Rendiconti
Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL
Memorie di Scienze Fisiche e Naturali
125° (2007), Vol. XXXI, P. II, t. I, pp. 197-211

ENRICO MINCIONE * – ROBERTA BERNINI *

Produzione di molecole bioattive da residui agroindustriali

Riassunto – I residui agroindustriali costituiscono un materiale difficoltoso da smaltire per il loro contenuto in sostanze fenoliche che li rendono batteriostatici e citotossici e pertanto inquinanti per le acque e I terreni dove vengono sversati. Il gruppo di ricerca interdisciplinare del Dipartimento ABAC dell'Università degli studi della Tuscia formato da chimici organici, microbiologi, biochimici del suolo ha messo a punto una metodologia utile anche dal punto di vista tecnologico che permette la separazione della componente fenolica, in modo che il residuo defenolato possa essere trattato microbiologicamente per ottenere additivi alimentari, zootecnici, enzimi industriali, biogas. A sua volta dalla componente fenolica vengono isolate con tecnologie chimico-fisiche innovative che ne permettono il frazionamento e la purificazione, molecole ad alto valore aggiunto e di interesse per la nutraceutica, cosmetica, dietetica. Le molecole più abbondanti recuperate sono infine convertite tramite metodologie ossidative di Green Chemistry in nuovi composti dei quali sono state testate le attività biologiche.

Parole chiave: residui agroindustriali, recupero, valorizzazione chimica, bioattività.

Abstract – Agroindustrial wastes are toxic materials for their content of phenolic compounds. They usually are released in the soil with the effect to cause the pollution not only of the same soil but also of the waters. Object of our research are the agroindustrial wastes containing phenolic compounds deriving from the production of olive oil from the elaboration of the Anarcardium occidentale and the Citrus fruit and from the wine industry. In this paper we report our results about new procedures to extract these compounds and some example of their chemical valorization to obtain new bioactive compounds.

* Università degli Studi della Tuscia di Viterbo, Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica, Via San Camillo De Lellis – 01100 Viterbo. E-mail: mincione@unitus.it

Il gruppo di ricerca di Chimica delle Sostanze Organiche Naturali che opera presso il Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica dell'Università della Tuscia di Viterbo si occupa da circa quindici anni della messa a punto di metodologie ossidative ecocompatibili utili alla conversione di molecole naturali facilmente disponibili o estraibili da fonti naturali in fine-chemicals e molecole bioattive [1]. Negli ultimi tempi, vista l'esperienza maturata nelle metodologie ossidative di molteplici classi di sostanze naturali, l'attività di ricerca si è focalizzata su un problema specifico, quello dei reflui e residui agroindustriali con l'obiettivo di trasformarli in una risorsa per l'industria farmaceutica, dietetica e nutraceutica e per l'alimentazione zootecnica. L'impegno di ricerca ha previsto, pertanto, sia la messa a punto di opportune metodologie di estrazione e purificazione delle molecole naturali contenute nei reflui, sia la loro conversione in fine-chemicals e/o composti bioattivi con metodologie chimiche ecocompatibili [2].

I reflui e residui oggetto di tale attività di ricerca provengono dal settore dell'elaiotecnica, della viticoltura, della lavorazione degli agrumi e del pomodoro, della produzione della colza, del girasole, del frumento, dalla produzione della carta (lignocellulose). In tali residui la componente fenolica e polifenolica, citotossica e batteriostatica, rende il refluo inquinante e difficile da smaltire. Pertanto la separazione della componente fenolica dai reflui è vantaggiosa non solo per il recupero di molecole che possono essere riutilizzate come materie prime ma anche per un successivo arricchimento proteico via trattamento microbiologico della parte defenolata per ottenere additivi alimentari in zootecnia, enzimi industriali e biogas. In fig. 1 sono riportati alcuni dei principali composti fenolici presenti in tali reflui.

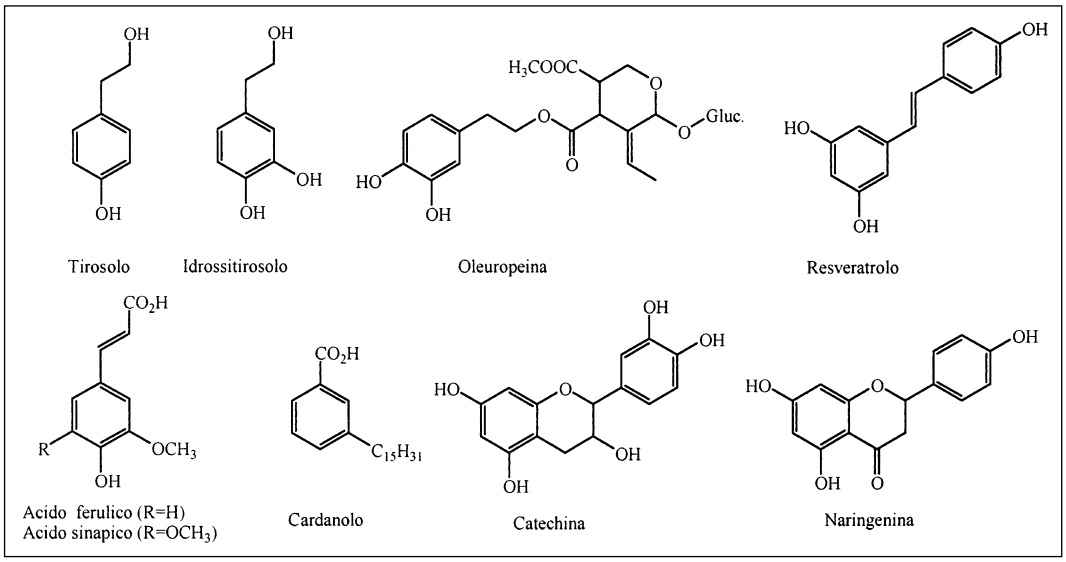


Fig. 1.

Simposi internazionali sull'utilizzazione di tali estratti dei residui vegetali come nutraceutici ed in cosmetologia sono tenuti periodicamente. Un esempio è Vita Food International (Ginevra) dove è stato riscontrato un enorme interesse economico per l'utilizzo di tali prodotti vegetali rinnovabili. Tra le società nazionali ed internazionali interessate ad acquisire la commercializzazione degli estratti grezzi di polifenoli vi sono Arista, Jan Dekker, Natural Oils, Lipo, Nikko, Balestrino, Cosmetochem, Vevy, Sederma, Provital, Biomedical, Grau Aromatics, Biophil, Indena. Il rapporto 3621 della Frost & Sullivan su vitamine e integratori minerali mette in evidenza la necessità espressa dai medici di attivare forme di prevenzione per malattie come l'infarto, i disturbi cardiaci e alcune forme tumorali associata ad uno stile di vita salutare. La stessa iniziativa dei governi è rivolta alla promozione dell'automedicazione e prevenzione piuttosto che la cura.

Secondo le stime nel 1998 il mercato delle vitamine e dei minerali in termini di valore era pari a 1.65 mld di dollari ma per il periodo preso in esame, che arriva sino al 2005, si è avuto un tasso di crescita dei ricavi pari al 4%. Anche se vitamine e minerali non si configurano come portentosi rimedi per la salute, è cresciuta la consapevolezza dei vantaggi legati alla loro assunzione in una società sensibile ai problemi della salute come quella europea. Di conseguenza si è ritenuto che i ricavi abbiano raggiunto i 2.17 mld di dollari entro la fine del periodo in esame. Tra le innovazioni c'è da sottolineare le nuove modalità di vendita di tali prodotti, non più solo in farmacia. Per quanto riguarda le innovazioni nella creazione di nuovi prodotti mirati ad una vita sana, l'idea di total package, che comprende vitamine e minerali, è stata concepita in base alle esigenze dei consumatori. Tali prodotti complessi possono contenere 20 e più ingredienti singoli. In Europa ha ottenuto un grande successo «centrum» da parte della Whitehall. La tendenza a proporre prodotti creati in base a formulazioni speciali e destinati a nicchie di mercato continuerà. Le formulazioni potranno contenere non soltanto vitamine e minerali ma anche integratori e prodotti fitofarmaceutici. La Boehringer Ingelheim propone preparati simili nella linea Pharmathon Natural Health Line. Le capsule Pharmaton contengono diverse vitamine e tracce di minerali mescolati al gingseng. I tre maggiori produttori, Roche, E. Merck e SKB, hanno incrementato le proprie quote di mercato e migliorato le proprie posizioni attraverso acquisizioni. Tali imprese hanno dato il via a strategie di questo tipo al fine di coprire il mercato europeo e si prevede che i maggiori produttori continueranno su questa linea , al fine di sostenere la propria posizione di mercato.

I progetti in questione sull'utilizzo dei residui e reflui sono di interesse, come si è detto, anche per l'industria zootecnica in quanto propongono una risposta innovativa alla necessità del settore di reperire fonti proteiche alternative alle farine animali. Ecco che l'arricchimento di proteine per via fermentativa di residui e sottoprodotti del settore agroalimentare sembra una strategia percorribile ed attuabile [3].

Specificatamente le moderne tecnologie di estrazione degli oli di oliva modificano la composizione delle sanse vergini (ad esempio aumentandone fortemente

l'umidità) ponendo problemi di varia natura circa la loro utilizzazione economica. Per di più, l'interesse dei consumatori verso l'olio di sansa ed il mercato connesso sono in continua riduzione. Emerge, quindi, fortemente la necessità di individuare per le sanse vergini vie alternative di utilizzo e valorizzazione. Riguardo ad un impiego zootecnico, sono già state condotte ricerche: vari studi hanno valutato l'utilizzazione diretta di sanse vergini provenienti da paste integrali di olive, ma denocciolate dopo il processo di estrazione: i risultati, seppur talvolta preliminari, sembrano controversi e spesso si fa riferimento all'elevato contenuto in fibra delle sanse, che potrebbe essere anche conseguenza di una denocciolatura non efficiente e al loro basso valore nutrizionale (proteico in particolare). L'estrazione meccanica dell'olio di oliva da paste denocciolate produce direttamente sanse vergini denocciolate che potrebbero essere più facilmente utilizzate in zootecnia. D'altra parte il settore zootecnico è attualmente alla ricerca di fonti proteiche alternative alle farine animali e, quindi, arricchire in proteina per via fermentativa residui e sottoprodotti agro-alimentari sembra una strategia percorribile ed attuale. Il siero di latte, il pastazzo d'agrumi, la granella spenta dell'industria birraria, i surplus ortofrutticoli, paglia di mais sono solo alcuni esempi di substrati utilizzati in coltura sommersa per la produzione di biomasse proteiche da funghi.

Tra le possibili specie microbiche adatte a tale scopo, i basidiomiceti afferenti al raggruppamento degli agenti di carie bianca rappresentano una scelta ideale. All'interno di questo raggruppamento sono presenti diverse specie eduli (appartenenti a generi quali, p.es., Pleurotus) destinate all'alimentazione umana e che rispondono, quindi, al requisito di sicurezza alimentare GRAS (Generally Regarded As Safe). Inoltre, queste specie fungine esibiscono un ampio spettro degradativo nei confronti di molecole e/o macromolecole con attività anti-nutrizionale, quali lignina, tannini, fenoli monociclici e glucosinolati. La colonizzazione fungina di substrati caratterizzati da un basso indice nutrizionale si traduce, inoltre, in un innalzamento del tenore proteico e quindi in un miglioramento del valore nutrizionale oltre ad un aumento della palatabilità che è connessa al rilascio di molecole volatili a 8 atomi di carbonio (1-octen-3-olo, 1-octen-3-one, 3-octanol) derivanti da trasformazioni enzimatiche degli acidi linoleico e linolenico. La composizione del pool amminoacidico libero e combinato, la preponderanza di acidi grassi insaturi e il basso contenuto in acidi nucleici rende questi funghi tra le migliori sorgenti microbiche di proteine [3].

Le fonti proteiche di origine vegetale attualmente sul mercato (farina di estrazione di soia, farina di estrazione di girasole, leguminose quali il pisello proteico e le fave) hanno dei prezzi notevolmente superiori (mediamente intorno ai 22-28 Euro/quintale) a quello previsto dalle sanse biotrattate; ciò rende il sottoprodotto in questione particolarmente attraente sotto il profilo della convenienza economica nell'inserimento nelle formule alimentari per uso zootecnico.

Anche le AV separate dal loro contenuto di fenoli batteriostatici e tossici, possono fornire un residuo a contenuto lipidico, proteico, glucidico che opportunamente fermentato può dare un prodotto di interesse nella mangimistica zootecnica [3].

I polifenoli nel settore alimentare

Le sostanze di gran lunga più utilizzate a questo scopo sono il BHA e il BHT per gli alimenti che contengono oli e grassi e l'acido ascorbico per quelli acquosi. Questo perché i primi due composti sono solubili nei grassi ma non nell'acqua e, viceversa, l'acido ascorbico è solubile in acqua ma non nei grassi. La sostituzione dell'acido ascorbico con i polifenoli tuttavia, per quanto teoricamente possibile, non sembra molto praticabile: l'acido ascorbico è una vitamina e come tale gode di un elevato credito salutistico, non è mai stata sospettata di effetti nocivi, costa poco e anche se prodotta per sintesi chimica, è un prodotto eguale a quello naturale. Più interessante è invece la possibilità di conquistare una parte del vasto mercato del BHA e BHT nella conservazione di oli e grassi. Intanto entrambi BHA e BHT sono prodotti di sintesi non presenti in natura, per di più sospettati di cancerogenicità e sottoposti ad una stretta limitazione delle dosi di impiego. Al contrario i polifenoli sono sostanze che la natura ha evoluto per proteggere i propri frutti. Questi polifenoli esercitano un effetto antiossidante utile non solo nella conservazione di oli e grassi commestibili, ma anche all'interno dell'organismo umano, abbassando il rischio di malattie cardiovascolari. Essi si presentano quindi quali additivi ideali per i grassi, come l'acido ascorbico lo è per i prodotti acquosi.

I polifenoli nelle preparazioni cosmetiche

Innovativi e recenti sono gli utilizzi dei polifenoli in creme e lozioni dermiche per la pelle per la protezione dai raggi solari e la prevenzione di irritazioni cutanee. Sono inoltre in commercio prodotti con attività antiaging, protettiva, lenitiva. Ad esempio, Biotherm (Gruppo L'Oreal) commercializza prodotti a base di oleuropeina. Il valore aggiunto dei polifenoli nella cosmetica è elevato. Il costo di una crema «anti-age» del peso di 50 g con un contenuto in polifenoli circa 1% in peso è di 50 €. Pertanto, 0.5 g di polifenoli che sono contenuti in 50 g di crema e che hanno un costo di 1 €/g all'origine hanno un valore aggiunto al minimo di 25 €.

I polifenoli nel settore dietetico e nutraceutico

L'uso dei polifenoli come semplici antiossidanti per la conservazione dei cibi potrebbe essere riduttivo. Esistono ormai dimostrazioni convincenti che i polifenoli esercitano sull'organismo interessanti effetti benefici, primo fra tutti l'inibizione dell'ossidazione delle LDL e quindi la prevenzione dell'aterosclerosi. Esistono anche dati che dimostrerebbero che l'inibizione dell'ossidazione delle LDL (comunque ottenuta) porterebbe a una regressione almeno parziale dell'aterosclerosi. Ne consegue che, per una corretta e saggia politica di lancio commerciale di prodotti derivanti da questa ricerca, l'utilizzo dei polifenoli a questi fini è quello che assicurerebbe i ritorni più immediati e quindi anche la capacità di un ragguardevole autofinanziamento in funzione dei lanci dei futuri prodotti (in particolar modo quelli

farma). Per quanto riguarda la valorizzazione come nutraceutici, la somministrazione raccomandata al fine di avere un'attività accertata clinicamente di protezione delle vie cardiovascolari, è di 100 mg/die di estratti polifenolici. Considerato un costo medio di tali prodotti nutraceutici di 60 €/confezione per 30 pillole contenenti ognuna 100 mg di estratto e quindi un totale di 3 grammi, si raggiunge un valore aggiunto fino a 20 €/g di polifenoli per confezione di nutraceutico.

Riportiamo di seguito alcuni esempi di procedure di recupero e purificazione dei fenoli e polifenoli dalle AV nell'ambito di progetti di ricerca congiunti Università-Industria.

A) *Estrazione di fenoli antiossidanti dalle AV tramite un sistema combinato di ultrafiltrazione, osmosi inversa e di tecniche di separazione chimico-fisiche* (Progetto finanziato dal MIUR nell'ambito della Legge 488. Partecipanti: gruppi di ricerca di Chimica Organica dell'Università della Tuscia e di Lecce; Società Farmaceutica Lachifarma).

Le AV sono trattate con un sistema combinato di ultrafiltrazione ed osmosi inversa che permette di separare la componente organica in frazioni caratterizzate da un diverso intervallo di pesi molecolari. In uscita dal trattamento si può ottenere acqua purificata da impiegare per scopi agricoli o industriali. Le frazioni organiche non tossiche a peso molecolare più elevato così recuperate, possono essere successivamente valorizzate impiegandole come materiale per la preparazione di compost di pregio e come substrati per la crescita di microrganismi produttori di enzimi di uso industriale (produzione fungina di ossidasi e laccasi) oppure come biomassa per alimenti per zootecnia di origine vegetale. La frazione a basso peso molecolare (PM<350 D) può essere successivamente utilizzata come fonte per l'ottenimento di idrossitirosolo e tirosolo che sono potenti antiossidanti fenolici

1) *Trattamento combinato di ultrafiltrazione ed osmosi inversa* (fig. 2).

50 litri di AV, che si presentano come una fanghiglia nera fortemente maleodorante, sono filtrate per gravità in due passaggi successivi su reti di poliprene per rimuovere le particelle di solidi sospesi fino ad un diametro maggiore di 0.05 mm. Questa operazione porta alla eliminazione di circa 3.8 litri di fanghiglia pari al 7.6% del volume totale trattato. Il filtrato viene sottoposto a microfiltrazione per rimuovere l'attività enzimatica (MF) utilizzando membrane da 0.1 micron ottenendo 3.4 litri di concentrato (pari al 7.2% del volume trattato) e 42.8 litri di permeato. Il permeato viene quindi ultrafiltrato (UF1) con una membrana da 20.000 D cut-off ottenendo 2.1 litri di concentrato e 40.7 litri di permeato. Il permeato viene di nuovo ultrafiltrato (UF2) con una membrana da 1.000 D cut-off ottenendo 2,5 litri di concentrato e 38.2 litri di permeato. Il permeato viene sottoposto a nanofiltrazione (NF) con una membrana da 300 D cut-off ottenendo 2,6 litri di concentrato e 35.6 litri di permeato. Infine il permeato viene sottoposto ad un processo di osmosi inversa (OI) per rimuovere i fenoli con peso molecolare inferiore ai

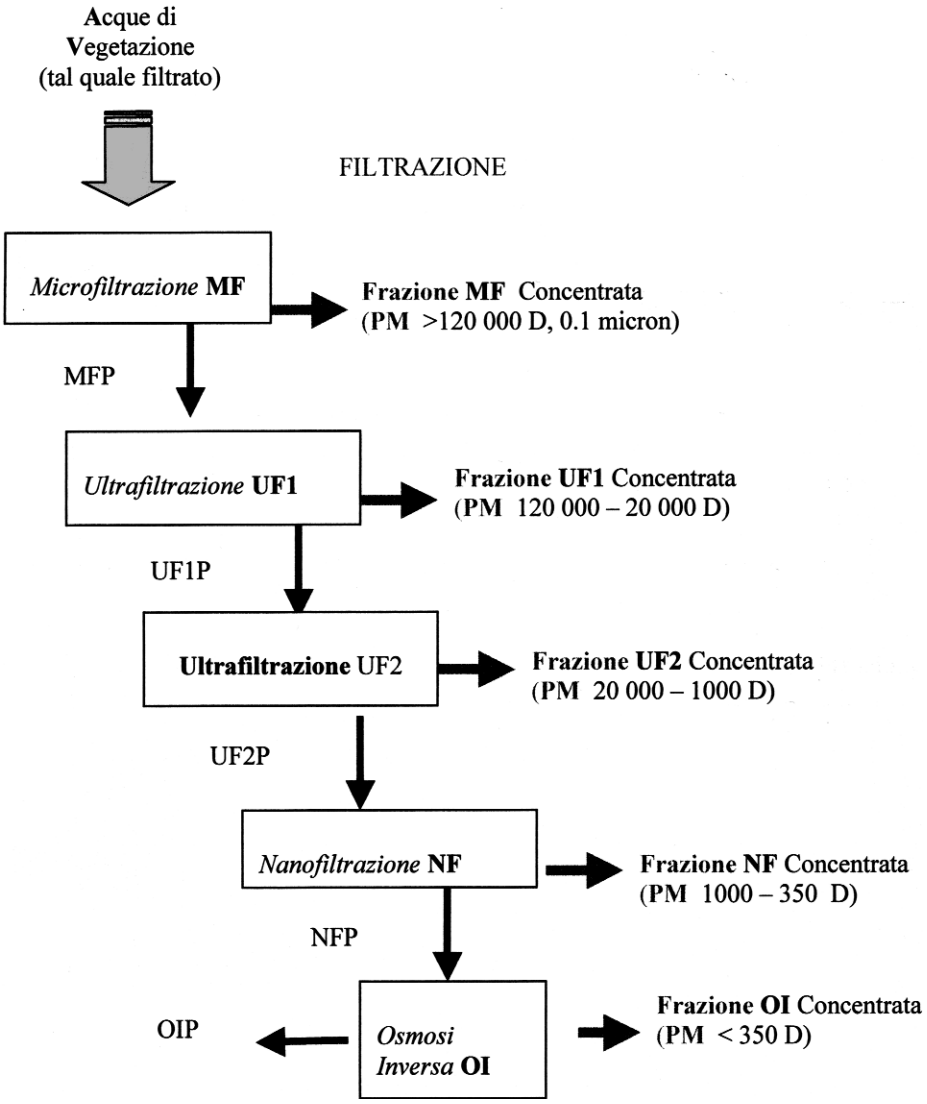


Fig. 2.

300 D ottenendo 2.5 litri di concentrato e circa 33 litri di acqua priva di fenoli ed incolore, potenzialmente utilizzabile per applicazioni agricole. Complessivamente, si recupera il 66% del volume di acqua rispetto al volume totale iniziale delle AV. Il sistema sviluppato permette di ottenere almeno 50 litri della frazione OI in 24 h di lavoro. Il processo di trattamento combinato di ultrafiltrazione ed osmosi inversa delle AV precedentemente descritto è in grado di fornire le componenti fenoliche e

polifenoliche con diverso peso molecolare ed è tale da detossificare le AV fino a rientrare nei parametri di controllo previsti dalla normativa vigente per il possibile utilizzo agricolo o civile.

2) *Separazione dei componenti fenolici della frazione Osmosi Inversa (OI) delle AV e loro caratterizzazione strutturale*

Nella fase iniziale di questo studio è stata effettuata la determinazione dei fenoli presenti nella frazione OI tramite cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) a fase inversa. L'analisi è stata condotta tramite eluizione a gradiente della concentrazione di alcool metilico in miscela binaria con acqua ed in presenza di acido acetico (1%, v/v). Il metodo risolve circa venti diversi fenoli di cui sette (i più abbondanti) sono stati riconosciuti mediante impiego di composti standard commerciali. I fenoli identificati mediante questa procedura sono: 4-Idrossifenetil alcool (tirosolo); 3,4-Diidrossifenetilalcool (idrossitirosolo); 3,4-Diidrossifenetil glicole; 4-Idrossi-3-metossifenetil alcool; acido 4-idrossi cinnamico; acido 4-idrossi benzoico; veratraldeide.

Sulla base di questi dati è possibile calcolare che in 50 litri di AV da noi trattate (da cui si ottengono 2,5 litri della frazione OI) sono contenuti 1.85 grammi di 4-idrossifenetil alcool (tirosolo) e 2.25 grammi di 3,4-idrossifenetil alcool (idrossitirosolo).

Conclusa la fase di determinazione dei fenoli più abbondanti nella frazione OI si è proceduto alla loro separazione. Circa un litro di OI è stato acidificato fino a pH=3 con HCl 2N, e quindi estratto con EtOAc (4×200 ml), la fase organica è stata seccata con Na_2SO_4 anidro ed infine evaporata a pressione ridotta ottenendo 1.56 grammi di grezzo pari al 95% del materiale stimato in tale volume. Vengono recuperati dall'imbuto separatore circa 800 ml di acqua esausta. L'analisi del grezzo condotta tramite cromatografia su strato sottile (TLC) usando come eluente la miscela CH_2Cl_2/CH_3OH nel rapporto di 9.3/0.7 mostra la presenza di tre macchie di cui le due più intense corrispondono come rapporto frontale RF al 4-idrossifenetil alcool ed al 3,4-idrossifenetil alcool che sviluppano una colorazione verde e rossa, rispettivamente, quando la lastra è sviluppata con una soluzione alcolica di acido fosfomolibdico. La purificazione del grezzo condotta tramite flash-cromatografia ha portato all'isolamento di 624 mg di 4-idrossifenetil alcool e 728 mg di 3,4-idrossifenetil alcool. I prodotti ottenuti dalla purificazione sono stati completamente caratterizzati tramite tecniche spettroscopiche (^1H e ^{13}C NMR, FT-IR) e spettrometriche (GC-MS, MS) e presentano una purezza superiore al 99.5%. I costi stimati per ottenere un grammo di 4-idrossifenetil alcool ed un grammo di 3,4-idrossifenetil alcool comprensivi della operazione di estrazione e di purificazione sono pari a circa 80-90 euro. Rispetto al costo attuale di mercato per il 3,4-idrossifenetil alcool di circa 2500 euro per grammo (dati forniti dalla ditta Cayman, fornitrice del prodotto) si ha un abbattimento percentuale del costo pari al 96.4%.

B) *Processo di estrazione dei polifenoli dalle AV con resine scambiatrici* (metodologia messa a punto nel Dipartimento di Microbiologia Industriale dell'Università di Bologna dal Dott. Leonardo Setti in collaborazione con la Società Lesepidado). Tale processo prevede la separazione con resine scambiatrici della parte fenolica che viene successivamente desorbita con solventi ecocompatibili quali l'etanolo e l'etilacetato o in alternativa con CO_2 supercritica per dare un estratto liquido o solido (fig. 3). I residui non fenolici possono essere trattati microbiologicamente sia per incrementarne il valore proteico per un uso zootecnico sia per produzione di enzimi industriali.

Proprietà degli estratti delle resine. 1 ml di liquido estratto ha un peso secco di 24 mg, Il 30% di tale peso secco è costituito da polifenoli ripartiti di cui il 16-17% è idrossitirosolo e il 4% è tirosolo.

Tali estratti hanno proprietà farmacologiche in quanto sono in grado di indurre
- inibizione di LDL in vitro
- riduzione dell'aggregazione delle piastrine
- riduzione del trombossano

È stato stimato che la dose ottimale per l'uomo è pari a 5-10 mg da assumere tramite capsule o pasticche (basso assorbimento) o tramite cibo (emulsioni e liposomi, elevato assorbimento).

Attualmente i più venduti sono:
- Estratti di vinaccioli
- Estratti di mirtillo
- Estratti dal tè verde
- Estratti da Ginko Biloba

Il mercato europeo di tali supplementi è oltre 3 miliardi.

3) *Altre metodiche di estrazione di polifenoli sono:*

- estrazione con CO_2 supercritica delle frazioni sottoposte ad ultrafiltrazione contenenti fenoli antiossidanti (frazione osmosi inversa) per ottenere l'idrossitirosolo allo stato di maggior purezza
- precipitazione frazionata delle AV per ottenere la polimerina, bioammendante e biointegratore in agricoltura [4]
- recupero dai semi di nocciolo dell'oliva e dai vinaccioli di esteri glicerici saturi e insaturi, fenoli, antiossidanti e di altri composti bioattivi
- processo di estrazione dai semi e dai vinaccioli
- estrazione con solventi (etanolo, metanolo)
- estrazione con CO_2 supercritica o in miscela con solventi classici.

Metodiche di stabilizzazione degli antiossidanti anche ai fini di aumentarne la liposolubilità

Le molecole naturali recuperate tendono a deteriorarsi nel tempo così come presentano una limitata liposolubilità. È pertanto fondamentale per un utilizzo

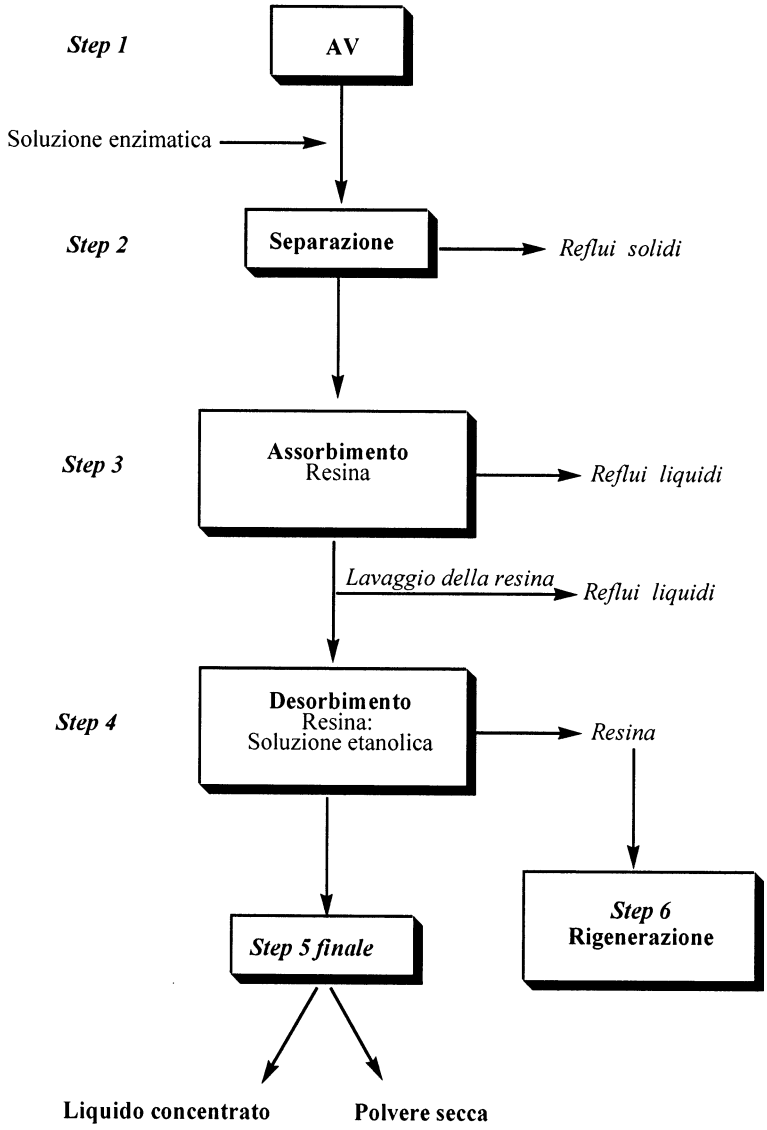

Step 1
AV
Soluzione enzimatica
Step 2
Separazione
Reflui solidi
Step 3
Assorbimento
Resina
Reflui liquidi
Lavaggio della resina
Reflui liquidi
Step 4
Desorbimento
Resina:
Soluzione etanolica
Resina
Step 6
Rigenerazione
Step 5 finale
Liquido concentrato
Polvere secca

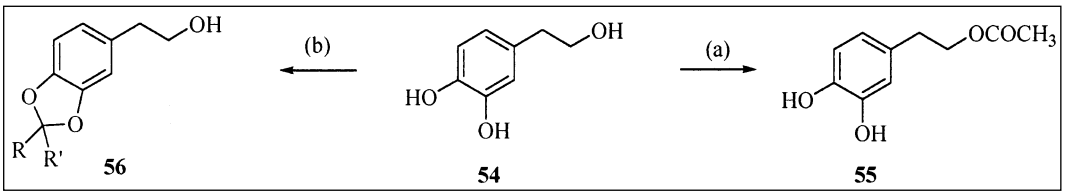
Fig. 2.

cosmetico, nutraceutico e dietetico, la loro stabilizzazione nel tempo e l'incremento della liposolubilità. Tra le tecniche utilizzate vi sono:

- la liofilizzazione delle AV o delle frazioni di interesse da utilizzare tal quali come antiossidanti;
- l'aggiunta di biopolimeri di natura animale o vegetale (polisaccaridi) alle AV che vengono successivamente atomizzate fornendo una polvere utilizzabile come cosmetico ed additivo alimentare;
- il microincapsulamento in ciclodestrine o in fosfolipidi con formazione di liposomi (utilizzo di lecitine) o in materiali porosi (cellulosa) formando nanospugne che rilasciano il principio attivo a contatto con l'umidità
- Polimerizzazione con acidi bicarbossilici e successiva idrolisi enzimatica in loco (lipasi). [5]

Metodi chimici per la stabilizzazione dell'idrossitirosolo.

1) Protezione dell'ossidrile alcolico primario dell'idrossitirosolo (a) oppure degli ossidrili fenolici (b)



Schema 1.

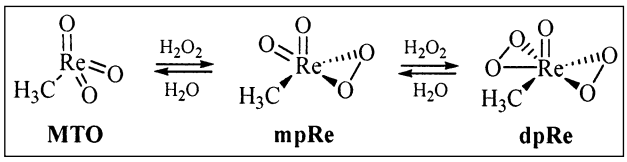
2) Ottenimento di idrossitirosolo protetto a partire dall'oleuropeina (isolata dalle foglie)

Tale processo ha previsto la protezione in opportune condizioni con un sistema chetalico degli ossidrili fenolici dell'oleuropeina e la successiva idrolisi basica controllata che permette di ottenere come prodotto finale l'idrossitirosolo chetalizzato (Schema 2). Tale metodologia è stata messa a punto dal nostro gruppo di ricerca in collaborazione con il gruppo di ricerca di Chimica Organica dell'Università di Roma Tre [6].

Alcuni esempi di valorizzazione chimica delle molecole fenoliche più largamente presenti nei reflui agroindustriali basata sulla loro trasformazione in composti ad alto valore aggiunto, quali intermedi di sintesi e nuove molecole con potenziali attività biologiche.

La metodologia scelta per condurre tali trasformazioni chimiche in condizioni di green chemistry si basa sull'uso della catalisi ossidativa realizzata con il sistema perossido di idrogeno (H_2O_2)/metiltriossorenio (MTO, CH_3ReO_3). Il metiltriossorenio è un ossido organometallico commercialmente disponibile in grado di attivare

in situ il perossido di idrogeno formando un monoperosso *mpRe* e un diperosso-complesso *dpRe* che rappresentano le specie attive dei processi di ossidazione (Schema 3) [7].

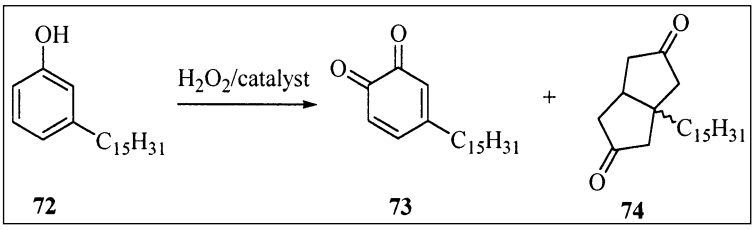


Schema 3.

Le ossidazioni sono state da noi condotte in fase omogenea sia in solventi organici tradizionali (acido acetico, etanolo) che in liquidi ionici e in dimetil carbonato, un nuovo solvente a basso impatto ambientale che in fase eterogenea più vantaggiosa ai fini economici ed ambientali.

1) *Ossidazione di cardanoli*

Il CNSL (Cashew Nut Shell Liquid) è un olio alchilfenolico contenuto nel mesocarpo spugnoso della noce di anacardio, un albero ampiamente diffuso e coltivato soprattutto in India e in Brasile. Tale olio si presenta come un prodotto scuro, catramoso e costituisce un sottoprodotto derivante dai processi meccanici della lavorazione a fini commestibili delle noci. Una volta purificato, rappresenta un materiale grezzo rinnovabile, largamente disponibile e a basso costo. Il componente principale del CNSL è il cardanolo, un fenolo avente in posizione meta una catena laterale costituita da 15 atomi di carbonio con un diverso grado di in saturazione. A titolo di esempio viene riportata l'ossidazione del 3-n-pentadecilfenolo (Schema 4) a dare il corrispondente *o*-benzochinone e un bis-lattone, prodotti biologicamente attivi.

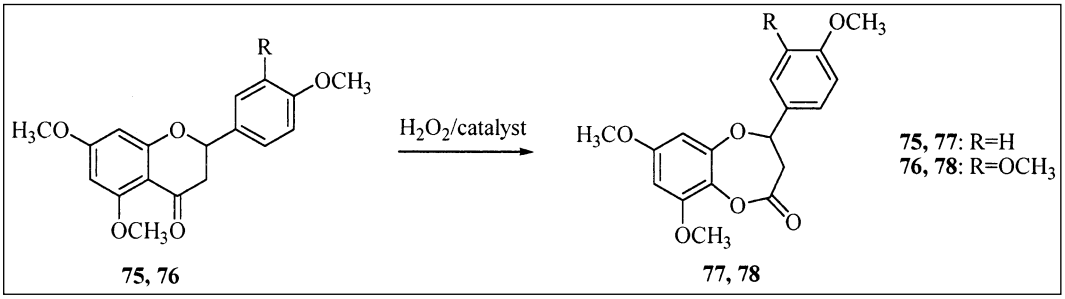


Schema 4.

2) *Ossidazione di flavanoni*

I flavanoni naringenina, naringina, esperetina, esperedina sono presenti in notevoli quantità nella frutta del genere *Citrus*. Dalla lavorazione industriale degli agrumi, in particolare limoni e arance, si ottengono acque reflue e residui solidi

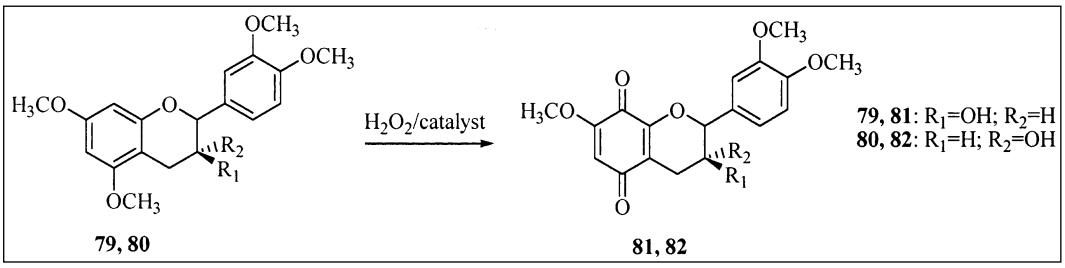
contenenti notevoli quantità di tali composti (13 Kg/t di frutti processati). Considerato l'elevato carico inquinante di tali scarti, risulta di particolare interesse la possibilità di utilizzare tali sostanze fenoliche convertendole chimicamente in derivati con nuove attività biologiche. Nel caso specifico, i prodotti sono stati convertiti in lattoni dotati di attività apoptotica su linee di cellule tumorali (Schema 5).



Schema 5.

3) *Ossidazione di catechine*

Le catechine sono composti ampiamente diffusi nel mondo vegetale, unità monomeriche delle proantocianidine (tannini condensati). Essendo presenti in alimenti e in bevande, fanno parte integrante della dieta umana. In particolare sono presenti nel vino e, dopo la vinificazione, nei residui enologici. Da alcuni anni sono oggetto di numerosi studi da parte di medici e biologi per le molteplici attività farmacologiche. Sono note, infatti, l'attività antitumorale, cardioprotettiva ed antiossidante. Tali prodotti sono stati convertiti nei corrispondenti *p*-benzochinoni, prodotti dotati attività antifungina (Schema 6).



Schema 6.

Finanziamenti

Le ricerche in corso sono state finanziate dal MIUR con il contributo dei COFIN 2000, 2001, 2002, 2005, dal MIPAF e da industrie private (AVA, Sigma-Tau, Lachifarma) con convenzioni o con progetti di sviluppo precompetitivo nel-

l'ambito delle Leggi 488 e 297. In alcuni progetti è presente il Consorzio INCA (vedi progetto vinacce della Regione Sardegna già approvato e quello con la Società AVA in corso di presentazione; Progetto Agricolo Nazionale). Tale consorzio inoltre ha cofinanziato e cofinanzia borse di dottorato nel settore della ricerca di molecole bioattive.

Partecipanti alla ricerca

- Saladino Raffaele, Professore Associato CHIM/06, Chimica Organica, Dipartimento ABAC, Università degli Studi della Tuscia
- Bernini Roberta, Ricercatore CHIM/06, Chimica Organica, Dipartimento ABAC, Università degli Studi della Tuscia
- Mezzetti Maurizio; Cortese Manuela; Coratti Antonietta; Barontini Maurizio; De Salve Ilse; Provenzano Gianfranco; Crisante Fernanda: dottorandi e assegnisti di ricerca di Chimica Organica, Università degli Studi della Tuscia
- Fabrizi Giancarlo, Professore Associato CHIM/06, Chimica Organica, Dipartimento di Studi di Chimica e Tecnologia delle Sostanze Biologicamente Attive, Università La Sapienza di Roma
- Corradini Danilo, Primo Ricercatore, Area della Ricerca, CNR, Montelibretti
- Merendino P., Società Lachifarma, Lecce.

BIBLIOGRAFIA

[1] Bovicelli, P.; Lupattelli, P.; Mincione, E.; Prencipe, T.; Curci, R. *J. Org. Chem.* 1992, *57*, 2182; Bovicelli, P.; Lupattelli, P.; Mincione, E.; *J. Org. Chem.* 1994, *94*, 4307; Bovicelli, P.; Lupattelli, P.; Mincione, E.; Prencipe, T.; Curci, R. *J. Org. Chem.* 1992, *57*, 5052; Bovicelli, P.; Lupattelli, P.; Fiorini, V.; Mincione, E. *Tetrahedron Lett.* 1993, *34*, 6103; Bovicelli, P.; Lupattelli, P.; Fracassi, D.; Mincione, E. *Tetrahedron Lett.* 1994, *35*, 6103; Saladino, R.; Bernini, R.; Crestini, C.; Mincione, E.; Bergamini, A.; Marini, S.; Palamara, A. *Tetrahedron* 1995, *51*, 7561; Saladino, R.; Crestini, C.; Bernini, R.; Mincione, E.; Ciafrino, R. *Tetrahedron Lett.* 1995, *36*, 2665; Saladino, R.; Bernini, R.; Mincione, E.; Tagliatesta, P.; Boschi T. *Tetrahedron Lett.* 1996, *37*, 2647.

[2] Saladino, R.; Bernini, R.; Mincione, E. "Innovation. Environmental oxidative catalysis for processing of agroindustrial wastewaters" *Chimica e Industria*, 2001, *83 (1)*, 34-35; Saladino, R.; Bernini, R.; Mincione, E. "Recycling of agroindustrial wastes" *Chimica e Industria*, 2002, *84 (2)*, 47-50; Mincione, E.; Bernini, R.; Saladino, R.; Bovicelli, P. "Phenolic natural compounds with the chromanic structure. Their valorisation by Green Chemistry oxidative methodologies" *Chimica e Industria* 2003, *85 (1)*, 1-4.

[3] Amirante R., Baccioni L., Catalano P., Montel G.L. *Riv. It. Sost. Grasse*, 1999, *76*, 129; Di Giovacchino L.; Mucciarella, M. R.; Costantini, N.; Ferrante M. L. *Riv. It. Sost. Grasse* 1997, *74*, 405; Aguilera, J. F.; Molina, E. *Ann. Zootec.* 1986, *35*, 205; Servili, M.; Badioli, M. Selvaggini, R., Macchioni, A.; Montedoro, G. F. *J. Agr. Food Chem*. 47, 1999, 12.

[4] Capasso, R.; De Martino, A.; Arienzo, M. *J. Agric. Food Chem.* 2002, *50*, 2846-2855.

[5] XXI International Conference on Polyphenols, Marrakech (Marocco), September 9-12, 2002. Communications pp. 357; 361; 363.

[6] Gambacorta, A.; Tofani, D.; Bernini, R.; Migliorini, A. *J. Agric. Food Chem.* 2007, *59 (9),* 3386-3391.

[7] R. Saladino, V. Neri, E. Mincione, S. Marini, M. Coletta, C. Fiorucci, P. Filippone *Perkin 1*, 2000, 581-586; Bernini, R.; Mincione, E.; Cortese, M.; Aliotta, G.; Oliva, A.; Saladino, R. *Tetrahedron Lett*. 2001, 42, 5401-5404; Saladino R., Mincione E., Attanasi O. A., Filippone P. *Pure and Appl. Chem.,* 2003, *75*, 265-272; Bernini, R.; Mincione, E.; Cortese, M.; Saladino, R.; Gualandi, G.; Belfiore, M. C. *Tetrahedron Lett*. 2003, *44*, 4823-4825; Bernini, R.; Coratti, A.; Fabrizi, G.; Goggiamani, A. 2003, 44, 8991-8994; Bernini, R.; Mincione, E.; Provenzano, G.; Fabrizi, G. *Tetrahedron Lett*. 2005, *46*, 2993-2996; Bernini, R.; Mincione E.; Barontini, M.; Fabrizi, G.; Paqualetti, M.; Tempesta, S. *Tetrahedron* 2006, *62,* 7733-7737; Bernini, R.; Mincione, E.; Barontini, M.; Crisante, F.; Gambacorta, A. *Tetrahedron* 2007, *63,* 6895-6900.