7a	2,58±0,02c	5,35±0,08b	107±2a	56,4±2,1a
RVL_100_15	35,7±3,4a	2,42±0,01e	5,36±0,15b	104±6a	54,6±0,7ab

Tabella 7. Caratterizzazione della componente polifenolica e attività antiossidante nei diversi estratti. I risultati sono riportati come media ± deviazione standard. All'interno di ciascuna colonna, lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i campioni ($p < 0,05$). I valori significativamente più elevati sono evidenziati in **grassetto**.

Polifenoli totali

Per la quantificazione dei polifenoli totali (TPC) è stato utilizzato il metodo di Folin-Ciocalteu (sezione 3.2.2); ogni estratto è stato analizzato almeno in triplicato. I risultati sono stati espressi come mg equivalenti di acido gallico (GAE) per grammo di foglie rosse di vite (sostanza tale quale), utilizzando la rispettiva curva di calibrazione.

L'andamento del contenuto di polifenoli totali (TPC) evidenzia come l'efficienza estrattiva sia influenzata solo parzialmente dall'ampiezza degli ultrasuoni e dal tempo di trattamento. In particolare, la condizione caratterizzata da un'ampiezza del 20% e un tempo di estrazione di 5 minuti ha mostrato il valore significativamente più basso ($14,8 \pm 2,3$), indicando che tali condizioni non forniscono un apporto energetico sufficiente a garantire un'estrazione efficace dei composti fenolici.

Prolungando il tempo di estrazione a 15 minuti, mantenendo costante l'ampiezza al 20%, il contenuto di polifenoli totali aumenta significativamente fino a $36,9 \pm 2,2$, raggiungendo valori

comparabili a tutte le altre condizioni. Alle ampiezze del 60% e del 100%, il TPC risulta sostanzialmente indipendente dal tempo di estrazione, con valori compresi tra $34,0 \pm 2,7$ e $36,9 \pm 2,2$ senza differenze statisticamente significative.

Questo comportamento suggerisce che l'aumento dell'energia ultrasonica, ottenuto incrementando l'ampiezza, favorisca un più rapido raggiungimento dell'equilibrio estrattivo grazie a fenomeni di cavitazione più intensi, consentendo di ottenere elevate rese già dopo 5 minuti di trattamento. Al contrario, a basse ampiezze (20%) è necessario prolungare il tempo di estrazione per raggiungere un'efficienza analoga. Tale interpretazione è coerente con quanto riportato in letteratura per l'estrazione assistita da ultrasuoni di composti fenolici da matrici fogliari: l'aumento dell'ampiezza può determinare fenomeni di cavitazione ed effetti meccanici più intensi, favorendo la disgregazione delle strutture cellulari, la penetrazione del solvente e il trasferimento di massa dei composti estraibili (González-Silva et al., 2022).

Ad eccezione dell'estratto ottenuto applicando un'ampiezza del 20% per 5 minuti, che ha mostrato un contenuto inferiore, i valori di TPC ottenuti nelle altre condizioni sperimentali risultano compresi nell'intervallo riportato da Mehmet Gülcü et al. (2020) per le foglie mature di diverse cultivar di *Vitis vinifera*, pari a 19,49–47,76 mg GAE/g.

L'andamento osservato è in accordo con quanto riportato da Tacchini et al. (2019) che hanno evidenziato come il tempo di estrazione rappresenti uno dei principali parametri in grado di influenzare la resa dei composti fenolici durante l'estrazione assistita da ultrasuoni di foglie di *Vitis vinifera*. Nel presente studio, infatti, il prolungamento del tempo di trattamento da 5 a 15 minuti determina un incremento significativo del contenuto di polifenoli totali esclusivamente alla più bassa ampiezza investigata (20%), mentre alle ampiezze del 60% e del 100% il tempo non esercita un effetto statisticamente significativo. L'assenza di ulteriori incrementi della resa alle ampiezze più elevate suggerisce che, nelle condizioni sperimentali adottate, il plateau estrattivo venga raggiunto già a un'ampiezza del 20%, purché venga applicato un tempo di estrazione sufficiente. L'aumento dell'ampiezza non determina quindi un incremento della resa finale dei polifenoli estratti, ma consente di accelerare il processo estrattivo, favorendo un più rapido raggiungimento dell'equilibrio grazie a fenomeni di cavitazione più intensi e a un miglioramento del trasferimento di massa, come descritto in letteratura (Medina-Torres et al., 2017).

Antociani totali

Il contenuto di antociani totali (TAC) è stato determinato tramite saggio spettrofotometrico, come descritto in sezione 3.2.3. Ogni estratto è stato analizzato almeno in triplicato. I risultati ottenuti sono stati espressi in mg di antociani totali (equivalenti di malvidina 3-O-glucoside, MAL) per grammo di foglie di vite rossa (sostanza tal quale) ed espressi come media e relativa deviazione standard.

Il valore più elevato di antociani è stato ottenuto impiegando un'ampiezza del 20% per 15 minuti di estrazione ($3,08 \pm 0,02$), mentre la condizione del 20% per 5 minuti ha mostrato il contenuto più basso ($1,58 \pm 0,01$). Ciò indica che, a bassa ampiezza, il prolungamento del tempo di estrazione favorisce significativamente il recupero degli antociani. Al contrario, all'aumentare dell'ampiezza ultrasonica al 60% e al 100%, i valori ottenuti risultano inferiori rispetto alla condizione ottimale del 20% per 15 minuti e mostrano una lieve tendenza alla diminuzione con l'incremento del tempo di estrazione. Sebbene le differenze siano contenute, sono risultate statisticamente significative; tale comportamento suggerisce che l'impiego di condizioni di estrazione più energetiche non solo non determini un ulteriore incremento della resa estrattiva degli antociani, ma anzi, tende a diminuirla. Diversamente da quanto osservato per i polifenoli totali, il contenuto di antociani è risultato influenzato negativamente dall'aumento dell'ampiezza ultrasonica. Il valore massimo è stato ottenuto impiegando un'ampiezza del 20% per 15 minuti, mentre condizioni di estrazione più energetiche (60 e 100%) hanno determinato una lieve riduzione della resa estrattiva. Tale andamento è coerente con quanto riportato da (Ghafoor et al., 2011), i quali hanno evidenziato come il recupero degli antociani mediante estrazione assistita da ultrasuoni dipenda fortemente dall'intensità del trattamento e come condizioni eccessivamente severe non comportino un incremento della resa estrattiva. Inoltre, studi di revisione sull'estrazione assistita da ultrasuoni attribuiscono tale comportamento alla particolare sensibilità degli antociani, che possono andare incontro a fenomeni di degradazione dovuti all'elevata intensità della cavitazione, all'aumento locale della temperatura e alla formazione di specie radicaliche durante il processo ultrasonico (Shen et al., 2023). La temperatura che si sviluppa durante il processo sembra essere un altro fattore determinante nel determinare la resa di estrazione degli antociani, in quanto questi sono particolarmente sensibili al calore. Come riportato in **Figura 15**, la condizione caratterizzata da un'ampiezza del 20% e un tempo di estrazione di 15 minuti ha consentito di ottenere la maggiore resa in antociani. In

questa condizione la temperatura massima raggiunta è risultata pari a 56 °C, mentre i campioni trattati alle ampiezze del 60% e del 100% hanno raggiunto temperature prossime agli 80 °C. Inoltre, nel trattamento al 20% l'incremento della temperatura è risultato più lento, determinando un'esposizione più limitata a temperature elevate rispetto alle condizioni caratterizzate da ampiezze maggiori. Nel complesso, questi risultati suggeriscono che il contenimento della temperatura durante il trattamento possa contribuire a preservare la stabilità degli antociani e a limitarne la degradazione. L'andamento osservato evidenzia pertanto una possibile relazione tra l'aumento dell'ampiezza degli ultrasuoni, il maggiore riscaldamento del sistema e la riduzione della resa estrattiva degli antociani, in accordo con la nota sensibilità termica di questa classe di composti.

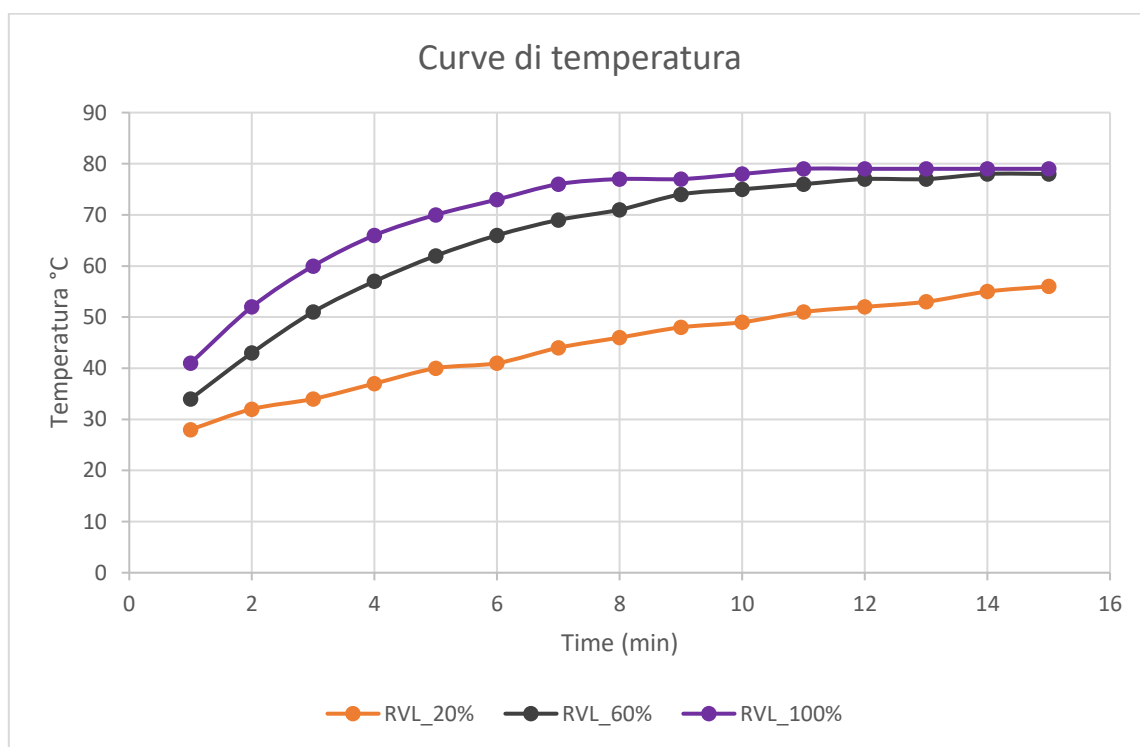


Figura 15. Andamento della temperatura raggiunta dai campioni di foglie di vite rossa in funzione del tempo di estrazione alle diverse ampiezze ultrasoniche: 20% (RVL_20_15), 60% (RVL_60_15) e 100% (RVL_100_15).

Pertanto, i risultati ottenuti indicano che l'applicazione di un'ampiezza piuttosto bassa (20%), associata a un tempo di estrazione più prolungato (15 minuti), rappresenta la condizione più favorevole per il recupero degli antociani.

Proantocianidine totali

Il contenuto di proantocianidine totali (TPrC) è stato determinato mediante il saggio BL-DMAC (sezione 3.2.4), ed i risultati ottenuti sono stati espressi in mg di catechina equivalenti (CE) su grammo di foglie tal quali, espressi come media e relativa deviazione standard, mediante interpolazione con la retta di calibrazione dello standard di riferimento. L'analisi è stata effettuata in triplicato.

Come si evince dai risultati ottenuti, la condizione di estrazione al 20% di ampiezza per 5 minuti ha mostrato il valore significativamente più basso ($3,04 \pm 0,15$) analogamente alle analisi di TPC e TAC, indicando che tali condizioni non sono sufficienti a garantire un'efficiente estrazione di questa classe di composti. Il prolungamento del tempo di trattamento a 15 minuti ha determinato un marcato incremento del contenuto di proantocianidine ($5,66 \pm 0,25$), evidenziando come, a bassa ampiezza, il tempo rappresenti un parametro determinante per migliorare l'efficienza estrattiva. Incrementando l'ampiezza al 60%, il contenuto di proantocianidine è risultato elevato già dopo 5 minuti, raggiungendo il valore massimo alla condizione del 60% per 15 minuti ($6,16 \pm 0,27$). Un ulteriore aumento dell'ampiezza al 100% non ha invece comportato un incremento significativo della resa estrattiva, con valori sostanzialmente sovrapponibili a quelli ottenuti al 60% o addirittura inferiori. Tale andamento suggerisce che l'incremento dell'intensità della cavitazione favorisca il rilascio delle proantocianidine fino al raggiungimento di una soglia oltre la quale ulteriori aumenti dell'energia ultrasonica non determinano benefici apprezzabili. Il tempo ha un effetto determinante sulla estrazione, soprattutto alle ampiezze del 20 e 60% dove si evince un aumento di resa di proantocianidine dai 5 minuti ai 15 minuti, mentre nel campione al 100% di ampiezza non vi è stato un miglioramento della resa estrattiva tra i due tempi di estrazione, probabilmente dovuto al raggiungimento del plateau estrattivo già ai 5 minuti per il decisivo aumento di energia di sonicazione.

L'andamento osservato risulta coerente con quanto riportato in letteratura sull'estrazione assistita da ultrasuoni dei composti fenolici, secondo cui l'incremento dell'ampiezza determina un aumento dell'intensità della cavitazione e del trasferimento di massa fino al raggiungimento di una condizione di equilibrio estrattivo, oltre la quale ulteriori incrementi dell'energia ultrasonica non producono aumenti significativi della resa. Tale comportamento è stato descritto

da (Medina-Torres et al., 2017). per diverse matrici vegetali ed è attribuito al progressivo esaurimento dei composti estraibili dalla matrice.

Attività antiossidante

L'attività antiossidante dei campioni è stata valutata mediante due analisi spettrofotometriche descritte nella Sezione 3.2.5: il saggio DPPH e il saggio FRAP. I risultati di entrambe le analisi sono stati espressi come mg di Trolox equivalenti (TE) per grammo di sostanza tal quale ed espressi come media e relativa deviazione standard. Entrambi i saggi hanno evidenziato un andamento sostanzialmente sovrapponibile, indicando una risposta coerente delle diverse condizioni estrattive.

Per quanto riguarda il saggio DPPH, la condizione di estrazione al 20% di ampiezza per 5 minuti ha mostrato il valore significativamente più basso ($51,1 \pm 1,3$), confermando come tale trattamento non sia sufficiente a garantire un'efficiente estrazione dei composti antiossidanti presenti nella matrice vegetale. Il prolungamento del tempo di estrazione a 15 minuti ha determinato un marcato incremento dell'attività antiossidante, raggiungendo valori comparabili a quelli ottenuti alle ampiezze del 60% e del 100%. In particolare, per queste ultime condizioni i valori ottenuti risultano sostanzialmente costanti, suggerendo che l'aumento dell'energia ultrasonica consenta di raggiungere rapidamente la massima efficienza estrattiva, rendendo trascurabile l'effetto del tempo di trattamento.

Un andamento analogo è stato osservato mediante il saggio FRAP. Anche in questo caso, la condizione al 20% per 5 minuti ha fornito il valore più basso ($29,5 \pm 0,1$), mentre tutte le altre condizioni sperimentali hanno mostrato valori significativamente superiori e tra loro confrontabili (54,1–56,4). L'assenza di differenze apprezzabili tra le condizioni caratterizzate da maggiore ampiezza o tempi di estrazione più lunghi suggerisce che, una volta raggiunto un adeguato livello di estrazione dei composti bioattivi, ulteriori incrementi dell'energia fornita al sistema non comportino un aumento significativo del potere riducente degli estratti.

L'andamento osservato nei saggi DPPH e FRAP, come si evince dalla **Figura 16** rispecchia quello ottenuto per il contenuto di polifenoli totali, evidenziando una correlazione tra la concentrazione dei composti fenolici estratti e l'attività antiossidante delle foglie di vite rossa.

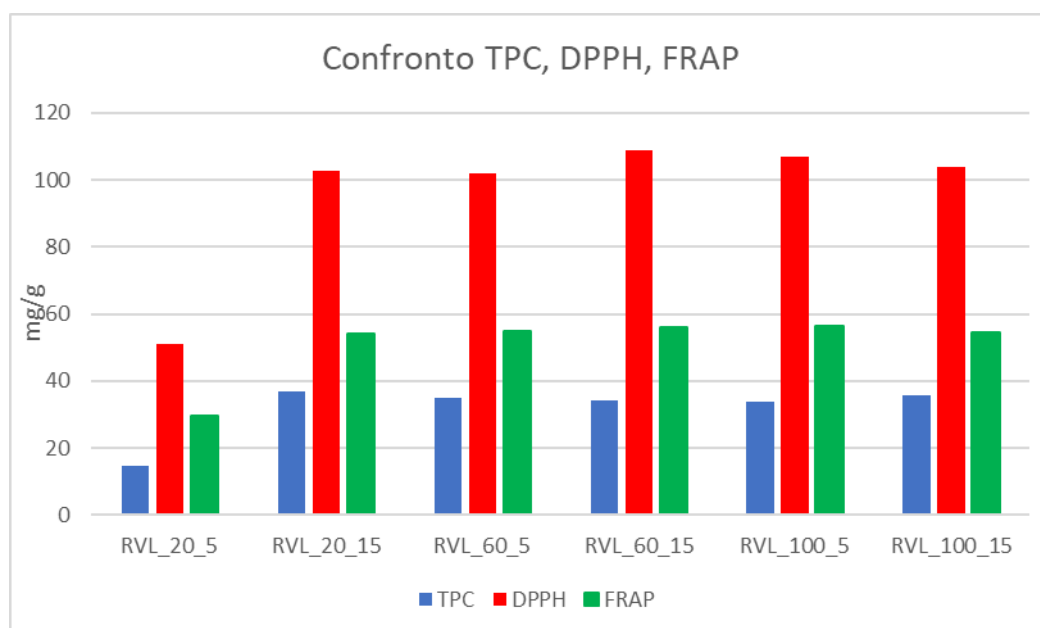


Figura 16. Andamento TPC, DPPH E FRAP degli estratti di foglie di *Vitis vinifera*.

I composti fenolici rappresentano infatti i principali responsabili della capacità antiossidante della matrice, grazie alla presenza di gruppi ossidrilici in grado di donare elettroni o atomi di idrogeno, neutralizzando le specie radicaliche e riducendo gli agenti ossidanti. L'analisi di correlazione di Pearson (**Figura 17**) ha confermato l'associazione tra il contenuto di polifenoli totali e l'attività antiossidante degli estratti ottenuti. In particolare, il TPC ha mostrato una forte correlazione positiva sia con il saggio DPPH ($r = 0,98$; $p = 0,001$) sia con il saggio FRAP ($r = 0,98$; $p = 0,001$). Tali risultati indicano che, nelle condizioni sperimentali investigate, all'aumentare del contenuto fenolico complessivo degli estratti corrisponde un incremento sia della capacità antiradicalica sia del potere riducente. La stretta associazione osservata supporta quindi il rilevante contributo della frazione polifenolica alle proprietà antiossidanti degli estratti di foglie di *Vitis vinifera*. (Labanca et al., 2020; Moldovan et al., 2020; Tacchini et al., 2019).

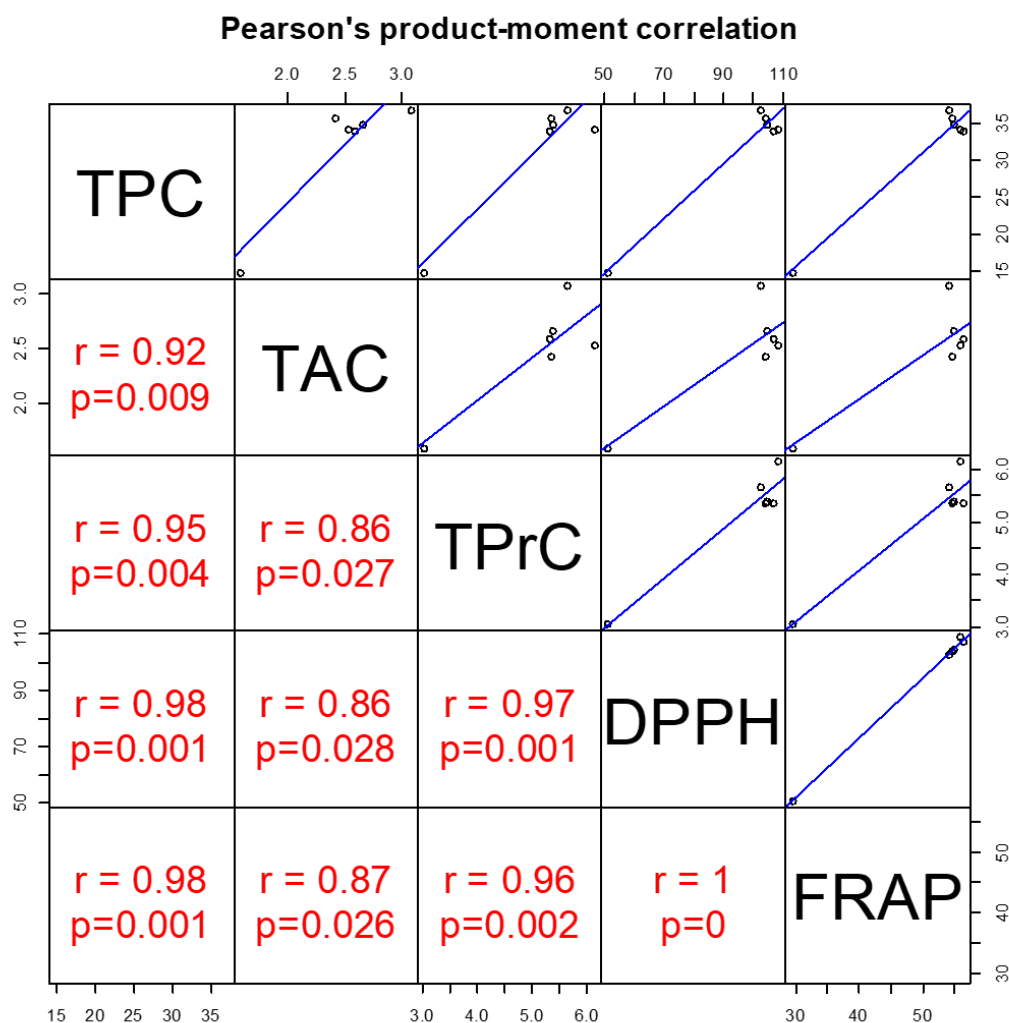


Figura 17. Matrice di correlazione di Pearson tra il contenuto di polifenoli totali (TPC), antociani, proantocianidine (TPrC) e attività antiossidante determinata mediante i saggi DPPH e FRAP negli estratti batch di foglie di *Vitis vinifera*. I coefficienti di correlazione (r) evidenziano relazioni positive tra le variabili considerate; le correlazioni riportate risultano statisticamente significative con $p < 0,05$.

4.1.1.2 Analisi cromatografica

L'analisi cromatografica mediante RP-HPLC-DAD ha permesso di determinare il quantitativo di antocianine, acidi fenolici e altri flavonoidi presenti nei campioni oggetto dello studio. Le specifiche e la procedura di questa analisi sono descritte nella sezione 3.2.6.

Antocianine

L'analisi HPLC ha consentito di caratterizzare in modo più specifico il profilo antocianico degli estratti ottenuti nelle diverse condizioni di estrazione. Sono stati identificati e quantificati cinque principali antocianine: delphinidina 3-O-glucoside, cianidina 3-O-glucoside, petunidina 3-O-glucoside, peonidina 3-O-glucoside e malvidina 3-O-glucoside. In tutte le condizioni sperimentali, cianidina 3-O-glucoside e peonidina 3-O-glucoside sono risultate le componenti maggiormente rappresentate, mentre delphinidina 3-O-glucoside, petunidina 3-O-glucoside e malvidina 3-O-glucoside sono state rilevate in quantità inferiori (**Tabella 8**).

Campione	Delfinidina-glu (µg/g)	Cianidina glu (µg/g)	Petunidina-glu (µg/g)	Peonidina-glu (µg/g)	Malvidina-glu (µg/g)
RVL_20_5	40,0±0,3 e	647±10 e	21,7±0,4 b	702±9 d	59,9±1,2 c
RVL_20_15	70,8±0,1 a	1107±12 a	37,7±2,0 a	1206±11 a	102±1 a
RVL_60_5	69,0±1,0 ab	1068±0 b	37,0±0,8 a	1170±3 b	101±1 a
RVL_60_15	66,0±1,0 cd	1040±3 c	36,7±1,0 a	1155±1 b	101±1 a
RVL_100_5	68,0±1,0 bc	1044±1 bc	36,5±0,1 a	1155±1 b	100±0 a
RVL_100_15	63,5±0,5 d	965±1 d	34,1±0,8 a	1080±2 c	95,0±2,0 b

Tabella 8. Caratterizzazione della componente antocianinica nei diversi estratti mediante procedimento RP-HPLC-DAD. I risultati sono riportati come media ± deviazione standard. All'interno di ciascuna colonna, lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i campioni ($p < 0,05$). I valori significativamente più elevati sono evidenziati in **grassetto**.

L'andamento osservato conferma quanto già evidenziato mediante la determinazione spettrofotometrica degli antociani totali. La condizione al 20% di ampiezza per 5 minuti ha mostrato i valori più bassi per tutte le molecole analizzate, indicando che tale trattamento non è sufficiente a garantire un'efficiente estrazione della frazione antocianica. Il prolungamento del tempo di estrazione a 15 minuti, mantenendo l'ampiezza al 20%, ha determinato invece un marcato incremento del contenuto di tutte le antocianine, raggiungendo i valori più elevati.

All'aumentare dell'ampiezza ultrasonica al 60% e al 100%, i valori ottenuti risultano generalmente inferiori rispetto alla condizione 20% per 15 minuti, con una riduzione più evidente alla condizione 100% per 15 minuti, in particolare per cianidina e peonidina, i due composti prevalenti. Questo comportamento, coerente con le analisi spettrofotometriche,

suggerisce che condizioni di estrazione più energiche non favoriscano il recupero degli antociani e possano, al contrario, determinare una parziale perdita di questi composti.

Nel presente studio, la condizione al 20% di ampiezza per 15 minuti si conferma quindi la più favorevole per l'estrazione della frazione antocianica, poiché consente di ottenere i valori più elevati come confermato dall'analisi spettrofotometrica e dalla caratterizzazione HPLC.

Acidi fenolici e flavonoidi

L'analisi HPLC della frazione fenolica ha consentito di identificare e quantificare alcuni dei principali acidi fenolici e flavonoidi presenti nelle foglie di vite rossa, nello specifico acido caftarico, acido ferulico, acido clorogenico, quercitrina (quercetina-3-*O*-ramnoside), rutina (quercetina-3-*O*-rutinoside) e iperoside (quercetina-3-*O*-galattoside); a causa di problemi di coeluizione, il contenuto di rutina e iperoside è stato riportato come somma delle due (**Tabella 9**).

Campione	Acido caftarico (mg/g)	Acido ferulico (mg/g)	Acido clorogenico (μg/g)	Quercitrina (μg/g)	Rutina+Iperoside (mg/g)
RVL_20_5	0,913±0,00e	0,521±0,002d	38,63±0,58c	88,3±5,5b	4,50±0,02d
RVL_20_15	1,64±0,00d	0,952±0,007a	66,82±0,34a	151±5a	8,20±0,06a
RVL_60_5	1,68±0,01bc	0,926±0,004b	65,75±0,77a	146±3a	8,11±0,03ab
RVL_60_15	1,74±0,02a	0,931±0,001b	66,13±0,26a	166±15a	8,18±0,00a
RVL_100_5	1,65±0,00cd	0,921±0,000b	65,83±0,31a	159±2a	8,03±0,01b
RVL_100_15	1,69±0,01b	0,894±0,001c	64,27±0,23a	150±4a	7,84±0,00c

Tabella 9. Caratterizzazione degli acidi fenolici e flavonoidi nei diversi estratti mediante procedimento RP-HPLC-DAD. I risultati sono riportati come media ± deviazione standard. All'interno di ciascuna colonna, lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i campioni ($p < 0,05$). I valori significativamente più elevati sono evidenziati in **grassetto**.

La composizione fenolica osservata nel presente studio risulta in accordo con quanto riportato da Labanca et al. (2020), che mediante caratterizzazione HPLC-DAD degli estratti di foglie di *Vitis vinifera* hanno identificato l'acido caftarico come uno dei principali acidi fenolici della

matrice, insieme ad altri derivati idrossicinnamici e flavonoidi. Analogamente, Schneider et al. (2008) hanno evidenziato come i flavonoli derivati della quercetina, tra cui rutina, iperoside e quercitrina, costituiscano una componente rilevante del profilo fenolico delle foglie di vite. Nel presente studio, la frazione rutina/iperoside è risultata la componente quantitativamente più rappresentata tra i composti identificati, raggiungendo valori superiori a 8 mg/g e risultando quindi più abbondante sia della quercitrina sia dell'acido caftarico. Quest'ultimo, con concentrazioni fino a $1,74 \pm 0,02$ mg/g, si è comunque confermato il principale acido fenolico rilevato, in accordo con quanto riportato in letteratura per le foglie di *Vitis vinifera*. L'acido caftarico è l'estere dell'acido caffeico con l'acido tartarico ed è un metabolita naturalmente presente nella vite, derivante dalla via biosintetica dei fenilpropanoidi. Esso svolge un ruolo nei meccanismi di difesa della pianta e rappresenta uno dei principali marker della frazione fenolica delle foglie.

Per tutti i composti analizzati, la condizione di estrazione al 20% di ampiezza per 5 minuti ha mostrato le concentrazioni più basse, evidenziando come tale trattamento non fornisca un apporto energetico sufficiente a garantire un'efficiente estrazione della frazione fenolica. Il prolungamento del tempo di estrazione a 15 minuti ha determinato un marcato incremento del contenuto di tutti gli analiti, indicando che, a basse ampiezze, il tempo rappresenta un parametro determinante per favorire il rilascio dei composti dalla matrice vegetale.

Per quanto riguarda l'acido caftarico, la resa è correlata al tempo di estrazione, infatti il contenuto è aumentato da 0,913 a 1,64 mg/g di sostanza tal quale passando da 5 a 15 minuti di estrazione al 20% di ampiezza. Le rese migliori sono state ottenute alla condizione del 60% per 15 minuti (1,74 mg/g), mentre al 100% di ampiezza il contenuto di acido caftarico è leggermente diminuito. Analogamente, l'acido clorogenico ha mostrato un incremento significativo rispetto alla condizione iniziale, mentre tutte le condizioni caratterizzate da ampiezze pari o superiori al 60% hanno fornito valori sostanzialmente confrontabili, suggerendo il raggiungimento di un plateau dell'efficienza estrattiva. Anche la quercitrina ha evidenziato un andamento analogo, con un significativo incremento rispetto alla condizione iniziale di 20% di ampiezza e di un tempo di estrazione di 5 minuti, con valori successivamente confrontabili tra le diverse condizioni sperimentali.

Un comportamento leggermente differente è stato osservato per l'acido ferulico. Sebbene il prolungamento del tempo di estrazione al 20% abbia determinato un marcato incremento della concentrazione, l'aumento dell'ampiezza ultrasonica non ha comportato ulteriori benefici,

mostrando piuttosto una lieve diminuzione alle condizioni più energetiche. Tuttavia, tale variazione risulta contenuta e non consente di attribuire con certezza il fenomeno a processi di degradazione del composto. È più verosimile che tale andamento sia riconducibile al raggiungimento dell'equilibrio estrattivo, oltre il quale un ulteriore incremento dell'energia ultrasonica non determina un aumento della resa.

Per quanto riguarda rutina e iperoside, il cui contenuto è stato espresso come somma a causa della coeluizione nelle condizioni cromatografiche adottate, l'estrazione al 20% di ampiezza per 5 minuti si è rivelata poco efficace ($4,50 \pm 0,02$ mg/g). Il prolungamento del trattamento a 15 minuti, mantenendo costante l'ampiezza al 20%, ha determinato un incremento significativo ($8,20 \pm 0,06$ mg/g), evidenziando come, a bassa ampiezza, il tempo rappresenti un fattore determinante per il recupero di questi flavonoli glicosilati. Alle condizioni del 60% sono stati ottenuti valori elevati già dopo 5 minuti, sostanzialmente confrontabili con quelli rilevati dopo 15 minuti, suggerendo il raggiungimento di una condizione prossima al plateau estrattivo. L'aumento dell'ampiezza al 100% non ha apportato ulteriori benefici e ha determinato una lieve ma significativa diminuzione, più evidente nella prova di 15 minuti. Nel complesso, i risultati indicano che condizioni di intensità intermedia o una maggiore durata del trattamento a bassa ampiezza risultano sufficienti per massimizzare il recupero della frazione rutina/iperoside, mentre l'impiego dell'ampiezza massima non migliora ulteriormente l'efficienza estrattiva.

Nel complesso, i risultati ottenuti evidenziano come il prolungamento del tempo di estrazione rappresenti il fattore maggiormente influente alle basse ampiezze, mentre l'incremento dell'ampiezza oltre il 60% non determini un corrispondente aumento della concentrazione dei principali acidi fenolici e flavonoidi. Tale comportamento è coerente con il meccanismo dell'estrazione assistita da ultrasuoni, secondo il quale l'aumento dell'intensità della cavitazione favorisce inizialmente il trasferimento di massa dei composti fenolici, fino al raggiungimento di una condizione di equilibrio estrattivo oltre la quale ulteriori incrementi dell'energia fornita non comportano benefici significativi.

Sulla base dei risultati ottenuti dalle prove di estrazione in batch, la condizione operativa trasferita al sistema di estrazione assistita da ultrasuoni in circolo è quella caratterizzata da un'ampiezza ultrasonica del 20% e un tempo di estrazione pari a 15 minuti.

La scelta di tale condizione è stata effettuata considerando complessivamente il profilo di composizione degli estratti ottenuti. In particolare, la condizione selezionata ha garantito il più

elevato contenuto di antociani, valutati sia mediante determinazione spettrofotometrica sia mediante caratterizzazione HPLC, mantenendo al contempo elevate concentrazioni di polifenoli totali, proantocianidine, acidi fenolici e flavonoidi, oltre a un'elevata attività antiossidante. Sebbene per alcuni parametri analitici le condizioni caratterizzate da ampiezze del 60% e del 100% abbiano mostrato valori numericamente superiori, tali differenze sono risultate generalmente contenute e, nella maggior parte dei casi, non statisticamente significative.

Pertanto, considerando il rapporto tra efficienza estrattiva ed energia impiegata, la condizione al 20% di ampiezza per 15 minuti è stata ritenuta la più vantaggiosa.

4.1.2 Estrazione in circolo

4.1.2.1 *Impostazione dei parametri operativi del sistema in circolo*

La condizione sperimentale selezionata al termine dell'ottimizzazione in batch è stata successivamente trasferita al sistema di estrazione assistita da ultrasuoni in circolo. L'ampiezza è stata mantenuta invariata, mentre è stato necessario ridefinire il tempo complessivo di processo, poiché nei due sistemi il campione è sottoposto agli ultrasuoni secondo modalità differenti.

Nella configurazione batch, l'intero volume della sospensione è esposto al campo ultrasonico per tutta la durata del trattamento. Nel sistema in circolo, invece, soltanto l'aliquota presente nella camera ultrasonica è direttamente sottoposta agli ultrasuoni in un determinato istante, mentre la restante parte della sospensione si trova nel serbatoio o nei tubi di collegamento. Di conseguenza, il tempo totale di funzionamento del sistema non coincide con il tempo effettivo di esposizione del campione agli ultrasuoni. Quindi, è stato necessario apportare delle correzioni.

Per rendere confrontabile il trattamento in circolo con quello in batch è stato adottato l'approccio proposto da (Tamminen et al., 2022), in cui il tempo cumulativo di sonicazione, indicato come (t_s), è stato calcolato mediante la seguente relazione:

$$t_s = (V_r / Q) * n^{\circ} \text{circ}$$

dove:

- (V_r) è il volume della camera ultrasonica;
- (Q) è la portata volumetrica del sistema;
- ($n^{\circ}\text{circ}$) è il numero di cicli effettuati dalla sospensione.

Il rapporto tra il volume della camera ultrasonica e la portata rappresenta il tempo medio di permanenza del fluido nella camera durante un singolo passaggio.

Il numero teorico di cicli effettuati durante un tempo complessivo di processo (t_p) può invece essere calcolato come:

$$n^{\circ}\text{circ} = t_{\text{exp}} / (V_{\text{tot}} / Q)$$

dove (V_{tot}) rappresenta il volume totale della sospensione sottoposta a estrazione e t_{exp} è il tempo totale di estrazione. Sostituendo quest'ultima relazione nell'equazione del tempo cumulativo di sonicazione si ottiene:

$$t_s = V_r / V_{\text{tot}} * t_{\text{exp}}$$

Pertanto, il tempo complessivo necessario affinché il campione riceva un'esposizione cumulativa agli ultrasuoni equivalente ai 15 minuti applicati nella prova batch è stato calcolato come:

$$t_{\text{exp}} = t_s / V_r * V_{\text{tot}}$$

Considerando un tempo equivalente di sonicazione (t_s) pari a 15 minuti, un volume totale della sospensione (V_{tot}) pari a 100 mL e un volume della camera ultrasonica (V_r) pari a 32 mL, si ottiene che il tempo totale teorico di trattamento in circolo è quindi pari a **46 minuti e 53 secondi**. In questo modo, il tempo cumulativo teorico di esposizione agli ultrasuoni risulta equivalente a quello applicato nella configurazione batch.

Fissato il tempo di processo, è stata introdotta come variabile sperimentale la portata di circolo. Sono stati selezionati due valori, pari a 40 e 140 mL/min, corrispondenti rispettivamente al flusso minimo e massimo consentiti dalla pompa peristaltica utilizzata. La portata modifica il tempo di permanenza nella camera durante ciascun passaggio e di conseguenza il numero di cicli compiuti dalla sospensione, pur non modificando, nel modello teorico ideale, il tempo cumulativo di esposizione ottenuto a parità di durata complessiva del processo.

Alla portata di 40 mL/min, il tempo di residenza per singolo passaggio è corrispondente a 48 secondi. Nel corso di 46 minuti e 53 secondi, il numero teorico di cicli è di 18,75 cicli.

Alla portata di 140 mL/min, il tempo di residenza per singolo passaggio è invece corrispondente a circa 13,7 secondi. Durante 46 minuti e 53 secondi, la sospensione compie teoricamente 65,63 cicli

Le due portate determinano quindi modalità di trattamento differenti. Alla portata di 40 mL/min il campione permane più a lungo nella camera a ogni passaggio, ma compie un numero inferiore di cicli; alla portata di 140 mL/min il tempo di permanenza per passaggio è più breve, ma il numero di cicli è maggiore. Il confronto tra le due condizioni consente pertanto di valutare se l'efficacia estrattiva dipenda esclusivamente dal tempo cumulativo di esposizione oppure anche dalla distribuzione del trattamento in passaggi più lunghi e meno numerosi o, viceversa, più brevi e ripetuti.

Sulla base di queste considerazioni sono state effettuate complessivamente quattro prove in circolo, tutte mantenendo l'ampiezza ultrasonica al 20%. Due estrazioni sono state condotte per 46 minuti e 53 secondi, applicando rispettivamente le portate di 40 e 140 mL/min. Queste condizioni sono state impostate per garantire un tempo cumulativo teorico di sonicazione pari a 15 minuti e quindi confrontabile con il trattamento batch. Sono state inoltre effettuate due ulteriori estrazioni mantenendo il tempo complessivo di processo pari a 15 minuti, ovvero pari al tempo impiegato per l'estrazione ottimale selezionata dalle prove in batch, e applicando nuovamente le portate di 40 e 140 mL/min. In queste prove, il tempo cumulativo teorico di esposizione effettiva agli ultrasuoni è risultato di 4 minuti e 48 secondi, indipendentemente dalla portata. Alla portata di 40 mL/min, durante i 15 minuti di processo vengono compiuti teoricamente 6 cicli, ciascuno caratterizzato da una permanenza di 48 secondi nella camera. Alla portata di 140 mL/min vengono invece compiuti 21 cicli, con una permanenza di circa 13,7 secondi per passaggio.

Il disegno sperimentale ha quindi consentito di confrontare sia l'effetto della portata sia quello della durata complessiva del processo. Le prove da 46 minuti e 53 secondi sono state utilizzate per riprodurre nel sistema in circolo un'esposizione cumulativa teoricamente equivalente ai 15 minuti della configurazione batch, mentre le prove della durata complessiva di 15 minuti hanno permesso di verificare la bontà e la necessità della correzione del tempo di estrazione. In **Tabella 10** sono riportate le sigle e le condizioni operative impiegate per ogni campione.

Sigla campione	Ampiezza(%)	Tempo di estrazione (min)	Portata (mL/min)
RVL_46_40	20	46 min e 53 secondi	40
RVL_46_140	20	46 min e 53 secondi	140
RVL_15_40	20	15	40
RVL_15_140	20	15	140

Tabella 10. Campioni di foglie di vite analizzati in circolo

4.1.2.2 Polifenoli totali e attività antiossidante

Gli estratti ottenuti mediante il sistema assistito da ultrasuoni in circolo sono stati caratterizzati attraverso analisi spettrofotometriche, al fine di valutare l'effetto del tempo complessivo di processo e della portata sulla frazione fenolica estratta delle foglie di vite.

Campione	TPC (mg GAE/g)	TAC (mg MAL/g)	TPrC (mg CE/g)	DPPH (mg TE/g)	FRAP (mg TE/g)
RVL_46_40	26,9±2,8	2,71±0,08c	5,31±0,50a	89,6±2,8ab	60,9±1,4a
RVL_46_140	27,2±1,9	2,88±0,10b	5,15±0,27b	96,9±1,9a	59,9±1,6ab
RVL_15_40	25,4±2,3	3,30±0,11a	4,62±0,45c	78,4±2,6c	52,2±1,1c
RVL_15_140	25,6±1,3	3,27±0,02a	4,45±0,35d	84,4±2,6b	57,4±1,5b

Tabella 11. Caratterizzazione della componente polifenolica e attività antiossidante nei diversi estratti. I risultati sono riportati come media ± deviazione standard. All'interno di ciascuna colonna, lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i campioni ($p < 0,05$). I valori significativamente più elevati sono evidenziati in **grassetto**.

Polifenoli totali

Per la quantificazione dei polifenoli totali (TPC) è stato utilizzato il metodo di Folin-Ciocalteu. Ogni estratto è stato analizzato almeno in triplicato. I risultati sono stati espressi come mg equivalenti di acido gallico (GAE) per grammo di foglie rosse di vite (sostanza tal quale).

Il contenuto di polifenoli totali degli estratti ottenuti mediante il sistema in circolo è risultato compreso tra $25,4 \pm 2,3$ e $27,2 \pm 1,9$ mg/g. In particolare, le prove condotte per 46 minuti e 53 secondi hanno fornito valori leggermente superiori rispetto a quelle della durata di 15 minuti; tuttavia, tali differenze non sono risultate statisticamente significative. Analogamente, la variazione della portata da 40 a 140 mL/min non ha influenzato il contenuto di polifenoli totali. I risultati ottenuti evidenziano quindi che, nelle condizioni testate, né la portata né il tempo complessivo di processo influenzano significativamente il contenuto di polifenoli totali estratti. In particolare, l'assenza di differenze tra le prove condotte per 15 minuti e quelle della durata di 46 minuti e 53 secondi evidenzia come il modello di correzione del tempo di estrazione adottato per il sistema in circolo non abbia migliorato l'efficienza estrattiva. D'altra parte, il confronto con l'estrazione batch effettuata nelle condizioni ottimali individuate nello studio preliminare (**Figura 18**) evidenzia una riduzione del contenuto di polifenoli totali negli estratti ottenuti mediante il sistema in circolo. In particolare, la migliore condizione batch ha fornito un contenuto di $36,9 \pm 2,2$ mg GAE/g, mentre il valore massimo ottenuto nel sistema in circolo è risultato pari a $27,2 \pm 1,9$ mg GAE/g, corrispondente a una resa di circa il **73,7 %** rispetto al batch. Tale differenza suggerisce che il sistema in circolo possa risultare meno efficiente rispetto al sistema batch nelle condizioni sperimentali investigate.

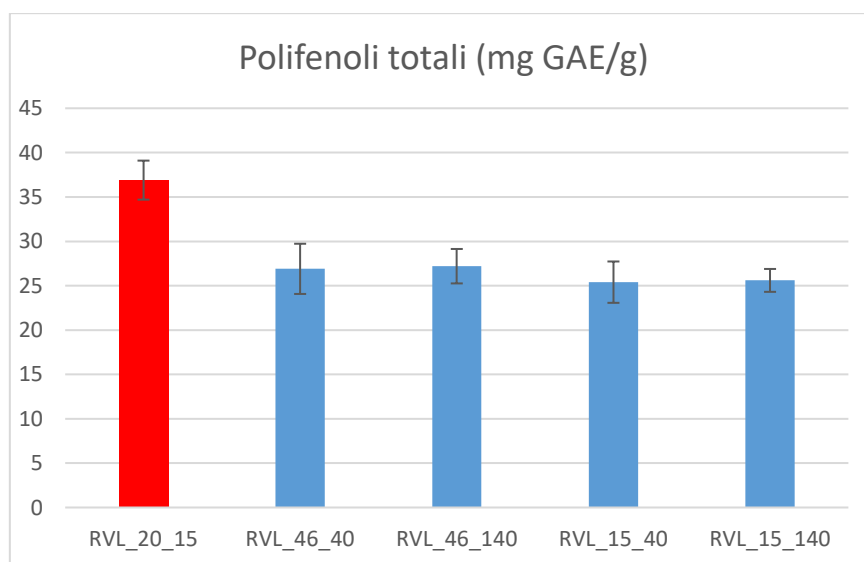


Figura 18. Confronto del contenuto di polifenoli totali (TPC), espresso come mg di equivalenti di acido gallico (GAE) per grammo di matrice tal quale, tra la migliore condizione di estrazione batch (RVL_20_15) e gli estratti ottenuti mediante il sistema in circolo alle diverse combinazioni di tempo di processo e portata. I dati sono riportati come media $\pm$ deviazione standard.

Antociani totali

Il contenuto di antociani totali (TAC) è stato determinato tramite saggio spettrofotometrico (sezione 3.2.3). Ogni estratto è stato analizzato almeno in triplicato. I risultati ottenuti sono stati espressi in mg di antociani totali (equivalenti di malvidina 3-O-glucoside) per grammo di foglie di vite rossa (sostanza tal quale) ed espressi come media e relativa deviazione standard.

L'analisi del contenuto di antociani totali ha evidenziato un comportamento differente rispetto a quello osservato per il TPC. Le prove della durata complessiva di 15 minuti hanno mostrato il contenuto significativamente più elevato ($3,30 \pm 0,10$), indipendentemente dalla portata utilizzata, mentre il prolungamento del trattamento a 46 minuti e 53 secondi ha determinato una riduzione significativa del contenuto antocianico, con valori pari a $2,71 \pm 0,08$ e $2,88 \pm 0,10$ rispettivamente alle portate di 40 e 140 mL/min. Diversamente da quanto osservato per il contenuto di polifenoli totali, il tempo complessivo di processo rappresenta quindi il parametro maggiormente influente sull'estrazione degli antociani. Il trattamento più prolungato, pur garantendo un tempo cumulativo di esposizione agli ultrasuoni teoricamente equivalente alla prova batch, sembra determinare una minore stabilità di questa classe di composti. Tale comportamento risulta coerente con la natura chimica degli antociani, notoriamente sensibili ai trattamenti prolungati e all'azione della cavitazione ultrasonica, che può favorire fenomeni di degradazione dovuti all'aumento locale della temperatura. Come è possibile osservare nella **Figura 19** gli estratti a 46 min subiscono un'esposizione ad alte temperature maggiore rispetto agli estratti a 15 min, aumentando la degradazione degli antociani e riducendo così la loro resa d'estrazione.

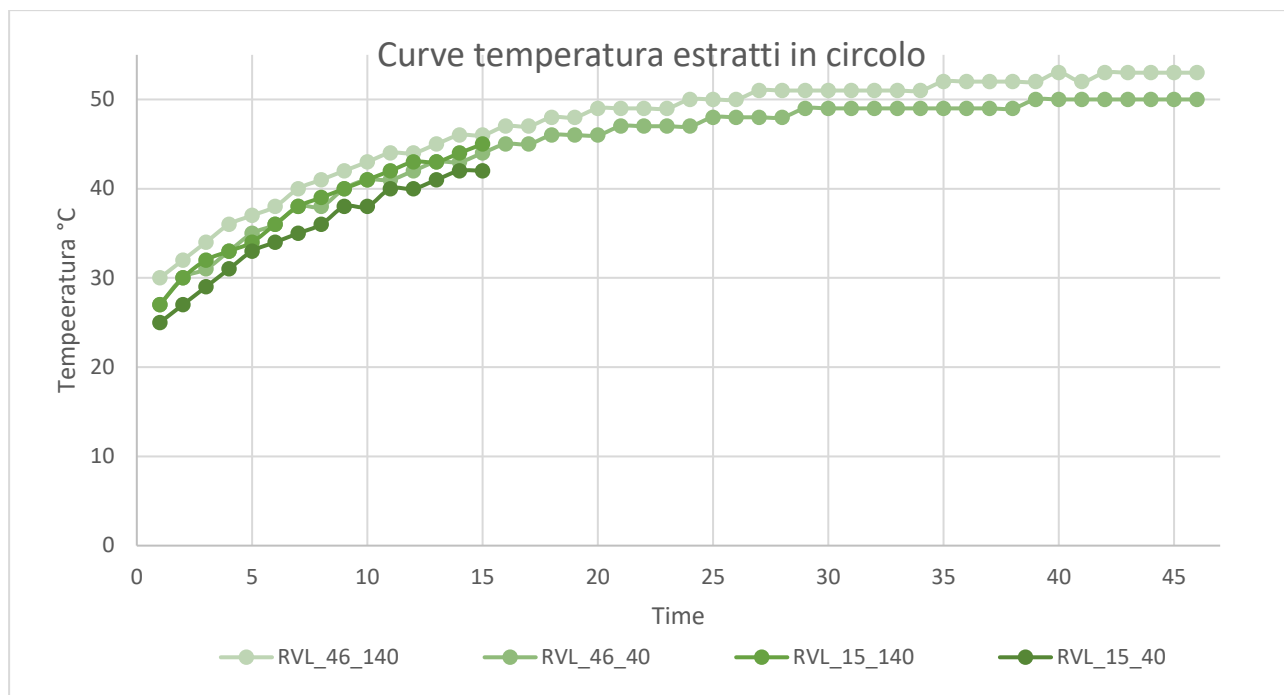


Figura 19. Curve di temperatura di tutti gli estratti in circolo.

Il confronto con l'estrazione batch ($3,08 \pm 0,02$ mg/g) evidenzia come le prove in circolo condotte per 15 minuti abbiano fornito una resa di estrazione degli antociani superiore. Una possibile spiegazione di questo comportamento è rappresentata dalla maggiore conservazione degli antociani durante il processo in circolo, verosimilmente favorita dalle più basse temperature raggiunte durante l'estrazione. Come mostrato in **Figura 20**, infatti, a parità di condizioni (ampiezza: 20%; tempo: 15 min) nelle prove in circolo la temperatura massima si attesta intorno a 42–45 °C, mentre nelle corrispondenti estrazioni batch raggiunge circa 57 °C. Considerata la nota termolabilità degli antociani, il minore riscaldamento del sistema potrebbe aver limitato i fenomeni di degradazione termica, contribuendo così alla maggiore resa osservata negli estratti ottenuti in circolo.

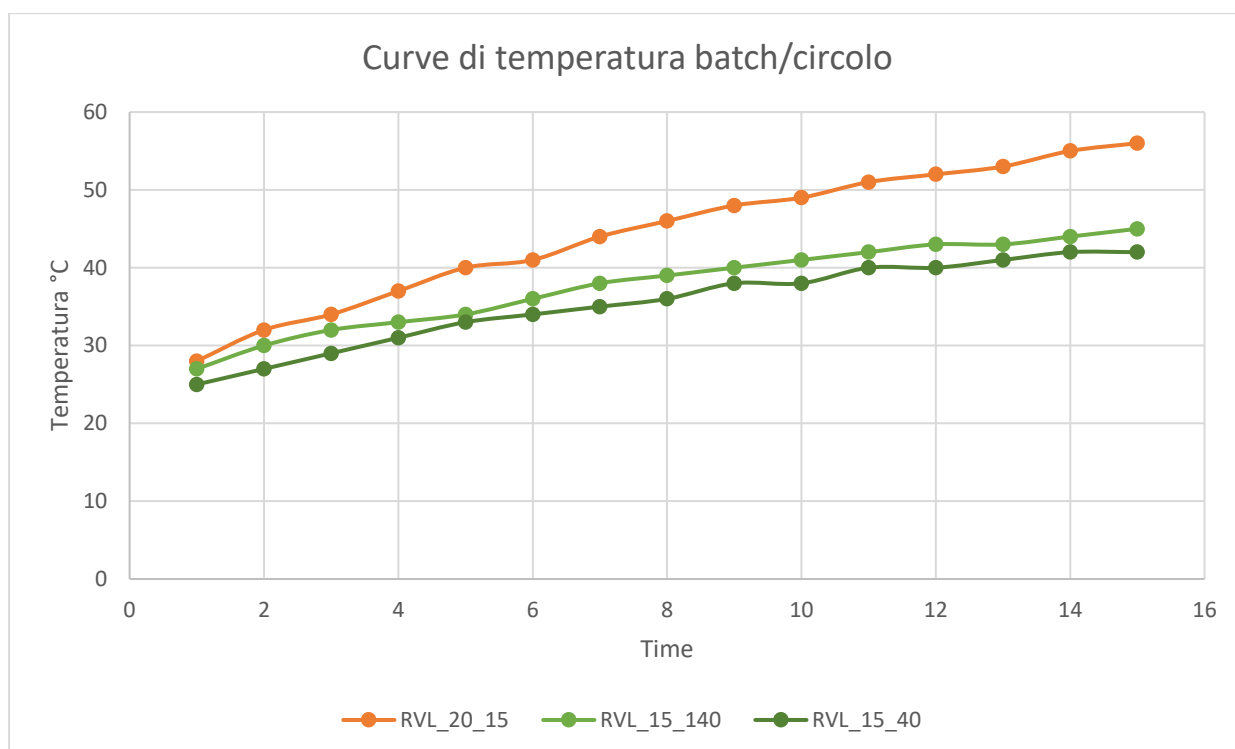


Figura 20. Curve di temperature del campione batch RVL_20_15 e delle due prove in circolo RVL_15_40 e RVL_15_140.

La portata è risultata invece ininfluyente. A parità di tempo complessivo, la portata di 140 mL/min ha fornito valori statisticamente comparabili rispetto a quella di 40 mL/min sia nelle prove da 46 minuti e 53 secondi, sia in quelle a 15 minuti, suggerendo che una permanenza più breve del campione all'interno della camera ultrasonica ad ogni passaggio non contribuisca a preservare maggiormente la stabilità della frazione antocianica.

Proantocianidine

Il contenuto di proantocianidine totali (TPrC) è stato determinato mediante il saggio BL-DMAC, i risultati ottenuti sono stati espressi in mg di catechina equivalenti (CE) su grammo di foglie tal quali, espressi come media e relativa deviazione standard. Negli estratti le concentrazioni più elevate sono state ottenute nelle prove della durata di 46 minuti e 53 secondi ($5,31 \pm 0,50$ e $5,15 \pm 0,27$ mg/g rispettivamente alla portata di 40 mL/min e 140 mL/min), mentre le estrazioni della durata di 15 minuti hanno mostrato valori inferiori ($4,62 \pm 0,45$ e $4,45 \pm 0,35$ mg/g rispettivamente alla portata di 40 mL/min e 140 mL/min). La differenza tra le due portate è risultata significativa, ma contenuta; il parametro maggiormente influente è risultato il tempo

complessivo di processo. Le proantocianidine sembrano quindi beneficiare del fattore di correzione proposto in letteratura e, quindi, di un'esposizione più prolungata al trattamento ultrasonico in circolo. In particolare, le prove condotte per 46 minuti e 53 secondi hanno anche mostrato valori sostanzialmente sovrapponibili a quelli ottenuti nelle corrispondenti estrazioni della durata di 15 minuti in batch.

Attività antiossidante

L'attività antiossidante dei campioni è stata valutata mediante il saggio DPPH e saggio FRAP, e i risultati sono stati espressi in Trolox equivalenti (TE, mg/g) sulla sostanza tal quale.

I saggi hanno evidenziato un andamento complessivamente analogo. Nel saggio DPPH, le prove condotte per 46 minuti e 53 secondi hanno mostrato valori di attività antiradicalica compresi tra $89,6 \pm 2,9$ e $96,9 \pm 1,9$ mg TE/g, superiori rispetto alle corrispondenti estrazioni della durata di 15 minuti. Analogamente, nel saggio FRAP i valori più elevati sono stati ottenuti nelle prove di 46 minuti e 53 secondi, con un massimo pari a $60,9 \pm 1,4$ mg TE/g, mentre il valore minimo è stato rilevato nella prova di 15 minuti alla portata di 40 mL/min ($52,2 \pm 1,1$ mg TE/g). L'andamento osservato nei due saggi antiossidanti appare coerente con quello riscontrato per il contenuto di polifenoli totali e, soprattutto, per le proantocianidine. Sebbene il TPC non abbia mostrato differenze statisticamente significative, il prolungamento del processo sulla base del fattore di correzione sembra favorire il rilascio di specifiche classi di composti fenolici caratterizzate da una maggiore capacità antiossidante, determinando un incremento del potere riducente degli estratti. Ciò conferma come l'attività antiossidante dipenda non soltanto dalla quantità complessiva di polifenoli estratti, ma anche dalla loro composizione qualitativa.

Il confronto con la corrispondente estrazione batch mostra che il sistema in circolo mantiene un'attività antiossidante sostanzialmente confrontabile con quella ottenuta nel sistema tradizionale. In particolare, il valore massimo ottenuto mediante il saggio DPPH ($96,9 \pm 1,9$ mg TE/g) risulta solo leggermente inferiore rispetto a quello dell'estrazione batch (103 ± 2 mg TE/g), mentre nel saggio FRAP il valore massimo osservato nel sistema in circolo ($60,9 \pm 1,4$ mg TE/g) è risultato lievemente superiore al corrispondente valore batch ($54,1 \pm 2,1$ mg TE/g). Complessivamente, questi risultati suggeriscono che il modello di correzione del tempo adottato per il sistema in circolo sia in grado di preservare efficacemente la capacità

antiossidante degli estratti, pur in presenza di una riduzione del contenuto di polifenoli totali osservata nelle medesime condizioni sperimentali.

4.1.2.3 Analisi cromatografica

Come per la procedura in batch l'analisi cromatografica è stata effettuata mediante RP-HPLC-DAD, permettendo di determinare il quantitativo di antocianine, acidi fenolici e altri flavonoidi presenti nei campioni oggetto dello studio.

Antocianine

L'analisi HPLC ha consentito di caratterizzare il profilo antocianico degli estratti ottenuti mediante il sistema di estrazione assistita da ultrasuoni in circolo. In tutte le condizioni sperimentali sono state identificate cinque principali antocianine (**Tabella 12**) analoghe alle prove in batch.

Campione	Delfinidina-glu (µg/g)	Cianidina-glu (µg/g)	Petunidina-glu (µg/g)	Peonidina-glu (µg/g)	Malvidina-glu (µg/g)
RVL_46_40	62,4±0,5b	1015±2c	35,2±0,2b	1123±14c	95,8±2,5a
RVL_46_140	67,8±0,1a	1115±6a	38,7±0,1a	1221±1a	103±0a
RVL_15_40	66,6±0,2a	1069±8b	36,5±0,1b	1162±2b	94,6±2,5a
RVL_15_140	63,1±0,7b	1039±7c	35,9±0,3b	1153±1b	95,4±1,9a

Tabella 12. Caratterizzazione della componente antocianica nei diversi estratti in circolo mediante procedimento RP-HPLC-DAD. I risultati sono riportati come media ± deviazione standard. All'interno di ciascuna colonna, lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i campioni ($p < 0,05$). I valori significativamente più elevati sono evidenziati in **grassetto**.

Nel sistema in circolo, cianidina-3-O-glucoside e peonidina-3-O-glucoside sono risultate le componenti maggiormente rappresentate del profilo antocianico, analogamente a quanto osservato nelle prove batch. Per la cianidina, i valori sono risultati compresi tra 1015 ± 2 e 1115 ± 6 µg/g, mentre la peonidina ha mostrato concentrazioni comprese tra 1123 ± 14 e 1221 ± 1 µg/g. Per entrambi i composti, il valore massimo è stato ottenuto nella condizione di 46 minuti e 53 secondi alla portata di 140 mL/min, significativamente superiore alle altre condizioni del sistema in circolo. Valutando l'effetto della portata, emerge che nelle prove da 46 minuti e 53 secondi, l'aumento da 40 a 140 mL/min migliora l'estrazione; in particolare, considerando le due antocianine più abbondanti, la cianidina è aumentata da 1015 ± 2 a 1115 ± 6 µg/g, mentre

la peonidina è passata da 1123 ± 14 a 1221 ± 1 $\mu\text{g/g}$. Questo andamento suggerisce che, a parità di tempo cumulativo teorico di sonicazione, la distribuzione del trattamento in passaggi più brevi ma più numerosi possa risultare più favorevole rispetto a una permanenza più lunga nella camera ultrasonica associata a un numero inferiore di passaggi. Nelle prove a 15 minuti, l'effetto della portata non ha seguito lo stesso andamento ed è risultata variabile. La condizione a 40 mL/min ha infatti fornito valori superiori statisticamente significativi rispetto a quella a 140 mL/min sia per la cianidina, rispettivamente 1069 ± 8 e 1039 ± 7 $\mu\text{g/g}$, sia per la delfinidina, pari a $66,6 \pm 0,2$ e $63,1 \pm 0,7$. Per la peonidina e per le altre antocianine considerate, invece, non sono state osservate differenze statisticamente significative tra le due portate.

Nel complesso, il trattamento di 46 minuti e 53 secondi alla portata di 140 mL/min ha fornito complessivamente il profilo antocianico più favorevole, con valori numericamente più elevati per tutte le antocianine considerate. Tale risultato mostra che il fattore di correzione del tempo rappresenta un valido punto di partenza per il trasferimento dal batch al circolo, ma la sua efficacia dipende anche dalle condizioni idrodinamiche del sistema. L'equivalenza del tempo cumulativo, quindi, non è sufficiente da sola a definire la condizione ottimale: portata, numero di passaggi e durata del singolo attraversamento della camera devono essere valutati sperimentalmente e in maniera congiunta.

Il confronto tra il sistema batch e quello in circolo evidenzia che il profilo antocianico rimane qualitativamente invariato, poiché la peonidina 3-*O*-glucoside e la cianidina 3-*O*-glucoside risultano le specie predominanti in entrambe le configurazioni. Nel sistema batch, alla condizione selezionata RVL_20_15, le concentrazioni di cianidina e peonidina erano pari rispettivamente a 1107 ± 12 e 1206 ± 11 $\mu\text{g/g}$. Valori complessivamente confrontabili sono stati ottenuti anche nel sistema in circolo, nel quale la cianidina è risultata compresa tra 1015 ± 2 e 1115 ± 6 $\mu\text{g/g}$ e la peonidina tra 1123 ± 14 e 1221 ± 1 $\mu\text{g/g}$. In particolare, la condizione di 46 minuti e 53 secondi alla portata di 140 mL/min ha fornito valori pari a 1115 ± 6 $\mu\text{g/g}$ per la cianidina e 1221 ± 1 $\mu\text{g/g}$ per la peonidina, numericamente molto prossimi a quelli osservati nel batch. Tali risultati indicano che il fattore di correzione del tempo, associato alla portata più elevata, consente di riprodurre efficacemente il recupero dei due principali antociani nel sistema in circolo.

Acidi fenolici e flavonoidi

L'analisi HPLC della frazione fenolica ha consentito di identificare e quantificare alcuni dei principali acidi fenolici e flavonoidi presenti nelle foglie di vite rossa, nello specifico acido caftarico, acido ferulico, acido clorogenico, quercitrina (quercetina-3-*O*-ramnoside), rutina (quercetina-3-*O*-rutinoside) e iperoside (quercetina-3-*O*-galattoside); a causa di problemi di coeluizione, il contenuto di rutina e iperoside è stato riportato come somma delle due (**Tabella 13**).

Campione	Acido caftarico (mg/g)	Acido ferulico (mg/g)	Acido clorogenico (µg/g)	Quercitrina (µg/g)	Rutina+Iperoside (mg/g)
RVL_46_40	1,63±0,01a	0,904±0,002a	66,8±0,1b	368±1c	7,86±0,04b
RVL_46_140	1,63±0,01a	0,974±0,000a	67,7±0,1ab	391±2a	8,24±0,01a
RVL_15_40	1,51±0,01b	0,923±0,000a	68±0,4a	374±1b	7,83±0,01bc
RVL_15_140	1,50±0,02b	0,919±0,001a	65,5±0,5c	362±1d	7,76±0,02c

Tabella 13. Caratterizzazione degli acidi fenolici e flavonoidi nei diversi estratti mediante procedimento RP-HPLC-DAD. I risultati sono riportati come media ± deviazione standard. All'interno di ciascuna colonna, lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i campioni ($p < 0,05$). I valori significativamente più elevati sono evidenziati in **grassetto**.

La caratterizzazione cromatografica ha evidenziato come i derivati glicosilati della quercetina, in particolare la frazione rutina/iperoside, rappresentino i composti quantitativamente prevalenti negli estratti, con concentrazioni prossime a 8 mg/g. Tra gli acidi fenolici, l'acido caftarico è risultato invece il composto maggiormente rappresentato, con valori compresi tra 1,50±0,02 e 1,63±0,01 mg/g. Nel complesso, la condizione caratterizzata da un tempo di processo di 46 minuti e 53 secondi e da una portata di 140 mL/min ha fornito i valori più elevati, o comunque tra i più elevati, per la maggior parte degli analiti considerati, indicando che il tempo corretto associato alla maggiore portata rappresenta la combinazione più favorevole per il recupero della frazione fenolica.

Tale andamento è particolarmente evidente per la quercitrina e per la frazione rutina/iperoside, che hanno raggiunto nella condizione RVL_46_140 rispettivamente 391 ± 2 µg/g e $8,24 \pm 0,01$ mg/g. Anche l'acido caftarico ha beneficiato della correzione del tempo di estrazione, raggiungendo $1,63 \pm 0,01$ mg/g in entrambe le prove da 46 minuti e 53 secondi. Un comportamento differente è stato osservato per l'acido ferulico, il cui contenuto è rimasto sostanzialmente costante nelle diverse condizioni, con valori compresi tra $0,900 \pm 0,000$ e $0,970$

$\pm 0,000$ mg/g, indicando una limitata influenza sia del tempo sia della portata. L'acido clorogenico ha invece mostrato variazioni contenute, comprese tra $65,5 \pm 0,5$ e $68,0 \pm 0,4$ $\mu\text{g/g}$, senza evidenziare un andamento univocamente riconducibile al solo tempo o alla sola portata.

Il confronto con il sistema batch mostra che la correzione del tempo di estrazione consente di riprodurre efficacemente il recupero di diversi composti. In particolare, i valori di acido caftarico e rutina/iperoside ottenuti nella condizione RVL_46_140 risultano sovrapponibili a quelli del campione batch RVL_20_15, rispettivamente pari a $1,64 \pm 0,00$ mg/g e $8,20 \pm 0,06$ mg/g. Anche l'acido ferulico e l'acido clorogenico mostrano concentrazioni complessivamente comparabili tra le due configurazioni, mentre la quercitrina rappresenta l'eccezione più evidente, poiché nel sistema in circolo sono state ottenute concentrazioni superiori rispetto al batch. Nel complesso, la combinazione tra tempo corretto e portata di 140 mL/min risulta quindi la condizione più favorevole tra quelle investigate, pur confermando una risposta dipendente dal composto considerato.

4.1.3 Confronto batch-circolo

Per il confronto tra il sistema batch e quello in circolo (**Tabella 14**) sono state considerate la condizione batch selezionata, RVL_20_15, e la prova in circolo RVL_46_140. Quest'ultima è stata scelta in quanto complessivamente ha dato i risultati migliori poiché, pur avendo mostrato un'influenza limitata sulle determinazioni spettrofotometriche, ha fornito nel complesso il profilo cromatografico più favorevole, con valori più elevati per i principali antociani e per i glicosidi della quercetina

Analisi	Batch (RVL_20_15)	Circolo (RVL_46_140)	Differenza (%)
TPC (mg GAE/g)	36,9 $\pm$ 2,2	27,2 $\pm$ 1,9	- 26,3
TAC (mg MAL/g)	3,08 $\pm$ 0,02	2,88 $\pm$ 0,10	- 6,49
TPrC (mg CE/g)	5,66 $\pm$ 0,25	5,15 $\pm$ 0,27	- 9,01
DPPH (mg TE/g)	103 $\pm$ 2	96,9 $\pm$ 1,9	- 5,92
FRAP (mg TE/g)	54,1 $\pm$ 2,1	59,9 $\pm$ 1,6	+ 10,7
Delfinidina-glu ($\mu\text{g/g}$)	70,8 $\pm$ 0,1	67,8 $\pm$ 0,1	- 4,24
Cianidina glu ($\mu\text{g/g}$)	1107 $\pm$ 12	1115 $\pm$ 6	+ 0,72
Petunidina-glu ($\mu\text{g/g}$)	37,7 $\pm$ 2,0	38,7 $\pm$ 0,1	+ 2,65
Peonidina-glu ($\mu\text{g/g}$)	1206 $\pm$ 11	1221 $\pm$ 1	+ 1,24
Malvidina-glu ($\mu\text{g/g}$)	102 $\pm$ 1	103 $\pm$ 0	+ 0,98

Acido caftarico (mg/g)	1,64±0,00	1,63±0,01	- 0,61
Acido ferulico (mg/g)	0,952±0,007	0,974±0,000	+ 2,31
Acido clorogenico (µg/g)	66,82±0,34	67,7±0,1	+ 1,32
Quercitrina (µg/g)	151±5	391±2	+ 159
Rutina+Iperoside (mg/g)	8,20±0,06	8,24±0,01	+ 0,49

Tabella 14. Confronto tra la condizione batch selezionata (RVL_20_15) e la condizione in circolo con tempo corretto e portata di 140 mL/min (RVL_46_140). I risultati sono espressi come media $\pm$ deviazione standard. La differenza percentuale è stata calcolata come [(valore in circolo – valore batch)/valore batch]×100; valori positivi indicano un incremento nel sistema in circolo, mentre valori negativi indicano una riduzione rispetto al batch.

Il confronto tra la condizione batch RVL_20_15 e la condizione in circolo RVL_46_140 evidenzia, nel complesso, una buona comparabilità tra i due sistemi di estrazione. Considerando come accettabili variazioni comprese entro circa $\pm 10\%$, compatibilmente con la precisione delle determinazioni analitiche, la maggior parte dei parametri spettrofotometrici e dei composti determinati mediante HPLC mostra infatti valori sostanzialmente sovrapponibili nelle due configurazioni. Anche il FRAP presenta un valore solo lievemente superiore a tale intervallo nel sistema in circolo (+10,7%).

Le principali eccezioni riguardano il contenuto di polifenoli totali e di quercitrina. Il TPC risulta ridotto del 26,3% nel sistema in circolo rispetto al batch. Al contrario, la quercitrina mostra un incremento molto consistente, passando da 151 ± 5 µg/g nel batch a 391 ± 2 µg/g nel sistema in circolo. Quest'ultimo risultato evidenzia una risposta specifica del composto alla diversa configurazione estrattiva.

Nel complesso, il sistema in circolo con tempo corretto e portata di 140 mL/min ha consentito di riprodurre efficacemente il profilo dei principali antociani, degli acidi fenolici e della frazione rutina/iperoside ottenuto nel batch. Le principali differenze hanno riguardato il minore contenuto di polifenoli totali e il maggiore recupero della quercitrina. I risultati confermano pertanto l'applicabilità del sistema in circolo, sebbene non si garantisca un'identica risposta per tutte le classi di composti.

4.2 Foglie di melo

Per quanto riguarda l'analisi delle foglie di melo, lo studio è stato condotto su due varietà, GoldRush e Galiwa; l'obiettivo è stato quello di valutare l'applicabilità e l'efficienza del processo UAE su altre tipologie di foglie, caratterizzate da un diverso profilo fitochimico. In particolare, sono state ottimizzate le condizioni operative per il recupero della componente fenolica, valutando la quantificazione di polifenoli e proantocianidine totali, l'attività antiossidante e, più specificatamente, il recupero di due diidrocalconi caratteristici della mela, florizina e floretina. Tale frazione è considerata la principale responsabile delle proprietà biologiche attribuite alle foglie di melo. L'ottimizzazione del processo estrattivo è stata inizialmente effettuata in modalità batch e, successivamente, la condizione sperimentale ottimale è stata trasferita al sistema in circolo.

4.2.1 Estrazione in batch

L'ottimizzazione del processo di estrazione assistita da ultrasuoni in modalità batch è stata condotta prendendo come punto di partenza le condizioni sperimentali analoghe all'estrazione batch delle foglie di vite. È stato impiegato come solvente una miscela etanolo/acqua al 50% (v/v), utilizzando un rapporto solido/liquido pari a 1:20 (g/mL). A partire da tali condizioni, l'ottimizzazione è stata focalizzata sulla valutazione dell'influenza di due parametri operativi: l'ampiezza dell'onda ultrasonica, impostata a tre diversi livelli (20%, 60% e 100%), e il tempo di estrazione, valutato a 5 e 15 minuti (**Tabella 15**).

Sigla campione	Ampiezza (%)	Tempo di estrazione (min)
GWL_20_5	20	5
GWL_20_15	20	15
GWL_60_5	60	5
GWL_60_15	60	15
GWL_100_5	100	5
GWL_100_15	100	15
GRL_20_5	20	5
GRL_20_15	20	15
GRL_60_5	60	5
GRL_60_15	60	15
GRL_100_5	100	5
GRL_100_15	100	15

Tabella 15. Campioni di foglie di mela Galiwa (GWL) e GoldRush (GRL) analizzati in batch.

La combinazione di questi fattori ha consentito di confrontare le diverse condizioni sperimentali al fine di individuare quella in grado di garantire la migliore efficienza estrattiva della componente fenolica. La condizione ottimale identificata mediante le prove in batch è stata successivamente adottata per l'applicazione del processo di estrazione nel sistema in circolo.

4.2.1.1 Polifenoli totali e attività antiossidante

Ogni estratto ottenuto è stato caratterizzato determinando il contenuto di polifenoli, proantocianidine totali, nonché valutandone le proprietà antiossidanti mediante i metodi DPPH e FRAP (Tabella 16).

Campione	TPC (mg GAE/g)	TPrC (mg CE/g)	DPPH (mg TE/g)	FRAP (mg TE/g)
GWL_20_5	29,7±3,6ab	0,595±0,093b	49,6±4,0a	35,7±2,2b
GWL_20_15	28,1±1,8b	0,728±0,037ab	50,2±4,0a	36,8±0,4ab
GWL_60_5	32,3±1,7ab	0,860±0,111a	49,7±1,8a	37,2±1,6ab
GWL_60_15	35,1±2,4a	0,858±0,075a	55,8±3,6a	41,7±1,4a
GWL_100_5	33,2±2,7ab	0,756±0,106ab	50,8±2,6a	39,3±2,6ab
GWL_100_15	31,0±3,0ab	0,828±0,023a	51,2±0,9a	42,0±3,3a
GRL_20_5	24,9±2,2c	1,04±0,09d	28,2±1,3b	18,5±2,2c
GRL_20_15	39,6±3,6b	1,53±0,12c	35,6±0,8b	29,9±1,5b
GRL_60_5	43,1±1,3b	2,32±0,11a	51,7±3,4a	35,0±3,3ab
GRL_60_15	44,6±4,5b	2,05±0,04b	57,5±4,5a	36,9±2,2a
GRL_100_5	45,8±1,7b	2,33±0,03a	52,3±3,8a	37,2±1,4a
GRL_100_15	53,0±3,3a	2,21±0,11ab	56,6±0,7a	40,2±2,7a

Tabella 16. Caratterizzazione della componente polifenolica e attività antiossidante nei diversi estratti. I risultati sono riportati come media $\pm$ deviazione standard. Per ogni varietà di mela, i valori significativamente più elevati sono evidenziati in **grassetto**. All'interno di ciascuna colonna e per ogni varietà di mela, lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i campioni ($p < 0,05$), mentre valori contrassegnati dalla stessa lettera non differiscono significativamente.

Polifenoli totali

Il contenuto di polifenoli totali degli estratti ottenuti dalle foglie della cultivar Galiwa è risultato compreso tra $28,1 \pm 1,8$ e $35,1 \pm 2,4$ mg GAE/g di sostanza tal quale, con il valore massimo ottenuto alla condizione caratterizzata da un'ampiezza ultrasonica del 60% e un tempo di

estrazione di 15 minuti. L'analisi statistica ha evidenziato differenze significative esclusivamente tra la condizione del 20% per 15 minuti e quella del 60% per 15 minuti, mentre le restanti condizioni risultano statisticamente confrontabili. L'andamento osservato suggerisce che, per la cultivar Galiwa l'aumento dell'energia ultrasonica favorisca il rilascio dei composti fenolici fino a un'ampiezza del 60%, oltre la quale non si osservano ulteriori incrementi significativi della resa estrattiva. Il prolungamento del tempo di estrazione esercita un effetto positivo soprattutto alle ampiezze intermedie, mentre l'incremento dell'ampiezza fino al 100% non determina un corrispondente aumento del contenuto di polifenoli. Tale comportamento è coerente con il raggiungimento di un plateau estrattivo, condizione nella quale il trasferimento di massa risulta pressoché completo e ulteriori incrementi dell'energia ultrasonica non apportano benefici apprezzabili.

Il contenuto di polifenoli totali degli estratti ottenuti dalle foglie della cultivar GoldRush è risultato compreso tra $24,9 \pm 2,2$ e $53,0 \pm 3,3$ mg GAE/g di sostanza tal quale, evidenziando una marcata dipendenza dalle condizioni di estrazione. Il valore più basso è stato osservato alla condizione del 20% per 5 minuti, mentre il valore massimo è stato ottenuto al 100% per 15 minuti, risultando significativamente superiore rispetto alle altre condizioni sperimentali. L'andamento osservato evidenzia un progressivo incremento del contenuto di polifenoli totali all'aumentare sia dell'ampiezza ultrasonica sia del tempo di estrazione. In particolare, il prolungamento del trattamento da 5 a 15 minuti determina un marcato incremento della resa alle basse ampiezze, mentre l'aumento dell'intensità ultrasonica continua a favorire l'estrazione fino alla massima ampiezza investigata. Diversamente da quanto osservato nelle foglie di vite e nei campioni GWL, non si evidenzia il raggiungimento di un plateau estrattivo, suggerendo che la matrice della cultivar GoldRush richieda un maggiore apporto energetico per ottenere un'efficace disgregazione cellulare e il conseguente rilascio della componente fenolica. Questo può essere dovuto da un contenuto fenolico sensibilmente superiore nelle GRL rispetto alle GWL (fino a $53,0 \pm 3,3$ mg GAE/g), suggerendo che un maggior contenuto richiede maggiore tempo/potenza per aumentare la resa di estrazione.

Proantocianidine

Il contenuto di proantocianidine, determinato mediante il saggio BL-DMAC, è risultato per le foglie di Galiwa (GWL) significativamente influenzato dalle condizioni di estrazione. Il valore più basso è stato ottenuto alla condizione del 20% per 5 minuti, mentre il prolungamento del tempo di estrazione e l'incremento dell'ampiezza al 60% hanno determinato un marcato aumento del contenuto di proantocianidine. Le condizioni caratterizzate da ampiezze del 60% e del 100% hanno invece fornito valori statisticamente confrontabili, indicando il raggiungimento di una condizione di equilibrio estrattivo. L'andamento osservato suggerisce che l'intensificazione della cavitazione ultrasonica favorisca il rilascio delle proantocianidine dalla matrice vegetale fino al raggiungimento di una soglia oltre la quale ulteriori incrementi dell'energia applicata non determinano un corrispondente aumento della resa. Tale comportamento è coerente con quanto osservato per il contenuto di polifenoli totali e con quanto riportato in letteratura sull'estrazione assistita da ultrasuoni di matrici vegetali.

Per quanto riguarda la cultivar GoldRush (GRL), l'analisi del contenuto di proantocianidine ha evidenziato un comportamento simile a quello osservato per il contenuto di polifenoli totali. Il valore minimo è stato ottenuto alla condizione del 20% per 5 minuti, mentre l'aumento dell'ampiezza ultrasonica ha determinato un marcato incremento della concentrazione di proantocianidine, con valori superiori a 2 mg/g nelle condizioni caratterizzate da ampiezze del 60% e del 100%. Il prolungamento del tempo di estrazione risulta particolarmente efficace all'ampiezza del 20%, dove determina un incremento significativo del contenuto di proantocianidine. Al 60%, invece, il prolungamento da 5 a 15 minuti determina una diminuzione significativa, mentre al 100% i valori risultano statisticamente confrontabili. Nel complesso, alle ampiezze medio-alte il contenuto rimane superiore a 2 mg CE/g, ma l'effetto del tempo di estrazione non risulta univoco.

Anche per le proantocianidine emerge una marcata differenza varietale. La GRL presenta infatti concentrazioni complessivamente superiori rispetto alla GWL, raggiungendo valori superiori a 2 mg CE/g alle ampiezze medio-alte, mentre nella GWL i valori massimi rimangono inferiori a 1 mg CE/g. Nonostante tale differenza quantitativa, entrambe le cultivar mostrano un aumento del recupero passando dalle condizioni di estrazione più blande a quelle caratterizzate da ampiezze medio-alte, oltre le quali l'effetto delle variabili operative diventa più contenuto.

Attività antiossidante

L'attività antiossidante degli estratti è stata valutata mediante i saggi DPPH e FRAP, che hanno evidenziato una risposta differente alle condizioni di estrazione.

Per quanto riguarda le foglie GWL, dal saggio DPPH, non sono emerse differenze statisticamente significative tra le diverse condizioni sperimentali; ciò suggerisce che i composti responsabili dell'attività antiradicalica vengono estratti in maniera efficace già impiegando le condizioni più blande tra quelle investigate. Diversamente, il saggio FRAP ha evidenziato un aumento del potere riducente passando dalla condizione del 20% per 5 minuti alle condizioni caratterizzate da tempi di estrazione più lunghi e ampiezze superiori. I valori più elevati sono stati ottenuti alle condizioni del 60% per 15 minuti e del 100% per 15 minuti, risultate statisticamente confrontabili. Tale comportamento suggerisce che il prolungamento del trattamento favorisca l'estrazione dei composti maggiormente responsabili del potere riducente degli estratti, mentre l'incremento dell'ampiezza oltre il 60% non comporta ulteriori vantaggi.

L'analisi di correlazione di Pearson (**Figura 21**) effettuata sugli estratti batch della cultivar GWL non ha evidenziato correlazioni statisticamente significative tra il contenuto di polifenoli totali e l'attività antiossidante determinata mediante i saggi DPPH e FRAP ($p > 0,05$). In particolare, il TPC ha mostrato una correlazione positiva con il DPPH ($r = 0,71$; $p = 0,117$) e con il contenuto di proantocianidine ($r = 0,52$; $p = 0,287$), ma entrambe tali associazioni non hanno raggiunto la significatività statistica. Diversamente, tra TPC e FRAP è stata osservata una tendenza negativa ($r = -0,66$; $p = 0,154$), anch'essa non significativa. Anche il contenuto di proantocianidine totali non ha evidenziato correlazioni significative con l'attività antiossidante. Nel complesso, diversamente da quanto osservato nelle foglie di vite, nella cultivar GWL l'attività antiossidante non risulta direttamente associata al contenuto fenolico totale nelle condizioni investigate. Ciò suggerisce che la risposta antiossidante possa dipendere più specificatamente dal contributo di singoli composti, o classi di composti, piuttosto che dalla quantità complessiva di polifenoli.

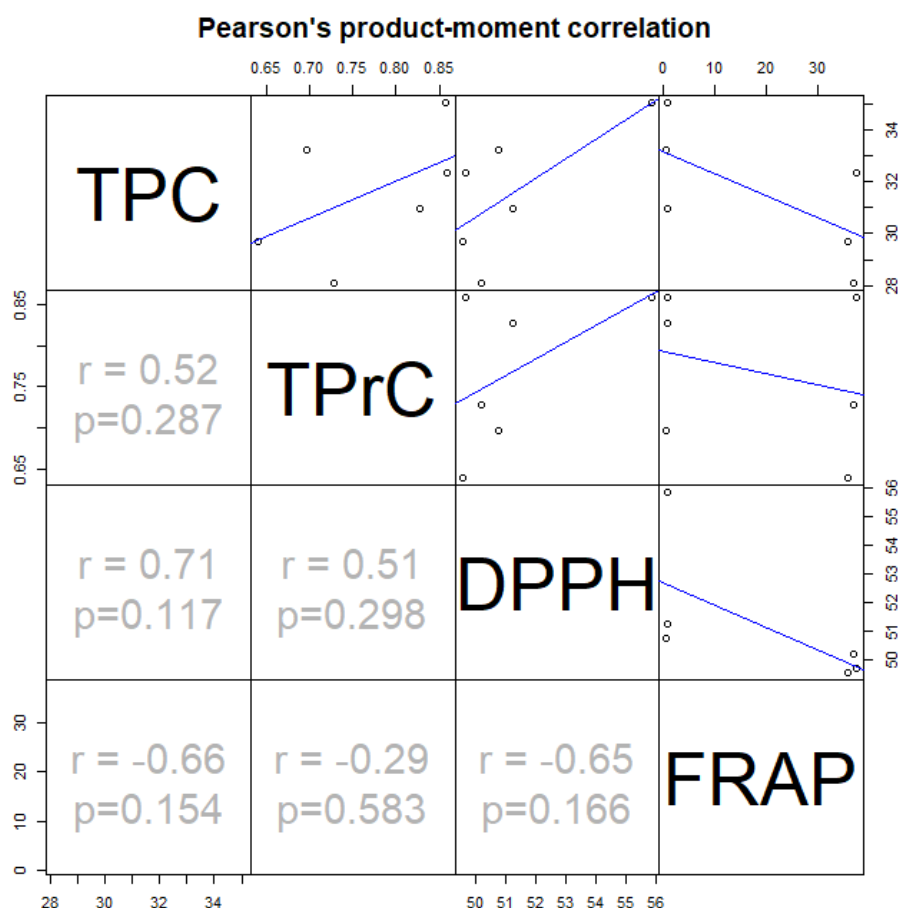


Figura 21. Matrice di correlazione di Pearson tra contenuto di polifenoli totali (TPC), proantocianidine (TPrC) e attività antiossidante determinata mediante DPPH e FRAP negli estratti batch di foglie della cultivar Galiwa (GWL). Assenza di correlazioni significative ($p > 0,05$).

Per quanto riguarda le foglie della cultivar GoldRush (GRL), nel saggio DPPH le condizioni di estrazione al 20% hanno evidenziato i valori significativamente più bassi, mentre tutte le altre condizioni sperimentali hanno fornito valori superiori e statisticamente confrontabili tra loro. Il saggio FRAP ha mostrato un andamento analogo, con un incremento del potere riducente passando dalle condizioni meno energetiche a quelle caratterizzate da ampiezze del 60% e del 100%. I valori più elevati sono stati quindi ottenuti nelle condizioni caratterizzate dal maggiore apporto energetico, suggerendo una stretta relazione tra la composizione fenolica degli estratti e la loro capacità riducente.

Infatti l'analisi di correlazione di Pearson (**Figura 22**) effettuata sugli estratti batch della cultivar GoldRush (GRL) ha evidenziato una forte associazione positiva tra il contenuto di polifenoli totali e l'attività antiossidante. In particolare, il TPC è risultato significativamente correlato sia con il saggio DPPH ($r = 0,89$; $p = 0,019$) sia, in maniera ancora più marcata, con il saggio FRAP ($r = 0,98$; $p < 0,001$). Questi risultati indicano che all'aumentare del contenuto fenolico corrisponde un incremento della capacità antiradicalica e del potere riducente degli estratti. Anche il contenuto di proantocianidine ha mostrato una forte correlazione positiva e significativa sia con il DPPH ($r = 0,92$; $p = 0,010$) sia con il FRAP ($r = 0,93$; $p = 0,008$), suggerendo un contributo rilevante di questa frazione alle proprietà antiossidanti degli estratti. Nel complesso, diversamente da quanto osservato per la cultivar GWL, nella GRL emerge quindi una chiara relazione tra il contenuto totale di polifenoli e l'attività antiossidante degli estratti.

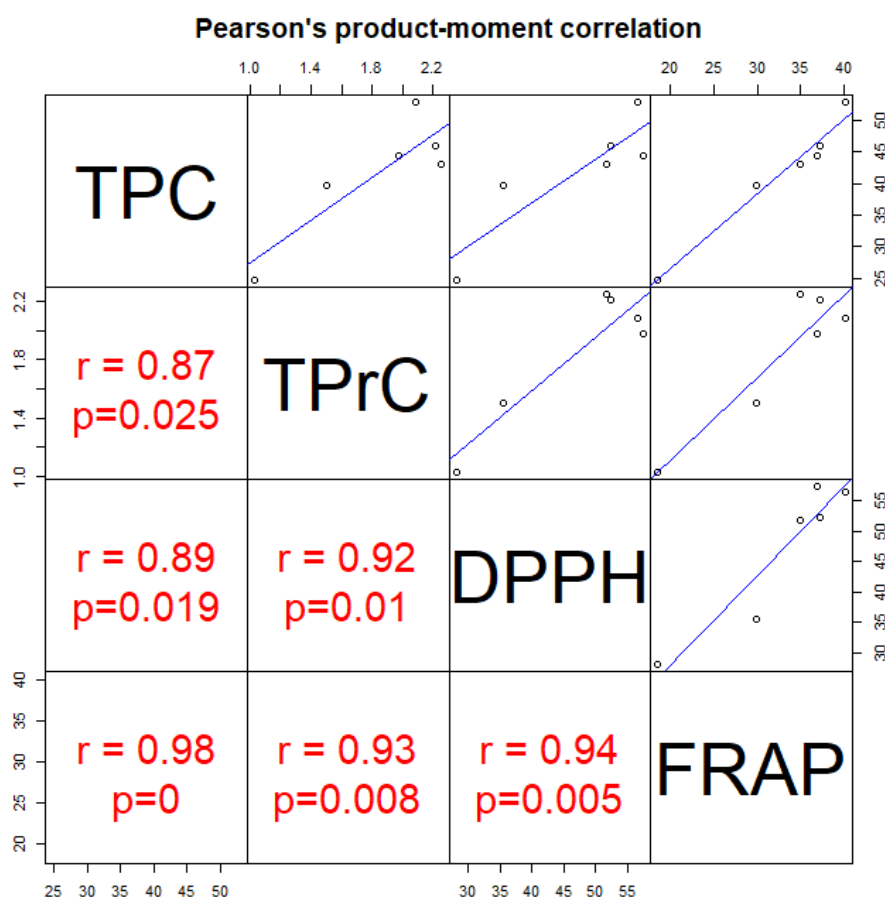


Figura 22. Matrice di correlazione di Pearson tra contenuto di polifenoli totali (TPC), proantocianidine (TPrC) e attività antiossidante determinata mediante i saggi DPPH e FRAP negli estratti batch di foglie della cultivar GoldRush (GRL). I coefficienti di correlazione (r) evidenziano relazioni positive tra le variabili considerate; le correlazioni riportate risultano statisticamente significative con $p < 0,05$.

4.2.1.2 Analisi cromatografica

L'analisi HPLC ha consentito di caratterizzare il profilo fenolico degli estratti ottenuti dalle foglie della cultivar Galiwa (GWL) e GoldRush (GRL), identificando e quantificando i principali diidrocalconi, acidi fenolici e flavonoidi presenti nella matrice vegetale. In particolare, sono stati determinati florizina, floretina, rutina e iperoside (quantificate come somma), acido ferulico, acido clorogenico e quercitrina (**Tabella 17**). Tra tutti i composti analizzati, la florizina è risultata il costituente quantitativamente predominante, confermando quanto riportato in letteratura per le foglie di *Malus domestica*, nelle quali questo diidrocalcone rappresenta il principale metabolita fenolico (Cendrowski et al., 2024).

Campione	Florizina (mg/g)	Floretina (mg/g)	Acido Ferulico (mg/g)	Acido Clorogenico (mg/g)	Rutina+ Iperoside (mg/g)	Quercitrina (mg/g)
GWL_20_5	33,9±0,1e	0,457±0,003 d	0,303±0,001 d	0,182±0,005c	1,86±0,01c	1,40±0,02
GWL_20_15	35,0±0,0d	0,455±0,005 d	0,303±0,001 d	0,186±0,003c	1,86±0,01c	1,40±0,02
GWL_60_5	37,6±0,1c	0,481±0,001 d	0,307±0,001 cd	0,190±0,000c	1,88±0,01c	1,40±0,04
GWL_60_15	39,5±0,1a	0,570±0,001 a	0,333±0,001 a	0,217±0,001a	1,90±0,01b	1,42±0,01
GWL_100_5	38,6±0,1b	0,518±0,001 c	0,310±0,001 c	0,201±0,003b	2,06±0,01a	1,49±0,09
GWL_100_15	39,7±0,1a	0,538±0,002 b	0,318±0,001 b	0,209±0,002a b	1,91±0,01b	1,48±0,01
GRL_20_5	60,0±0,4e	1,66±0,19a	0,688±0,001 e	0,244±0,002d	1,97±0,02e	2,18±0,06c
GRL_20_15	85,9±0,2d	1,29±0,02b	0,946±0,001 d	0,329±0,002c	2,66±0,01d	2,88±0,22b
GRL_60_5	117±0,0c	0,914±0,029 c	1,23±0,01c	0,445±0,001b	3,47±0,01c	3,70±0,30a
GRL_60_15	120±0,0b	1,03±0,03bc	1,26±0,01b	0,465±0,002b	3,56±0,01b	3,57±0,30a
GRL_100_5	120±0,0b	0,716±0,018 c	1,24±0,01bc	0,451±0,004b	3,50±0,02c	3,90±0,30a
GRL_100_15	135±0,0a	0,860±0,029 c	1,39±0,01a	0,515±0,001a	3,93±0,01a	3,92±0,33a

Tabella 17. Caratterizzazione di florizina, floretina, acidi fenolici e altri flavonoidi nei diversi estratti in batch mediante procedimento RP-HPLC-DAD. Per ogni varietà di mela, i valori significativamente più elevati sono evidenziati in **grassetto**. All'interno di ciascuna colonna e per ogni varietà di mela, lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i campioni ($p < 0,05$), mentre valori contrassegnati dalla stessa lettera non differiscono significativamente.

Florizina e floretina

Per le foglie Galiwa il contenuto di florizina è risultato significativamente influenzato sia dall'ampiezza ultrasonica sia dal tempo di estrazione. Il contenuto è aumentato passando dalle condizioni meno intense a quelle caratterizzate da maggiore ampiezza e durata del trattamento, raggiungendo valori massimi di $39,5 \pm 0,1$ mg/g al 60% per 15 minuti e $39,7 \pm 0,1$ mg/g al 100% per 15 minuti. Nella cultivar GoldRush, l'incremento è risultato più marcato e il valore massimo, pari a $135 \pm 0,0$ mg/g, è stato ottenuto al 100% per 15 minuti. L'andamento osservato evidenzia un incremento continuo della resa estrattiva all'aumentare dell'energia fornita al sistema, senza evidenziare il raggiungimento di un plateau. Il prolungamento del tempo di estrazione determina un aumento del contenuto di florizina a tutte le ampiezze investigate, suggerendo che la matrice fogliare della cultivar GRL richieda un maggiore apporto energetico per favorire il completo rilascio di questo diidrocalcone. La florizina è risultata il composto quantitativamente predominante in entrambe le cultivar, sebbene con concentrazioni nettamente superiori per i campioni GRL (fino a 135 ± 0 mg/g), per i quali sono risultate necessarie condizioni estrattive più intense e tempi più prolungati per raggiungere il massimo recupero; al contrario, per i campioni GWL valori prossimi al massimo sono stati ottenuti già al 60% per 15 minuti ($39,5 \pm 0,1$ mg/g).

Anche per la floretina sono emerse differenze tra le due cultivar. Nella GWL il valore massimo è stato ottenuto al 60% per 5 minuti, con $0,570 \pm 0,001$ mg/g, mentre nella GRL la concentrazione più elevata, pari a $1,66 \pm 0,19$ mg/g, è stata rilevata al 20% per 5 minuti. Anche in questo caso la GRL presenta un contenuto superiore rispetto alla GWL. Pertanto, florizina e floretina mostrano risposte estrattive differenti e cultivar-specifiche; i dati disponibili non consentono, tuttavia, di correlare le loro quantificazioni a trasformazioni reciproche tra forma glicosilata e aglicone.

Acidi fenolici

Nelle foglie di melo della cultivar Galiwa, le variazioni dell'acido ferulico e clorogenico sono risultate relativamente contenute: per l'acido ferulico il valore massimo è stato osservato al 60% per 15 minuti, mentre l'acido clorogenico ha raggiunto valori simili nelle condizioni medio-alte. Considerata l'entità limitata delle differenze, tali risultati suggeriscono soprattutto il raggiungimento di una condizione prossima al plateau estrattivo, senza indicare una marcata dipendenza dalle condizioni più energetiche.

Per quanto riguarda le foglie GoldRush, invece, entrambi gli acidi fenolici hanno mostrato un aumento molto più evidente all'intensificarsi del trattamento, raggiungendo i valori massimi al 100% per 15 minuti. La diversa risposta conferma ancora una volta il comportamento cultivar-specifico osservato anche per TPC e florizina; mentre nei campioni GWL il massimo recupero viene raggiunto già al 60% per 15 minuti, nei campioni GRL sono necessarie condizioni di maggiore intensità ultrasonica e un tempo più prolungato per ottenere i valori più elevati.

Glicosidi della quercetina

Per le foglie di melo Galiwa, la frazione identificata come sommatoria di rutina e iperoside è rimasta sostanzialmente stabile nelle condizioni meno intense, mostrando un aumento a partire dalle condizioni medio-alte e raggiungendo il valore massimo al 100% per 5 minuti ($2,06 \pm 0,01$ mg/g); il prolungamento a 15 minuti non ha determinato un ulteriore incremento. Il contenuto della frazione rutina/iperoside nelle foglie GoldRush ha mostrato un incremento più evidente con l'intensificazione del trattamento, raggiungendo il massimo al 100% per 15 minuti ($3,93 \pm 0,01$ mg/g), indicando che il recupero di questi flavonoli glicosilati beneficia sia dell'aumento dell'energia ultrasonica, sia del prolungamento del trattamento.

La quercitrina non ha evidenziato differenze statisticamente significative tra le diverse condizioni di estrazione nella GWL, con valori complessivamente compresi tra 1,40 e 1,49 mg/g. Diversamente, nelle foglie GRL la quercitrina ha mostrato un marcato incremento passando dal 20% al 60% di ampiezza, mentre non sono state osservate differenze significative aumentando al 100%. Tale andamento suggerisce che il recupero di questo flavonoide raggiunga una condizione prossima all'equilibrio estrattivo già a partire da un'ampiezza del 60%, oltre la quale ulteriori incrementi dell'energia applicata non determinano un miglioramento significativo della resa.

Nel complesso, la caratterizzazione HPLC evidenzia differenze compositive e di risposta estrattiva marcate tra le due cultivar. La GRL presenta concentrazioni superiori di florizina, acidi fenolici e glicosidi della quercetina rispetto alla GWL e mostra una maggiore risposta all'incremento dell'ampiezza e del tempo di trattamento. La GWL presenta invece variazioni più contenute e, per diversi analiti, raggiunge valori prossimi al plateau già alle condizioni intermedie. Tali risultati evidenziano come l'efficienza dell'UAE dipenda non soltanto dai

parametri operativi, ma anche dalle caratteristiche specifiche della matrice e dal contenuto quantitativo dei fitocomposti.

4.2.2 Estrazione in circolo

4.2.2.1 Impostazione dei parametri operativi del sistema in circolo

Sulla base dei risultati ottenuti durante l'ottimizzazione batch, per le successive prove sulle foglie di melo è stata selezionata, per entrambe le cultivar, la condizione caratterizzata da un'ampiezza ultrasonica del 100% e da un tempo di estrazione di 15 minuti. Tale scelta è risultata chiaramente necessaria per la cultivar GRL, per la quale questa combinazione di condizioni ha evidenziato le prestazioni migliori per tutti i parametri analizzati, ad eccezione della floretina. Per la cultivar GWL, la condizione al 100% per 15 minuti ha garantito un profilo estrattivo ottimale, con valori elevati di attività antiossidante e concentrazioni dei principali composti fenolici, sebbene per floretina, acido ferulico e la sommatoria di rutina e iperoside non sia risultata la condizione statisticamente migliore.

Sulla base dei risultati ottenuti durante l'ottimizzazione del sistema di estrazione in circolo applicato alle foglie di vite rossa, è stato osservato che la portata di circolo esercitava un'influenza limitata sulla resa estrattiva della maggior parte dei composti bioattivi. In particolare, il confronto tra 40 e 140 mL/min non aveva evidenziato differenze sostanziali nel contenuto di polifenoli totali, nel profilo cromatografico dei principali composti fenolici e nell'attività antiossidante degli estratti, indicando che la variazione del flusso rappresentava una variabile secondaria rispetto al tempo complessivo di processo. Alla luce di tali risultati, nelle successive prove condotte sulle foglie di melo si è scelto di mantenere costante la portata di circolo a 140 mL/min, limitando l'ottimizzazione alla tempistica di estrazione.

Sono stati quindi confrontati due tempi complessivi di processo. In una prima condizione è stato mantenuto il tempo di 15 minuti, corrispondente alla durata della prova batch selezionata, al fine di verificare l'efficienza del sistema in circolo senza applicare alcuna correzione temporale. La seconda condizione è stata invece condotta per 46 minuti e 53 secondi, tempo ricalcolato secondo l'approccio proposto da (Tamminen et al., 2022), così da garantire un'esposizione cumulativa teorica agli ultrasuoni equivalente ai 15 minuti applicati nel sistema batch.

4.2.2.2 Polifenoli totali e attività antiossidante

Campione	TPC (mg GAE/g)	TPrC (mg CE/g)	DPPH (mg TE/g)	FRAP (mg TE/g)
GWL_46_140	29,2±2,3a	0,857±0,021b	62,0±1,0	54,6±5,2a
GWL_15_140	32,1±2,4a	0,983±0,016a	63,3±3,5	50,9±5,1b
GRL_46_140	24,8±2,7b	1,92±0,10b	46,6±0,6b	40,2±5,8
GRL_15_140	38,2±1,1a	2,21±0,08a	71,0±1,9a	47,6±4,6

Tabella 18. Caratterizzazione della componente polifenolica e attività antiossidante nei diversi estratti. I risultati sono riportati come media $\pm$ deviazione standard. Per ogni varietà di mela, i valori significativamente più elevati sono evidenziati in **grassetto**. All'interno di ciascuna colonna e per ogni varietà di mela, lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i campioni ($p < 0,05$), mentre valori contrassegnati dalla stessa lettera non differiscono significativamente.

Polifenoli totali

Nella cultivar GWL, il contenuto di polifenoli totali degli estratti ottenuti mediante il sistema in circolo è risultato pari a $29,2 \pm 2,3$ e $32,1 \pm 2,4$ mg GAE/g di sostanza tal quale rispettivamente per i tempi complessivi di processo di 46 minuti e 53 secondi e 15 minuti, senza evidenziare differenze statisticamente significative tra le due condizioni. L'assenza di differenze significative suggerisce che, per la cultivar GWL, il processo estrattivo raggiunga rapidamente una condizione prossima all'equilibrio e che il prolungamento del tempo complessivo di circolo non comporti un ulteriore incremento del recupero della frazione fenolica totale. Questo risultato indica che i 15 minuti di processo risultano già sufficienti a garantire un rilascio efficace dei polifenoli estraibili, senza che sia necessario effettuare correzioni nella tempistica.

Per quanto riguarda gli estratti ottenuti dalle foglie della cultivar GRL, il contenuto di polifenoli totali è risultato pari a $24,8 \pm 2,7$ e $38,2 \pm 1,1$ mg GAE/g di matrice tal quale rispettivamente per i tempi complessivi di processo di 46 minuti e 53 secondi e 15 minuti. L'analisi statistica ha evidenziato una differenza significativa tra le due condizioni, con un contenuto fenolico nettamente superiore nel trattamento più breve. Il prolungamento dell'estrazione fino a 46 minuti e 53 secondi, applicato sulla base del fattore di correzione proposto in letteratura, non risulta quindi vantaggioso per il recupero della frazione fenolica complessiva e, al contrario, è

associato a una significativa riduzione del TPC. Nelle condizioni investigate, la durata di 15 minuti risulta pertanto più favorevole per la cultivar GRL, evidenziando come l'applicazione del tempo teoricamente corretto non determini necessariamente un miglioramento dell'efficienza estrattiva nel sistema in circolo.

Proantocianidine

Il contenuto di proantocianidine, determinato mediante il saggio BL-DMAC, ha mostrato un andamento analogo nelle due cultivar. In entrambi i casi, infatti, la condizione di 15 minuti ha fornito valori significativamente superiori rispetto al tempo ricalcolato di 46 minuti e 53 secondi. Nella cultivar GWL il contenuto è risultato pari a $0,983 \pm 0,016$ mg CE/g dopo 15 minuti e a $0,857 \pm 0,021$ mg CE/g dopo 46 minuti e 53 secondi, mentre nella GRL sono stati ottenuti rispettivamente valori di $2,21 \pm 0,08$ e $1,92 \pm 0,10$ mg CE/g. L'applicazione del tempo ricalcolato non ha quindi determinato un miglioramento del recupero delle proantocianidine e, al contrario, è risultata associata a una diminuzione significativa del contenuto quantificato in entrambe le cultivar. Tale andamento risulta coerente con quanto osservato per il TPC della cultivar GRL e conferma che un'esposizione complessiva più prolungata nel sistema in circolo non comporta necessariamente un aumento dell'efficienza estrattiva. L'applicazione del tempo ricalcolato non ha quindi determinato un miglioramento del recupero delle proantocianidine, ma al contrario è risultata associata a una diminuzione significativa del contenuto quantificato in entrambe le cultivar. Tale andamento evidenzia che un'esposizione complessiva più prolungata nel sistema in circolo non comporta necessariamente un aumento dell'efficienza estrattiva. Questo comportamento risulta particolarmente interessante poiché il tempo di 46 minuti e 53 secondi era stato introdotto per riprodurre, nel sistema in circolo, un'esposizione cumulativa teorica agli ultrasuoni equivalente a quella applicata nel batch, e non come semplice prolungamento finalizzato ad aumentare la resa estrattiva. I risultati indicano pertanto che tale equivalenza teorica di esposizione non si traduce necessariamente in un maggiore recupero delle proantocianidine.

Attività antiossidante

Nelle foglie della cultivar GWL, l'attività antiossidante determinata mediante il saggio DPPH non ha mostrato differenze significative tra le due tempistiche considerate, con valori pari a

62,0 $\pm$ 1,0 e 63,3 $\pm$ 3,5 mg TE/g rispettivamente per 46 minuti e 53 secondi e 15 minuti. L'applicazione del tempo ricalcolato non sembra quindi modificare in maniera apprezzabile la capacità antiradicalica degli estratti valutata mediante questo saggio. Diversamente, per il FRAP è stata osservata una differenza significativa tra le due condizioni, con un valore maggiore a 46 minuti e 53 secondi (54,6 $\pm$ 5,2 mg TE/g) rispetto ai 15 minuti (50,9 $\pm$ 5,1 mg TE/g). Per la GWL, pertanto, la correzione del tempo di processo determina un effetto differente in funzione del metodo utilizzato per valutare l'attività antiossidante: non produce variazioni significative nel DPPH, mentre risulta associata a un moderato incremento del potere riducente misurato mediante FRAP.

Un comportamento differente è stato osservato per la cultivar GRL. Il saggio DPPH ha evidenziato un'attività antiossidante significativamente maggiore dopo 15 minuti, pari a 71,0 $\pm$ 1,9 mg TE/g, rispetto ai 46,6 $\pm$ 0,6 mg TE/g ottenuti applicando il tempo ricalcolato di 46 minuti e 53 secondi. Per il FRAP, invece, i valori sono risultati pari rispettivamente a 47,6 $\pm$ 4,6 e 40,2 $\pm$ 5,8 mg TE/g e la differenza tra le due condizioni non è risultata statisticamente significativa. Nel caso della GRL, l'applicazione della correzione temporale risulta quindi svantaggiosa per l'attività antiradicalica misurata mediante DPPH, mentre non determina una variazione statisticamente dimostrabile del potere riducente valutato mediante FRAP.

La diminuzione significativa del DPPH osservata nella GRL al tempo ricalcolato presenta inoltre un andamento coerente con quello precedentemente riscontrato per il contenuto di polifenoli totali e per le proantocianidine, anch'essi inferiori nella condizione di 46 minuti e 53 secondi.

Nel complesso, i risultati mostrano che l'applicazione del tempo ricalcolato non produce un effetto uniforme sull'attività antiossidante delle due cultivar. Nei campioni GWL i valori rimangono sostanzialmente comparabili o risultano leggermente superiori al tempo ricalcolato, mentre nei campioni GRL il trattamento di 15 minuti risulta più favorevole, in particolare per il saggio DPPH. Ciò evidenzia come la correzione teorica del tempo di esposizione agli ultrasuoni debba essere verificata sperimentalmente in funzione della matrice e della risposta analitica considerata.

4.2.2.3 Analisi cromatografica

L'analisi cromatografica HPLC degli estratti ottenuti mediante il sistema di estrazione in circolo ha consentito di valutarne il contenuto di florizina, floretina, acido ferulico, acido clorogenico, rutina e iperoside (somma) e quercitrina (**Tabella 19**).

Campione	Florizina (mg/g)	Floretina (mg/g)	Acido Ferulico (mg/g)	Acido Clorogenico (mg/g)	Rutina+ Iperoside (mg/g)	Quercitrina (mg/g)
GWL_46_140	35,1±0,0	0,427±0,001	0,442±0,000	0,216±0,020	2,11±0,01a	2,28±0,02a
GWL_15_140	34,8±0,2	0,443±0,001	0,398±0,000	0,201±0,001	2,02±0,01b	2,11±0,03b
GRL_46_140	103±0b	1,04±0,01b	1,18±0,00b	0,413±0,002	3,10±0,01b	4,38±0,03b
RL_15_140	115±0a	1,29±0,02a	1,34±0,00a	0,461±0,002	3,50±0,02a	5,06±0,01a

Tabella 19. Caratterizzazione di florizina, floretina, acidi fenolici e flavonoidi nei diversi estratti in circolo mediante procedimento RP-HPLC-DAD. Per ogni varietà di mela, i valori significativamente più elevati sono evidenziati in grassetto. All'interno di ciascuna colonna e per ogni varietà di mela, lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i campioni ($p < 0,05$), mentre valori contrassegnati dalla stessa lettera non differiscono significativamente.

Florizina e floretina

I due principali diidrocalconi hanno mostrato una risposta differente al trasferimento dal sistema batch al circolo e, soprattutto, al fattore di correzione del tempo di estrazione. Nella cultivar GWL, il contenuto di florizina è risultato sostanzialmente invariato tra le due condizioni in circolo, con valori pari a $35,1 \pm 0,0$ mg/g dopo 46 minuti e 53 secondi e $34,8 \pm 0,2$ mg/g dopo 15 minuti. Analogamente, la floretina ha mostrato concentrazioni sovrapponibili, rispettivamente pari a $0,427 \pm 0,001$ e $0,443 \pm 0,001$ mg/g. L'applicazione del fattore di correzione non sembra quindi migliorare il recupero dei diidrocalconi nei campioni GWL: la frazione estraibile viene presumibilmente recuperata in larga misura già nei primi 15 minuti, mentre ulteriori passaggi attraverso la camera ultrasonica non determinano benefici apprezzabili.

Per quanto riguarda i campioni GRL, sia la florizina sia la floretina sono risultate significativamente più elevate nella condizione di 15 minuti, raggiungendo rispettivamente 115 ± 0 e $1,29 \pm 0,02$ mg/g. Il fattore di correzione temporale non appare quindi vantaggioso e, in

particolare per questa cultivar, il prolungamento del trattamento è associato a una riduzione significativa di entrambi i diidrocalconi.

Nel complesso, per florizina e floretina la correzione del tempo complessivo di processo non apporta nessun vantaggio; ciò evidenzia come l'equivalenza teorica del tempo cumulativo di sonicazione non si traduca necessariamente in un maggiore recupero dei diidrocalconi.

Glicosidi della quercetina

I glicosidi della quercetina hanno mostrato un comportamento differente e dipendente dalla cultivar. Nella GWL, sia la frazione rutina/iperoside sia la quercitrina hanno beneficiato del prolungamento del processo. Rutina/iperoside è aumentata significativamente da $2,02 \pm 0,01$ mg/g dopo 15 minuti a $2,11 \pm 0,01$ mg/g dopo 46 minuti e 53 secondi, mentre la quercitrina è passata da $2,11 \pm 0,03$ a $2,28 \pm 0,02$ mg/g. Per questa cultivar il fattore di correzione temporale sembra quindi avere un effetto positivo soprattutto sui flavonoli glicosilati. Il maggiore numero di passaggi attraverso la camera ultrasonica e la più lunga durata complessiva del processo potrebbero favorire il progressivo rilascio di questi composti non immediatamente estraibili dalla matrice.

I campioni GRL mostrano invece un andamento opposto. Per la frazione rutina/iperoside, il valore più elevato è stato osservato dopo 15 minuti, pari a $3,50 \pm 0,02$ mg/g, rispetto ai $3,10 \pm 0,01$ mg/g ottenuti dopo 46 minuti e 53 secondi, con differenze statisticamente significative tra le due condizioni. Analogamente, la quercitrina ha raggiunto $5,06 \pm 0,01$ mg/g dopo 15 minuti e $4,38 \pm 0,03$ mg/g dopo il tempo ricalcolato.

Questi risultati evidenziano una risposta cultivar-specifica molto netta. Nella GWL il tempo corretto favorisce il recupero dei glicosidi della quercetina, mentre nella GRL il massimo viene raggiunto già dopo 15 minuti e il prolungamento del processo determina valori inferiori. Il fattore di correzione temporale risulta pertanto utile per questa classe soltanto nella GWL e non può essere trasferito indiscriminatamente tra le due cultivar.

Acidi fenolici

Anche gli acidi fenolici hanno mostrato un comportamento differente tra GWL e GRL. Nei campioni GWL, l'acido ferulico è risultato più elevato dopo il trattamento corretto, passando da $0,398 \pm 0,000$ mg/g dopo 15 minuti a $0,442 \pm 0,000$ mg/g dopo 46 minuti e 53 secondi. L'acido clorogenico ha invece mostrato valori molto simili, pari rispettivamente a $0,201 \pm 0,001$ e $0,216 \pm 0,020$ mg/g.

Per quanto riguarda i campioni GRL emerge invece una situazione opposta. Sia l'acido ferulico sia l'acido clorogenico hanno raggiunto il valore massimo nel trattamento di 15 minuti, rispettivamente pari a $1,34 \pm 0,00$ mg/g e $0,46 \pm 0,00$ mg/g, mentre dopo 46 minuti e 53 secondi le concentrazioni sono risultate pari a $1,18 \pm 0,00$ e a $0,41 \pm 0,00$ mg/g. La correzione del tempo di estrazione non risulta quindi favorevole per nessuno dei due acidi fenolici.

4.2.3 Confronto batch-circolo

Al fine di valutare complessivamente l'efficacia del trasferimento del processo dalla configurazione batch a quella in circolo, per ciascuna cultivar sono state confrontate la migliore condizione individuata nel sistema batch e quella risultata più favorevole nel sistema in circolo. Per entrambe le cultivar, il riferimento batch è rappresentato dalla condizione al 100% di ampiezza per 15 minuti. Nel sistema in circolo, invece, la condizione più favorevole è risultata differente in funzione della matrice: per la GWL è stata selezionata la prova GWL_46_140, caratterizzata dal tempo di 46 minuti e 53 secondi calcolato mediante il fattore di correzione e da una portata di 140 mL/min, mentre per la GRL la condizione migliore è risultata GRL_15_140, ovvero quella in cui non si è applicato il fattore di correzione. Le differenze percentuali riportate in **Tabella 20** (campioni GWL) e **Tabella 21** (campioni GRL) consentono di valutare quanto il passaggio alla configurazione in circolo abbia permesso di mantenere, incrementare o ridurre il recupero delle diverse frazioni rispetto alla migliore condizione batch.

	Batch (GWL_100_15)	Circolo (GWL_46_140)	Differenza (%)
TPC (mg GAE/g)	31,0±3,0	29,2±2,3	- 5,8
TPrC (mg CE/g)	0,828±0,023	0,857±0,021	+ 3,50
DPPH (mg TE/g)	51,2±0,9	62,0±1,0	+ 21,1
FRAP (mg TE/g)	42,0±3,3	54,6±5,2	+ 30,0
Florizina (mg/g)	39,7±0,10	35,1±0,0	- 11,6
Floretina (mg/g)	0,538±0,002	0,427±0,001	- 20,63
Acido ferulico (mg/g)	0,318±0,001	0,442±0,000	+ 39,0
Acido clorogenico (mg/g)	0,209±0,002	0,216±0,020	+ 3,35
Quercitrina (mg/g)	1,48±0,01	2,28±0,02	+54,1
Rutina+Iperoside (mg/g)	1,91±0,01	2,11±0,01	+10,5

Tabella 20. Confronto tra la condizione batch selezionata (GWL_100_15) e la condizione in circolo con tempo corretto e portata di 140 mL/min (GWL_46_140). I risultati sono espressi come media $\pm$ deviazione standard. La differenza percentuale è stata calcolata come [(valore in circolo – valore batch)/valore batch]×100; valori positivi indicano un incremento nel sistema in circolo, mentre valori negativi indicano una riduzione rispetto al batch.

Per quanto riguarda i campioni GWL, il confronto tra l'estrazione batch (GWL_100_15) e quella in circolo (GWL_46_140) evidenzia che l'applicazione del sistema in circolo ha consentito di ottenere, nel complesso, un estratto caratterizzato da rese comparabili o, a seconda dei parametri, addirittura maggiori rispetto al batch. Il contenuto di polifenoli totali e di proantocianidine totali presentano uno scarto contenuto (-5,8% e +8,43%, rispettivamente); per questi parametri, le due configurazioni possono quindi essere considerate sostanzialmente comparabili. Al contrario, nel sistema in circolo si osservano incrementi più marcati per l'attività antiossidante, con variazioni del +21,1% per il DPPH e +30,0% per il FRAP.

Per quanto riguarda la caratterizzazione cromatografica, i due diidrocalconi mostrano una diminuzione nel sistema in circolo (-11,6% per la florizina e -20,63% per la floretina). L'acido ferulico presenta un incremento del 39,0%, mentre l'acido clorogenico mostra valori sostanzialmente sovrapponibili tra i due sistemi, con uno scarto del 3,35%; la frazione rutina/iperoside mostra un incremento contenuto, pari al 10,5%. Degna di nota è il comportamento della quercitrina, il cui contenuto aumenta del 54,1% nel sistema in circolo. Tale incremento risulta interessante anche alla luce di quanto precedentemente osservato nelle foglie di vite, nelle quali il passaggio alla configurazione in circolo aveva determinato un

aumento di oltre 1,5 volte il suo contenuto nell'estratto ottenuto in batch. La ricorrenza di un andamento analogo (incremento molto elevato) in due diverse matrici suggerisce che la configurazione in circolo possa favorire il recupero della quercitrina, sebbene ulteriori dati sarebbero necessari per chiarire tale fenomeno.

Nel complesso, il confronto mostra quindi che il sistema in circolo consente di mantenere sostanzialmente invariato il recupero di alcune componenti, come TPC, proantocianidine e acido clorogenico, mentre per altre determina variazioni più evidenti. In particolare, l'aumento dell'attività antiossidante, dell'acido ferulico e dei derivati della quercetina indica che, per la cultivar GWL, l'estrazione in circolo può fornire un estratto più ricco in specifiche frazioni fenoliche rispetto alla configurazione batch, pur mostrando un recupero leggermente inferiore dei diidrocalconi.

	Batch (GRL_100_15)	Circolo (GRL_15_140)	Differenza (%)
TPC (mg GAE/g)	53,0±3,3	38,2±1,1	- 27,9
TPrC (mg CE/g)	2,21±0,11	2,21±0,08	nulla
DPPH (mg TE/g)	56,6±0,7	71,0±1,9	+ 25,4
FRAP (mg TE/g)	40,2±2,7	47,6±4,6	+ 18,4
Florizina (mg/g)	135±0	115±0,0	- 14,8
Floretina (mg/g)	0,860±0,029	1,29±0,02	+ 50,0
Acido ferulico (mg/g)	1,39±0,01	1,34±0,00	-3,60
Acido clorogenico (mg/g)	0,515±0,001	0,461±0,002	-10,5
Quercitrina (mg/g)	3,92±0,33	5,06±0,01	+ 29,1
Rutina+Iperoside (mg/g)	3,93±0,01	3,50±0,02	- 10,9

Tabella 21. Confronto tra la condizione batch selezionata (GRL_100_15) e la condizione in circolo con tempo non corretto e portata di 140 mL/min (GRL_15_140). I risultati sono espressi come media ± deviazione standard. La differenza percentuale è stata calcolata come [(valore in circolo – valore batch)/valore batch]×100; valori positivi indicano un incremento nel sistema in circolo, mentre valori negativi indicano una riduzione rispetto al batch.

Anche per quanto riguarda i campioni GRL (**Tabella 21**), il confronto tra l'estrazione batch (GRL_100_15) e quella in circolo (GRL_15_140) evidenzia una risposta differenziata in funzione del parametro considerato. Considerando i metodi spettrofotometrici, il TPC dell'estratto in circolo è risultato inferiore del 27,9% rispetto al batch, passando da 53,0 a 38,2 mg GAE/g. Nonostante questa riduzione, il contenuto di proantocianidine è stato

completamente mantenuto, con valori pari a 2,21 mg CE/g, mentre l'attività antiossidante è risultata addirittura superiore: il DPPH è aumentato del 25,4% e il FRAP del 18,4%. Anche in questo caso emerge quindi una dissociazione tra contenuto fenolico totale e capacità antiossidante. Questo suggerisce che il trattamento in circolo possa determinare un'estrazione qualitativamente differente rispetto al batch, nel quale il contributo delle singole classi di composti alla capacità antiossidante assume un peso maggiore rispetto alla quantità di polifenoli totali; in aggiunta sarebbe interessante considerare anche l'effetto di eventuali altre sostanze co-estratte.

La caratterizzazione cromatografica evidenzia ulteriori differenze tra i due approcci di estrazione. La florizina mostra nel sistema in circolo un contenuto inferiore rispetto all'estrazione in batch (-14,8%), mentre la floretina presenta un incremento del 50,0%. Per gli acidi fenolici si osservano invece diminuzioni particolarmente contenute, sia per l'acido ferulico (-3,60%) sia per l'acido clorogenico (-10,5%). La quercitrina mostra, al contrario, un incremento del 29,1% nel sistema in circolo. Tale risultato è in linea con quanto era stato osservato per i campioni GWL e, precedentemente, anche nelle foglie di vite, sebbene per i campioni GRL l'effetto si registra in misura minore. La frazione rutina/iperoside presenta infine una differenza pari a -10,9%, indicando valori relativamente prossimi tra le due configurazioni.

Nel complesso, per la cultivar GRL il sistema in circolo non determina una risposta uniforme rispetto al batch. Alcuni parametri, come le proantocianidine, risultano sostanzialmente sovrapponibili, mentre l'attività antiossidante, la floretina e la quercitrina mostrano valori maggiori nel sistema in circolo. Al contrario, il TPC e soprattutto la florizina risultano maggiormente recuperati mediante l'estrazione batch. Questi risultati evidenziano quindi come il trasferimento alla configurazione in circolo possa modificare selettivamente il profilo dell'estratto, con effetti differenti sulle diverse classi di composti.

5 CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi rappresenta una parte del progetto AGRIHEALTH, che nasce con l'obiettivo di utilizzare tecniche di estrazione innovative per la valorizzazione dei sottoprodotti della filiera agroalimentare.

Il primo obiettivo raggiunto è stato l'ottimizzazione di un processo di estrazione *green*, basato sull'impiego degli ultrasuoni e di un solvente food-grade, applicato in modalità batch a tre diverse matrici vegetali: foglie di vite rossa e foglie di melo delle cultivar Galiwa e Goldrush. Dai risultati ottenuti è emersa la necessità di adattare le condizioni operative alla specifica matrice: mentre per le foglie di vite sono state individuate come condizioni ottimali il 20% di ampiezza ultrasonica e 15 minuti di estrazione, per le foglie di melo è stato necessario applicare un trattamento ultrasonico più intenso (100% di ampiezza). Tale risultato conferma l'importanza di definire le condizioni estrattive più appropriate adattandole a ogni specifica matrice. La caratterizzazione degli estratti ha inoltre confermato il potenziale delle foglie, sottoprodotto della filiera del verde a seguito dei processi di potatura e diradamento, come importanti *reservoir* di bioattivi (in particolare polifenoli antiossidanti) con potenziali applicazioni in ambito sia nutraceutico che cosmetico.

A partire dalle condizioni individuate in batch, il processo è stato successivamente trasferito al sistema in circolo, valutando la possibilità di normalizzare la durata dell'estrazione rispetto al diverso approccio di estrazione, e l'influenza della portata del sistema. In particolare, oltre al tempo di estrazione selezionato in batch, è stato valutato un tempo ricalcolato di 46 minuti e 53 secondi, definito allo scopo di ottenere un'esposizione cumulativa teorica agli ultrasuoni equivalente a quella della configurazione batch. Nel complesso, i risultati evidenziano che la correzione del tempo di estrazione può rappresentare un utile criterio iniziale per il trasferimento del metodo dal batch al sistema in circolo, ma necessita di una verifica sperimentale in funzione della matrice considerata. Il tempo ricalcolato di 46 minuti e 53 secondi ha infatti fornito risultati complessivamente soddisfacenti per le foglie di vite e di melo GWL, mentre per i campioni GRL la condizione di 15 minuti è risultata più favorevole per diversi parametri. Il trasferimento al sistema in circolo richiede pertanto una specifica ottimizzazione delle condizioni operative, considerando congiuntamente parametri quali durata del trattamento, portata, temperatura e caratteristiche della matrice.

Il confronto tra le migliori condizioni rilevate per le due diverse configurazioni ha consentito di valutare la trasferibilità dell'estrazione batch al sistema in circolo.

Per quanto riguarda i parametri determinati con metodi spettrofotometrici, il contenuto di polifenoli totali è risultato sostanzialmente comparabile nei due sistemi per quanto riguarda i campioni GWL, mentre le foglie di vite e di melo GRL hanno mostrato un contenuto inferiore nel sistema in circolo. Tale andamento non si è tradotto in una parallela diminuzione dell'attività antiossidante, che è invece risultata comparabile nella vite e maggiore nelle due cultivar di melo. Questi risultati evidenziano come la valutazione dell'efficienza estrattiva non possa basarsi esclusivamente sul contenuto fenolico totale, ma debba considerare anche il profilo dei composti recuperati e le proprietà funzionali dell'estratto. Un ulteriore andamento comune alle tre matrici riguarda le proantocianidine, il cui contenuto è rimasto sostanzialmente comparabile tra sistema batch e sistema in circolo; nelle foglie di vite, una buona comparabilità tra le due configurazioni è stata osservata anche per gli antociani totali.

La caratterizzazione mediante RP-HPLC-DAD ha permesso di approfondire ulteriormente il confronto tra le due modalità di estrazione, evidenziando come il passaggio al sistema in circolo possa modificare selettivamente il profilo dell'estratto anche quando i parametri spettrofotometrici complessivi risultano comparabili. Nelle foglie di vite, nelle quali la frazione antocianica rappresenta una componente caratteristica, il profilo qualitativo delle antocianine è rimasto sostanzialmente invariato nelle due configurazioni. Inoltre, la condizione in circolo ha consentito un recupero di antociani, acidi fenolici e della frazione rutina/iperoside comparabile a quello osservato nel batch. Nelle foglie di melo, in cui i diidrocalconi florizina e floretina rappresentano la frazione caratteristica, è stato osservato un recupero leggermente inferiore della florizina nel sistema in circolo rispetto al batch, mentre la floretina ha mostrato un comportamento cultivar-specifico, con un aumento del 50% nei campioni GRL e una riduzione del 20,63% nei GWL. Anche l'acido ferulico, l'acido clorogenico e la frazione rutina/iperoside hanno mostrato, nelle foglie di melo, risultati complessivamente comparabili tra le due configurazioni.

Tra i singoli composti determinati, il trend più interessante è stato quello della quercitrina, con un recupero maggiore nel sistema in circolo per tutte le matrici analizzate (+159% nelle foglie di vite, + 54,1% in GWL e + 29,1% in GRL). La ricorrenza di tale andamento suggerisce che la configurazione in circolo possa risultare particolarmente favorevole al recupero di questo flavonolo glicosilato, sebbene il presente studio non sia stato focalizzato a individuare il meccanismo con cui si possano liberare maggiori quantità di quercitrina nel sistema in circolo.

Per concludere, i risultati ottenuti dimostrano che il sistema di estrazione assistita da ultrasuoni in circolo rappresenta una strategia promettente per il trasferimento del processo estrattivo verso configurazioni potenzialmente più adatte allo scale-up, ma evidenziano allo stesso tempo la necessità di una sua ottimizzazione specifica. Il passaggio dal batch al circolo non deve essere interpretato come una semplice trasposizione delle condizioni operative, bensì come lo sviluppo di un processo caratterizzato da dinamiche proprie, nel quale tempo di trattamento, portata, numero di passaggi, temperatura e caratteristiche della matrice devono essere valutati congiuntamente.

Parallelamente, l'ottimizzazione del processo dovrebbe essere affiancata da una valutazione della sua sostenibilità complessiva. In particolare, nei casi in cui differenti condizioni operative consentano di ottenere risultati estrattivi comparabili, l'applicazione di un'analisi di *Life Cycle Assessment* (LCA) potrebbe permettere di individuare la configurazione caratterizzata dal minore impatto ambientale, considerando non soltanto la resa estrattiva ma anche la gestione complessiva delle risorse. L'integrazione tra prestazioni estrattive, possibilità di scale-up e valutazione ambientale potrebbe quindi rappresentare il passaggio successivo per lo sviluppo di un processo UAE in circolo efficiente, riproducibile e sostenibile per la valorizzazione di sottoprodotti vegetali.

6 BIBLIOGRAFIA

- Acero, N., Manrique, J., Muñoz-Mingarro, D., Martínez Solís, I., Bosch, F., 2025. *Vitis vinifera* L. Leaves as a Source of Phenolic Compounds with Anti-Inflammatory and Antioxidant Potential. *Antioxidants* 14, 279. <https://doi.org/10.3390/antiox14030279>
- Adamcová, A., Horna, A., Šatínský, D., 2022. Determination of Phloridzin and Other Phenolic Compounds in Apple Tree Leaves, Bark, and Buds Using Liquid Chromatography with Multilayered Column Technology and Evaluation of the Total Antioxidant Activity. *Pharmaceuticals* 15, 244. <https://doi.org/10.3390/ph15020244>
- Ali, M., Benfante, V., Stefano, A., Yezzi, A., Di Raimondo, D., Tuttolomondo, A., Comelli, A., 2023. Anti-Arthritic and Anti-Cancer Activities of Polyphenols: A Review of the Most Recent In Vitro Assays. *Life* 13, 361. <https://doi.org/10.3390/life13020361>
- Aliaño-González, M.J., Gabaston, J., Ortiz-Somovilla, V., Cantos-Villar, E., 2022. Wood Waste from Fruit Trees: Biomolecules and Their Applications in Agri-Food Industry. *Biomolecules* 12, 238. <https://doi.org/10.3390/biom12020238>
- Al-Saif, A.M., Abdel-Aziz, H.F., Khalifa, S.M., Elnaggar, I.A., Abd El-wahed, A.E.N., Farouk, M.H., Hamdy, A.E., 2023. Pruning Boosts Growth, Yield, and Fruit Quality of Old Valencia Orange Trees: A Field Study. *Agriculture* 13, 1720. <https://doi.org/10.3390/agriculture13091720>
- Arshad, M.T., Saddique, I., Maqsood, S., Naveed, F., Ikram, A., Tufail, T., Gnedeka, K.T., 2025. Sustainable Methods for Extracting Antioxidants From Vegetable and Fruit Waste (VFW). *Journal of Food Science* 90, e70596. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.70596>
- Atzei, D., Fermo, P., Vecchi, R., Fantauzzi, M., Comite, V., Valli, G., Cocco, F., Rossi, A., 2019. Composizione e origine del PM 2.5 nelle campagne mediterranee. *Environmental Pollution* 246, 294–302. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.012>
- Azhdari, M., Zilae, M., Karandish, M., Hosseini, S.A., Mansoori, A., Zendehdel, M., Khodarahpour, S., 2020. Red vine leaf extract (AS 195) can improve some signs and symptoms of chronic venous insufficiency, a systematic review. *Phytother Res* 34, 2577–2585. <https://doi.org/10.1002/ptr.6705>
- Banjanin, T., Uslu, N., Vasic, Z.R., Özcan, M.M., 2021. Effect of grape varieties on bioactive properties, phenolic composition, and mineral contents of different grape-vine leaves.

- Journal of Food Processing and Preservation 45, e15159.
<https://doi.org/10.1111/jfpp.15159>
- Ben-Othman, S., Kaldmäe, H., Rätsep, R., Bleive, U., Aluvee, A., Rinken, T., 2021. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phloretin and Other Phenolic Compounds from Apple Tree Leaves (*Malus domestica* Borkh.) and Comparison of Different Cultivars from Estonia. *Antioxidants* 10, 189.
<https://doi.org/10.3390/antiox10020189>
- Boudalia, S., Symeon, G.K., Dotas, V., Gueboudji, Z., Kouadri, I., Sehili, B., Terfa, M.T., Smeti, S., Gueroui, Y., Bousbia, A., 2026. The Valorization of Agrifood Byproducts and Waste to Advance the Sustainable Development Goals: Current State and New Perspectives. *Sustainability* 18, 2165. <https://doi.org/10.3390/su18052165>
- Câmara, J.S., Locatelli, M., Pereira, J.A.M., Oliveira, H., Arlorio, M., Fernandes, I., Perestrelo, R., Freitas, V., Bordiga, M., 2022. Behind the Scenes of Anthocyanins—From the Health Benefits to Potential Applications in Food, Pharmaceutical and Cosmetic Fields. *Nutrients* 14, 5133. <https://doi.org/10.3390/nu14235133>
- Carreira-Casais, A., Carpena, M., Pereira, A.G., Chamorro, F., Soria-Lopez, A., Perez, P.G., Otero, P., Cao, H., Xiao, J., Simal-Gandara, J., Prieto, M.A., 2021. Critical Variables Influencing the Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Compounds—A Review. *Chemistry Proceedings* 5, 50. <https://doi.org/10.3390/CSAC2021-10562>
- Carrera, C., Ruiz-Rodríguez, A., Palma, M., Barroso, C.G., 2012. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica Chimica Acta*, A selection of papers presented at In Vino Analytica Scientia 732, 100–104.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.032>
- Cataldo, M.F., Marcu, M.V., Iordache, E., Zimbalatti, G., Proto, A.R., Borz, S.A., 2022. Performance of Forwarding Operations in Biomass Recovery from Apple Orchards. *Small-scale Forestry* 21, 349–367. <https://doi.org/10.1007/s11842-022-09500-4>
- Cauduro V.H., Gohlke G., da Silva N.W., Cruz A. G., Flores E. M.M., 2025. A review on scale-up approaches for ultrasound-assisted extraction of natural products. *Current Opinion in Chemical Engineering* 48, 101120.
<https://doi.org/10.1016/j.coche.2025.101120>
- Cazier, E.A., Pham, T.-N., Cossus, L., Abila, M., Ilc, T., Lawrence, P., 2024. Exploring industrial lignocellulosic waste: Sources, types, and potential as high-value molecules. *Waste Management* 188, 11–38. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2024.07.029>

- Cendrowski, A., Jakubowska, Z., Przybył, J.L., 2024. Apple Tree Leaves (*Malus domestica* Borkh) as a Valuable Source of Polyphenolic Compounds with a High Antioxidant Capacity. *Applied Sciences* 14, 3252. <https://doi.org/10.3390/app14083252>
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., Abert-Vian, M., 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason Sonochem* 34, 540–560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Demesa, A.G., Saavala, S., Pöysä, M., Koironen, T., 2024. Overview and Toxicity Assessment of Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Ingredients from Plants. *Foods* 13, 3066. <https://doi.org/10.3390/foods13193066>
- Dhyani, P., Sati, P., Chand Attri, D., Sharma, E., Soni, R., Sharifi-Rad, J., Calina, D., 2025. Phloridzin as a Nutraceutical for Cancer Prevention and Therapy: A Comprehensive Review of Its Mechanisms, Bioavailability Challenges and Future Applications. *Food Sci Nutr* 13, e70744. <https://doi.org/10.1002/fsn3.70744>
- Djemaa-Landri, K., Hamri-Zeghichi, S., Valls, J., Cluzet, S., Tristan, R., Boulahbal, N., Kadri, N., Madani, K., 2020. Phenolic content and antioxidant activities of *Vitis vinifera* L. leaf extracts obtained by conventional solvent and microwave-assisted extractions. *Food Measure* 14, 3551–3564. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00596-w>
- Duan, Y., Wang, S., Zhang, X., Zhang, H., Wang, H., Chen, S., 2025. Mechanistic insight into the frequency-dependent ultrasound-assisted extraction of *Rosa laevigata* Polysaccharides: Structure, antioxidant activity, and process optimization. *Ultrason Sonochem* 121, 107577. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2025.107577>
- Esposito, T., Paolucci, M., Sansone, F., Mencherini, T., Pacifico, S., Volpe, M.G., 2021. Exploitation and Valorization of Agro-Food Wastes from Grape Harvesting: Production, Characterization of MAE-Extracts from *Vitis vinifera* Leaves and Stabilization in Microparticulate Powder Form. *Applied Sciences* 11, 5827. <https://doi.org/10.3390/app11135827>
- Florindo, T., Ferraz, A.I., Rodrigues, A.C., Nunes, L.J.R., 2022. Residual Biomass Recovery in the Wine Sector: Creation of Value Chains for Vine Pruning. *Agriculture* 12, 670. <https://doi.org/10.3390/agriculture12050670>
- Gaharwar, S.S., Kumar, A., Rathod, K.S., Shinde, S.V., 2023. Valorizzazione delle bucce di *Malus domestica* L. (mela): un caso di studio di bioeconomia circolare. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 36, 101301. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2023.101301>

- Galanakis, C.M., 2012. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology* 26, 68–87. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.03.003>
- Ghafoor, K., Hui, T., Choi, Y.H., 2011. Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Total Anthocyanins from Grape Peel Using Response Surface Methodology. *Journal of Food Biochemistry* 35, 735–746. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2010.00413.x>
- González-Centeno, M.R., Knoerzer, K., Sabarez, H., Simal, S., Rosselló, C., Femenia, A., 2014. Effetto della frequenza acustica e della densità di potenza sull'estrazione acquosa assistita da ultrasuoni delle vinacce (*Vitis vinifera* L.) – Un approccio basato sulla superficie di risposta. *Ultrasonics Sonochemistry, AOSS* 21, 2176–2184. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.01.021>
- González-Silva, N., Nolasco-González, Y., Aguilar-Hernández, G., Sáyago-Ayerdi, S.G., Villagrán, Z., Acosta, J.L., Montalvo-González, E., Anaya-Esparza, L.M., 2022. Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from *Psidium cattleianum* Leaves: Optimization Using the Response Surface Methodology. *Molecules* 27, 3557. <https://doi.org/10.3390/molecules27113557>
- Gosch, C., Halbwirth, H., Stich, K., 2010. Phloridzin: Biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants. *Phytochemistry* 71, 838–843. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.03.003>
- Goufo, P., Singh, R.K., Cortez, I., 2020. A Reference List of Phenolic Compounds (Including Stilbenes) in Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Roots, Woods, Canes, Stems, and Leaves. *Antioxidants* 9, 398. <https://doi.org/10.3390/antiox9050398>
- Guerreiro, C., Larssen, S., Leeuw, F. de, Foltescu, V., 2011. Air quality in Europe - 2011 report.
- Hamam, M., Chinnici, G., Di Vita, G., Pappalardo, G., Pecorino, B., Maesano, G., D'Amico, M., 2021. Circular Economy Models in Agro-Food Systems: A Review. *Sustainability* 13, 3453. <https://doi.org/10.3390/su13063453>
- Hayta, M., İşçimen, E.M., 2018. Antidiabetic, Antihypertensive and Antioxidant Properties of Grapevine Leaf Extracts Obtained by Ultrasound, Microwave Assisted, and Classical Solvent Extraction. *Erwerbs-Obstbau* 60, 79–85. <https://doi.org/10.1007/s10341-018-0406-6>
- Iuga, M., Mironeasa, S., 2020. Potential of grape byproducts as functional ingredients in baked goods and pasta. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19, 2473–2505. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12597>

- Kalsi, B., Singh, S., Alam, M., 2022. Influence of ultrasound processing on the quality of guava juice. *Journal of Food Process Engineering* 46. <https://doi.org/10.1111/jfpe.14163>
- Khadhraoui, B., Ummat, V., Tiwari, B.K., Fabiano-Tixier, A.S., Chemat, F., 2021. Review of ultrasound combinations with hybrid and innovative techniques for extraction and processing of food and natural products. *Ultrasonics Sonochemistry* 76, 105625. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105625>
- Kim, M., Jo, S., Woo, J., Jeon, E.-C., 2021. Studies on characteristics of fine particulate matter emissions from agricultural residue combustion. *Energy & Environment* 32, 1361–1377. <https://doi.org/10.1177/0958305X21997994>
- Kumar, K., Srivastav, S., Sharanagat, V.S., 2021. Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry* 70, 105325. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325>
- Labanca, F., Faraone, I., Nolè, M.R., Hornedo-Ortega, R., Russo, D., García-Parrilla, M.C., Chiummiento, L., Bonomo, M.G., Milella, L., 2020. New Insights into the Exploitation of *Vitis vinifera* L. cv. Aglianico Leaf Extracts for Nutraceutical Purposes. *Antioxidants (Basel)* 9, 708. <https://doi.org/10.3390/antiox9080708>
- Lin, Y.-S., Chen, H.-J., Huang, J.-P., Lee, P.-C., Tsai, C.-R., Hsu, T.-F., Huang, W.-Y., 2017. Kinetics of Tyrosinase Inhibitory Activity Using *Vitis vinifera* Leaf Extracts. *BioMed Research International* 2017, 5232680. <https://doi.org/10.1155/2017/5232680>
- Lu, W.-D., Li, B.-Y., Yu, F., Cai, Q., Zhang, Z., Yin, M., Gao, H.-Q., 2012. Quantitative proteomics study on the protective mechanism of phlorizin on hepatic damage in diabetic db/db mice. *Molecular Medicine Reports* 5, 1285–1294. <https://doi.org/10.3892/mmr.2012.803>
- Luque-Alcaraz, A.G., Hernández-Téllez, C.N., Graciano-Verdugo, A.Z., Toledo-Guillén, A.R., Hernández-Abril, P.A., 2024. Exploring antioxidant potential and phenolic compound extraction from *Vitis vinifera* L. using ultrasound-assisted extraction. *Green Processing and Synthesis* 13. <https://doi.org/10.1515/gps-2023-0141>
- Medina-Torres, N., Ayora, T., Andrews, H., Sanchez, A., Pacheco López, N., 2017. Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy* 7, 47. <https://doi.org/10.3390/agronomy7030047>
- Mehmet Gülcü, Kashif Ghafoor, Fahad Y. Al-Juhaimi, Mehmet Musa Özcan, Nurhan Uslu, Elsayed E. Babiker, Isam A. Mohamed Ahmed, Ichsan Ulil Azmi, 2020. Effetto delle varietà di uva (*Vitis vinifera* L.) e dei periodi di raccolta sui composti bioattivi,

- sull'attività antiossidante, sulla composizione fenolica, sul contenuto di minerali e sulla composizione degli acidi grassi delle foglie e degli oli di Vitis - Gülcü - 2020 - Journal of Food Processing and Preservation - Wiley Online Library [WWW Document]. URL https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfpp.14890?utm_source=chatgpt.com (accessed 7.20.26).
- Mohan, P.K., Adarsh Krishna, T.P., Stephy, P.P., Ajeesh Krishna, T.P., Thirumurugan, A., Annamalai, A., 2026. Lo stigmasterolo come potenziale agente antiurolitiasico: valutazione *in vitro* e approfondimenti computazionali sui bersagli renali. *Systems Ethnopharmacology and Sustainable Bioresources* 1, 100002. <https://doi.org/10.1016/j.sesb.2026.100002>
- Moldovan, M.L., Carpa, R., Fizeșan, I., Vlase, L., Bogdan, C., Iurian, S.M., Benedec, D., Pop, A., 2020. Phytochemical Profile and Biological Activities of Tendrils and Leaves Extracts from a Variety of Vitis vinifera L. *Antioxidants (Basel)* 9, 373. <https://doi.org/10.3390/antiox9050373>
- Muhamad Insanu, Hana Karimah, Hegar Pramastya, Irda Fidrianny, 2021. Phytochemical Compounds and Pharmacological Activities of Vitis vinifera L.: An Updated Review. *Biointerface Res Appl Chem* 11, 13829–13849. <https://doi.org/10.33263/BRIAC115.1382913849>
- Ni, T., Zhang, Shuai, Rao, J., Zhao, J., Huang, H., Liu, Ying, Ding, Y., Liu, Yaqian, Ma, Y., Zhang, Shoujun, Gao, Y., Shen, L., Ding, C., Sun, Y., 2024. Phlorizin, an Important Glucoside: Research Progress on Its Biological Activity and Mechanism. *Molecules* 29, 741. <https://doi.org/10.3390/molecules29030741>
- Panda, D., Manickam, S., 2019. Cavitation Technology—The Future of Greener Extraction Method: A Review on the Extraction of Natural Products and Process Intensification Mechanism and Perspectives. *Applied Sciences* 9, 766. <https://doi.org/10.3390/app9040766>
- Panzella, L., Moccia, F., Nasti, R., Marzorati, S., Verotta, L., Napolitano, A., 2020. Bioactive Phenolic Compounds From Agri-Food Wastes: An Update on Green and Sustainable Extraction Methodologies. *Front Nutr* 7, 60. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00060>
- Parambil-Peedika, A., Laing, A., Gathala, M.K., Cariappa, A.A.G., Krishna, V.V., 2025. Agroecological impacts of crop residue burning: A qualitative systematic review of direct and inferred evidence. *Science of The Total Environment* 994, 179963. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2025.179963>

- Perra, M., Cuenca-Lombraña, A., Bacchetta, G., Manca, M.L., Manconi, M., Maroun, R.G., Muntoni, A., Tuberoso, C.I.G., Gil, K.A., De Gioannis, G., 2022. Combining Different Approaches for Grape Pomace Valorization: Polyphenols Extraction and Composting of the Exhausted Biomass. *Sustainability* 14, 10690. <https://doi.org/10.3390/su141710690>
- Petigny, L., Périno-Issartier, S., Wajsman, J., Chemat, F., 2013. Batch and Continuous Ultrasound Assisted Extraction of Boldo Leaves (*Peumus boldus* Mol.). *Int J Mol Sci* 14, 5750–5764. <https://doi.org/10.3390/ijms14035750>
- Preut, A., Kopka, J.-P., Clausen, U., 2021. Digital Twins for the Circular Economy. *Sustainability* 13, 10467. <https://doi.org/10.3390/su131810467>
- Provenzano, M., Pacchera, F., Silvestri, C., Ruggieri, A., 2024. From Vineyard to Value: A Circular Economy Approach to Viticulture Waste. *Resources* 13, 172. <https://doi.org/10.3390/resources13120172>
- Rashid, R., Mohd Wani, S., Manzoor, S., Masoodi, F.A., Masarat Dar, M., 2023. Green extraction of bioactive compounds from apple pomace by ultrasound assisted natural deep eutectic solvent extraction: Optimisation, comparison and bioactivity. *Food Chemistry* 398, 133871. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133871>
- Raza, M.H., Abid, M., Faisal, M., Yan, T., Akhtar, S., Adnan, K.M.M., 2022. Environmental and Health Impacts of Crop Residue Burning: Scope of Sustainable Crop Residue Management Practices. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19, 4753. <https://doi.org/10.3390/ijerph19084753>
- Saleh, I.A., Vinatoru, M., Mason, T.J., Abdel-Azim, N.S., Aboutabl, E.A., Hammouda, F.M., 2016. Un possibile meccanismo generale per l'estrazione assistita da ultrasuoni (UAE) suggerito dai risultati dell'UAE dell'acido clorogenico dalle foglie di *Cynara scolymus* L. (carciofo). *Ultrasonics Sonochemistry* 31, 330–336. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.01.002>
- Shen, L., Pang, S., Zhong, M., Sun, Y., Qayum, A., Liu, Y., Rashid, A., Xu, B., Liang, Q., Ma, H., Ren, X., 2023. A comprehensive review of ultrasonic assisted extraction (UAE) for bioactive components: Principles, advantages, equipment, and combined technologies. *Ultrason Sonochem* 101, 106646. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106646>
- Sidhu, R.S., Bound, S.A., Hunt, I., 2022. Crop Load and Thinning Methods Impact Yield, Nutrient Content, Fruit Quality, and Physiological Disorders in 'Scilate' Apples. *Agronomy* 12, 1989. <https://doi.org/10.3390/agronomy12091989>

- Silva, S. de O., Mafra, A.K.C., Pelissari, F.M., Rodrigues de Lemos, L., Molina, G., 2025. Biotechnology in Agro-Industry: Valorization of Agricultural Wastes, By-Products and Sustainable Practices. *Microorganisms* 13, 1789. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13081789>
- Singh, J., Rasane, P., Kaur, R., Kaur, H., Garg, R., Kaur, S., Ercisli, S., Choudhary, R., Skrovankova, S., Mlcek, J., 2023. Valorization of grape (*Vitis vinifera*) leaves for bioactive compounds: novel green extraction technologies and food-pharma applications. *Front. Chem.* 11. <https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1290619>
- Stücker, M., Rabe, E., Meyer, K., Ottillinger, B., Schütt, T., 2019. Therapeutic approach to chronic venous insufficiency - clinical benefits of red-vine-leaf-extract AS 195 (Antistax®). *Pharmazie* 74, 193–200. <https://doi.org/10.1691/ph.2019.9326>
- Sulaiman Phd, Ir.Ts.A.Z., 2016. EFFECT OF TEMPERATURE AND SONICATION ON THE EXTRACTION OF GALLIC ACID FROM *LABISIA PUMILA* (KACIP FATIMAH). *Journal of Engineering and Applied Sciences* 11, 2193–2198.
- Sun, H., Lin, Q., Wei, W., Qin, G., 2018. Ultrasound-assisted extraction of resveratrol from grape leaves and its purification on mesoporous carbon. *Food Sci Biotechnol* 27, 1353–1359. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0385-2>
- Sun, S., Hao, M., Ding, C., Zhang, J., Ding, Q., Zhang, Y., Zhao, Y., Liu, W., 2022. SF/PVP nanofiber wound dressings loaded with phlorizin: preparation, characterization, in vivo and in vitro evaluation. *Colloids Surf B Biointerfaces* 217, 112692. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112692>
- Tacchini, M., Burlini, I., Maresca, I., Grandini, A., Bernardi, T., Guerrini, A., Lerin, L., Sacchetti, G., 2019. Polyphenols From *Vitis vinifera* Lambrusco By-Products (Leaves From Pruning): Extraction Parameters Evaluation Through Design of Experiment. *Natural Product Communications* 14, 1934578X19862906. <https://doi.org/10.1177/1934578X19862906>
- Tamminen, J., Holappa, J., Vladimirovich Gradov, D., Koiranen, T., 2022. Scaling up continuous ultrasound-assisted extractor for plant extracts by using spinach leaves as a test material. *Ultrason Sonochem* 90, 106171. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106171>
- Teskey, G., Abraham, R., Cao, R., Gyurjian, K., Islamoglu, H., Lucero, M., Martinez, A., Paredes, E., Salaiz, O., Robinson, B., Venketaraman, V., 2018. Chapter Five - Glutathione as a Marker for Human Disease, in: Makowski, G.S. (Ed.), *Advances in*

- Clinical Chemistry, *Advances in Clinical Chemistry*. Elsevier, pp. 141–159. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2018.07.004>
- Tiwari, B.K., 2015. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry, Green Extraction Techniques* 71, 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.013>
- Troilo, M., Difonzo, G., Paradiso, V.M., Summo, C., Caponio, F., 2021. Bioactive Compounds from Vine Shoots, Grape Stalks, and Wine Lees: Their Potential Use in Agro-Food Chains. *Foods* 10, 342. <https://doi.org/10.3390/foods10020342>
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D., 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, Food Innovation: Emerging Science, Technologies and Applications (FIESTA) Conference* 9, 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.04.014>
- Wang, L., Li, Z.-W., Zhang, W., Xu, R., Gao, F., Liu, Y.-F., Li, Y.-J., 2014. Synthesis, Crystal Structure, and Biological Evaluation of a Series of Phloretin Derivatives. *Molecules* 19, 16447–16457. <https://doi.org/10.3390/molecules191016447>
- Wang, L., Weller, C.L., 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology* 17, 300–312. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.12.004>
- Win, N.M., Park, J., Kim, S., Lee, Y., Do, V.G., Kwon, J.-G., Kwon, S.-I., Yoo, J., Kang, I.-K., Kweon, H.-J., 2025. Effects of Mechanical Pruning on Tree Growth, Yield, and Fruit Quality of ‘Arisoo’ Apple Trees. *Agriculture* 15, 2118. <https://doi.org/10.3390/agriculture15202118>
- Wojdyło, A., Nowicka, P., Turkiewicz, I.P., Tkacz, K., Hernandez, F., 2021. Comparison of bioactive compounds and health promoting properties of fruits and leaves of apple, pear and quince. *Sci Rep* 11, 20253. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99293-x>
- Zannella, C., Giugliano, R., Chianese, A., Buonocore, C., Vitale, G.A., Sanna, G., Sarno, F., Manzin, A., Nebbioso, A., Termolino, P., Altucci, L., Galdiero, M., de Pascale, D., Franci, G., 2021. Antiviral Activity of *Vitis vinifera* Leaf Extract against SARS-CoV-2 and HSV-1. *Viruses* 13, 1263. <https://doi.org/10.3390/v13071263>
- Zhao, P., Zhang, Y., Deng, H., Meng, Y., 2022. Antibacterial mechanism of apple phloretin on physiological and morphological properties of *Listeria monocytogenes*. *Food Sci. Technol* 42, e55120. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/fst.55120>

