



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102013902129079
Data Deposito	20/02/2013
Data Pubblicazione	20/08/2014

Classifiche IPC

Titolo

**PROCESSO CHIMICO-FISICO PER IL RECUPERO DI FLAVONOIDI DAI REFLUI DELLA
PRODUZIONE INDUSTRIALE DELLA BIRRA.**

DESCRIZIONE dell'invenzione avente per titolo: "Processo chimico-fisico per il recupero di flavonoidi dai reflui della produzione industriale della birra" a nome di GIANFRANCO IRLANDESE residente in Viale Salandra n.58G, Bari, di nazionalità italiana e DOMENICO PELLERANO residente in Via Boccaci n.130, Bari, di nazionalità italiana, depositata in data con il n.

La presente invenzione fa riferimento ai processi di trattamento delle matrici alimentari. La finalità dell'invenzione è quella di recuperare dai reflui industriali del ciclo di produzione della birra sostanze antiossidanti naturali, che altrimenti inquinano l'ambiente rendendo oltremodo lentissimo il processo di depurazione, sia per via impiantistica che naturale, delle acque di rifiuto dell'industria birriera. L'invenzione in questo modo si propone di:

- 1. affrontare il problema tecnico del recupero di sostanze antiossidanti dai reflui industriali;
- 2. di abbattere la carica di antiossidanti presenti nelle acque di rifiuto dell'industria della birra.

Tanto con i seguenti vantaggi diretti:

- 3. sulla salute umana con il recupero di sostanze antiossidanti con valenze terapeutiche;
- 4. sull'ambiente con il riciclo e la rimmissione nell'ambiente stesso di acque depurate;
- 5. economici/energetici derivanti dal risparmio del trattamento delle acque reflue, dall'abbattimento dei costi sanitari relativi alle cure delle patologie prevenibili con l'impiego di antiossidanti e dalla commercializzazione delle stesse sostanze.

Non sono ad oggi disponibili sul mercato nell'ambito specifico dell'industria birriera nulla di preesistente.

Lo stato della tecnica preesistente vede come tecnologie di riferimento ai fini della presente invenzione i processi di essiccazione controllata ed i processi di separazione mediante membrane semipermeabili.

L'invenzione consiste nella definizione di un processo secondo il quale è possibile affrontare il problema tecnico dell'eliminazione di sostanze antiossidanti dal refluo industriale della produzione della birra con l'impiego di successive fasi di trattamento chimico e fisico.

Le condizioni ottimali del processo di estrazione di questi composti vedono la scelta di un solvente estrattivo al tempo stesso efficiente, non tossico o nocivo per l'ambiente, nonché poco costoso. Impiegando un solvente formato da acqua ed etanolo (il comune alcol presente nei vini e nei distillati di uva) è possibile recuperare oltre

Domenico Pellerano

2

Gianfranco Irlanese

il 90% dei polifenoli totali presenti nel rifiuto. Il solvente, inoltre, può essere completamente recuperato al termine dell'estrazione e riutilizzato in ciclo chiuso, e in tal modo il processo non genera nessun tipo di rifiuto o di effluente da smaltire. L'invenzione può essere tradotta in realtà a livello industriale con la realizzazione di un impianto di trattamento chimico-fisico posizionato in modo tale da ricevere direttamente i reflui e che sia capace di reiniettare nel ciclo ecologico delle acque il liquido biologicamente spento e dall'altro di rendere disponibili alla commercializzazione le sostanze di interesse nutraceutico sui migliori mercati. Tale invenzione potrà essere realizzata secondo economie di scala e quindi viene resa disponibile per imprese che producono birra di qualsiasi dimensione produttiva. Le scelte impiantistiche di dettaglio sono funzione delle suddette dimensioni.

PREMESSA

Il processo si inserisce nel più ampio ambito dei procedimenti tecnologici per il recupero di sostanze antiossidanti e macromolecolari da reflui e sottoprodotti dei cicli di lavorazione dei prodotti della filiera agroalimentare vegetale.

L'invenzione riguarda un procedimento per il recupero di composti biochimici, presenti nei residui del ciclo di lavorazione dei cereali impiegati per la produzione di bevande fermentate, i quali sono di utilità nel trattamento o la profilassi di malattie ad elevato impatto socio-sanitario quali quelle tumorali, cardiovascolari, dismetaboliche.

Il cancro, le malattie cardiovascolari (CVD) e il diabete risultano fra le prime cause di mortalità cronica e di morte in tutto il mondo. Perciò il trend di spesa connesso alla loro cura è stimato in aumento a causa dell'azione sinergica di diversi fattori ambientali e sociali.

Il cancro rappresenta un notevole onere economico, stimato in 124 miliardi di euro all'anno per il Paese UE, non solo per i sistemi sanitari, ma anche per altri settori dell'economia. I costi più alti per l'assistenza sanitaria sono stati sostenuti per il cancro al seno: 6 miliardi di euro ogni anno, pari al 13% del totale dei costi sanitari per il cancro nell'UE. Ma la spesa maggiore, sul totale dei costi, è legata al cancro del polmone, per un totale di 19 miliardi di euro, di cui 10 a causa di mortalità prematura [Congresso della Società Europea di Oncologia Medica — 2012 European Society for Medical Oncology (ESMO); Dr Ramon LUENGO-FERNANDEZ from the University of Oxford, UK, and colleagues].

Domenico Pellegrino

Giuseppe Gallo

CVD in Europa costituiscono la prima causa di morte tra donne e uomini: 4,35 milioni in Europa e 1,9 milioni nella Unione Europea; esse sono anche la più importante causa di disabilità e di ridotta qualità di vita e costano all'economia dell'EU circa € 169 miliardi/anno e la previsioni di costi è in sensibile aumento (European Heart Journal - 2012).

Secondo le stime elaborate dall'International Diabetes Federation (Annual Report 2011), per fronteggiare il diabete, sono stati spesi in tutta Europa 89 miliardi di euro pari a 150 euro per ogni cittadino europeo.

L'evidenza epidemiologica indica che una dieta ricca di frutta e verdura offre un significativo effetto protettivo contro queste malattie croniche. Gran parte di questo effetto protettivo è stato attribuito ad una classe importante di sostanze fitochimiche presenti comunemente, anche se in concentrazioni molto ridotte, in frutta e verdura e appartenenti alla classe dei polifenoli.

Chimicamente i polifenoli si distinguono per la presenza di due o più gruppi fenolici e sono suddivisi nelle famiglie degli acidi fenolici, quali gli acidi benzoici e gli acidi cinnamici, dai loro derivati, come gli stilbeni, e dei flavonoidi, ovvero sostanze pigmentate con struttura caratteristica costituita da due gruppi benzenici uniti da un etero ciclo con atomo di ossigeno. La loro presenza è dovuta alle attività fisiologiche della cellula vegetale.

Biosintesi dei polifenoli: la via dell'"acido shikimico"

L'acido shikimico, più comunemente noto nella forma anionica shikimate, è un importante intermedio biochimico in piante e microrganismi. Il suo nome deriva dal fiore giapponese shikimi (*Illicium anisatum* L.) da cui è stato isolato per la prima volta ed è il fondamentale precursore biosintetico delle seguenti classi di composti:

- gli amminoacidi aromatici fenilalanina e tirosina,
- l'indolo, derivati indolici e l'amminoacido aromatico triptofano,
- molti alcaloidi e altri metaboliti aromatici,
- tannini, flavonoidi e lignani.

L'enzima chiave nella biosintesi dei flavonoidi catalizza la formazione dello scheletro C15 dei flavonoidi a partire da malonil-CoA e p-cumaril-CoA (derivato attivato dell'acido p-cumarico).

Agli enzimi finora citati vanno aggiunti numerosi altri enzimi, i quali catalizzano delle reazioni che portano ad una modificazione dello scheletro base dei flavonoidi: reazioni di idrossilazione, glicosilazione, acilazione,

Donato Pellegrino

Prof. Maria M. M. M.

importanti nel conferire caratteristiche di stabilità ed idrofilità alle molecole, mentre reazioni di metilazione e preilazione, conferiscono ai flavonoidi caratteristiche di lipofilità ed attività antimicrobica.

Negli ultimi anni sono stati fatti notevoli progressi nella comprensione della biosintesi dei flavonoidi. Restano, però, ancora da chiarire alcuni aspetti relativi agli ultimi stadi della sintesi delle antocianine, alla sintesi dell'epicatechina e delle proantocianidine ed, infine, relativamente alla sintesi di alcune classi di flavonoidi numericamente meno consistenti, quali auroni e diidrocalconi. Restano, infine, da chiarire anche alcuni aspetti relativi alla localizzazione subcellulare dei flavonoidi ed al meccanismo con cui i flavonoidi vengono trasportati nel vacuolo.

Le piante, quindi, durante l'evoluzione hanno sviluppato soluzioni strategiche che consentono loro sia la crescita che la sopravvivenza: in particolare un metabolismo primario legato alla crescita e un metabolismo secondario, associato alla necessità di sintetizzare sostanze deputate alla difesa e ad altre funzioni basilari per la sopravvivenza (regolazioni ormonali, resistenza agli stress, riserva e facilitazione nell'assorbimento di nutrienti). La protezione dagli stress ossidativi è uno degli scopi essenziali del metabolismo secondario. Le piante presenti in ambienti sub-ottimali, dove questi processi sono particolarmente sviluppati, dirottano parte degli assimilati utili alla crescita verso sostanze destinate alla difesa, ecco perché questi vegetali sono potenzialmente più ricchi di antiossidanti.

Effetti sul biochimismo animale

Nell'ultima decade, un'attenzione considerevole da parte del mondo scientifico è stata prestata a questi antiossidanti facili e naturali, compresi i flavonoidi, per i loro potenti effetti protettivi contro i danni ossidativi. La letteratura sugli antiossidanti è molto vasta ed è concorde nel presentare i polifenoli come modificatori della risposta biologica sperimentale, dimostrando la loro capacità di modificare la reazione dell'organismo agli allergeni, virus e agenti cancerogeni. Essi agiscono come potenti antiossidanti, generando un'evidente protezione contro lo stress ossidativo e i danni indotti dai radicali liberi e aiutando a prevenire diverse malattie associate a stress ossidativo. Tuttavia, è stato stimato che la maggior parte delle persone non ne consumano quantità sufficienti per ottenere i benefici attesi.

Il corpo umano, per affrontare le specie reattive all'ossigeno (ROS), è provvisto di un sistema di difesa che è

Daniela Pellegrino

Prof. Piero Pellicani

costituito da molecole, presenti in basse concentrazioni, dette antiossidanti (WEISBURGER, 2000), che sono in grado di neutralizzare i radicali liberi, donando loro un elettrone e formando loro stessi radicali liberi stabili che bloccano la perossidazione lipidica.

Nei cibi, gli antiossidanti hanno fondamentalmente quest'ultima funzione. Nei sistemi biologici, la definizione di antiossidante è stata estesa a qualsiasi sostanza che, presente a basse concentrazioni rispetto a quelle di un substrato ossidabile, ritarda significativamente o previene l'ossidazione di quel substrato (FRANKEL, MEYER, 2000).

I principali composti antiossidanti dell'organismo sono suddivisibili in 3 gruppi: antiossidanti endogeni, antiossidanti dietetici e proteine che legano metalli (PORRINI, TESTOLIN, 1997). Essi possono essere classificati anche a seconda del meccanismo con il quale agiscono, distinguendosi quindi in "scavengers" di radicali, "quenchers" e "synergists" (FANTOZZI, 1995).

Le prime sono quelle sostanze che reagiscono con i radicali liberi, trasformando esse stesse in radicali; i tocoferoli, acido ascorbico, polifenoli e carotenoidi agiscono in questo modo. I "quenchers" assorbono energia dai pigmenti eccitati, provvedendo a dissiparla sotto forma di emissione di luce (es. tocoferoli e caroteni nei confronti dell'ossigeno singoletto O_2); il processo non comporta trasferimento di elettroni. I "synergists" agiscono in collaborazione con i composti delle due classi precedenti e sono l'acido fosforico, il tartarico, il citrico, le lecitine ed alcuni amminocidi.

Gli antiossidanti possono essere classificati a seconda della loro solubilità: nella categoria degli antiossidanti idrofili, cioè affini ai solventi polari, sono compresi alcuni polifenoli (acido gallico, catechina) e alcune vitamine (C e quelle del gruppo B); tra gli antiossidanti lipofili, cioè affini agli oli e ai grassi, vi sono alcuni carotenoidi (clorofilla a e b, β -carotene, licopene), alcuni polifenoli (epicatechina, quercetina, rutina, acido caffeico, ferulici e cinnarici), l' α -tocoferolo, l'acido linoleico e linolenico.

Un'altra distinzione importante è quella fra antiossidanti naturali e sintetici. I primi si ottengono dall'estrazione della materia prima naturale utilizzando solventi organici oppure con trattamenti "mild" per migliorare il grado di purezza. Gli antiossidanti sintetici sono, invece, quelli prodotti in laboratorio.

La principale differenza fra i due è che gli antiossidanti naturali sono meno efficaci dei sintetici, poiché hanno

Domenico Pellegrino

Giuseppe M. M.

una più lenta disponibilità a donare l'atomo di idrogeno (Soldati, 1997). D'altro canto, nei sistemi biologici complessi, i polifenoli possono avere una serie di effetti non ascrivibili alla sola attività antiossidante. Questa argomentazione è sostenuta per lo meno da due osservazioni. Innanzi tutto essi vengono metabolizzati in vivo originando spesso sostanze che perdono il potenziale antiossidante originale. Inoltre le loro concentrazioni e quelle dei loro metaboliti, nel plasma o nei tessuti, sono molto basse rispetto a quelle di altri antiossidanti, come l'acido ascorbico e l' α -tocoferolo, rendendo improbabile che i polifenoli possano competere con essi. Viceversa tali concentrazioni potrebbero consentire loro di avere attività farmacologiche e di modulare varie funzioni cellulari. È stato infatti dimostrato che i polifenoli sono in grado di modulare l'espressione e/o l'attività di enzimi come telomerasi, cicloossigenasi, lipossigenasi, xantina ossidasi, metalloproteinasi, enzima di conversione dell'angiotensina, protein-chinasi; di interagire con le vie di trasduzione del segnale, con i recettori cellulari, con le vie apoptotiche caspasi-dipendenti, con la regolazione del ciclo cellulare, e con l'induzione di enzimi detossificanti. Essi inoltre sono in grado di aumentare la produzione di vasodilatatori, come l'ossido nitrico; influenzare la funzione delle piastrine e competere con il glucosio nel trasporto attraverso la membrana.

È appena il caso di ricordare che il danno ossidativo si esplica chimicamente secondo lo schema di seguito accennato.

L'ossigeno è una molecola fondamentale per la vita dell'uomo e della maggior parte degli esseri viventi; si configura come accettore terminale degli elettroni nella catena respiratoria mitocondriale (CURTIS, BARNES, 1994). Tuttavia l'ossigeno si può comportare da agente tossico visto che dal suo metabolismo possono originarsi delle specie reattive che aggrediscono e danneggiano l'organismo umano. L'ossigeno molecolare (O_2) ha una reattività piuttosto debole, mentre i sottoprodotto del metabolismo ossidativo, denominati radicali liberi, pur essendo implicati in molti processi vitali, sono altamente dannosi, essendo correlati all'insorgenza di una serie di malattie quali il cancro, l'arteriosclerosi, l'artrite, la cataratta e il diabete.

Un radicale libero è una molecola capace di esistenza indipendente che possiede uno o più elettroni spaiati cioè non accoppiati (PORRINI, TESTOLIN, 1997); molti radicali liberi sono pertanto instabili, altamente reattivi ed in grado di instaurare reazioni a catena nei confronti delle componenti vitali delle cellule.

Generalmente gli atomi sono disposti in molecole all'interno delle quali gli elettroni si presentano a coppie; ogni

Anna Pelloni

[Signature]

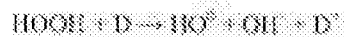
coppia di elettroni fra una rotazione opposta e ogni elettrone di una coppia ruota in senso contrario all'altro, garantendo così la massima stabilità della molecola. Quando i radicali liberi si formano, tendono a ricercare una maggiore stabilità: reagiscono con altre molecole a cui sottrarre protoni, si formano altri radicali e si avvia una reazione a catena che lentamente disgrega in maniera irreversibile la struttura chimica delle cellule.

Questo processo è detto "stress ossidativo" e viene considerato come uno spostamento dalla posizione di equilibrio di agenti pro-ossidanti e antiossidanti a favore dei primi (TIROSH, REZNICK, 2000). Lo stress dipende da caratteristiche genetiche soggettive e da caratteristiche individuali quali il peso, il sesso, l'età, il tipo di alimentazione, le condizioni di vita, ecc.

Anche altri fattori, estranei all'individuo, hanno grande influenza sullo stress: ricordiamo il "buco dell'ozono", gli inquinanti dell'aria (esempio anidride solforosa, ossidi di azoto, benzene) e l'esposizione prolungata ai raggi UV.

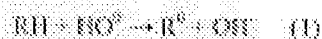
I radicali più interessanti dal punto di vista biologico sono i ROS (Reactive Oxygen Substances) nei quali l'elettrone spaiato è sull'ossigeno. I principali radicali liberi sono il radicale idrossilico (HO^\bullet), il radicale superossido ($\text{O}_2^{\bullet -}$), l'ossido di azoto (NO^\bullet) e il radicale perossilico (ROO^\bullet) (JONGEN, LINNEMANN, 1998).

Il radicale idrossilico (HO^\bullet) deriva dalla riduzione dell'acqua ossigenata:



dove D è una molecola donatrice di elettroni. Il radicale superossido ($\text{O}_2^{\bullet -}$) deriva dalla riduzione monovalente dell'ossigeno: $\text{O}_2 + e^- \rightarrow \text{O}_2^{\bullet -}$ per reazioni di autoossidazione nelle quali composti come le catecolammine, l'acido ascorbico e le flavine ridotte reagiscono direttamente con l' O_2 ; inoltre la generazione di superossidi è dovuta anche all'azione fagocitaria, svolta nelle cellule aerobiche, attraverso la quale avviene l'uccisione di alcuni batteri o funghi dannosi per l'organismo (SOLDATINI, 1997).

Il radicale perossilico (ROO^\bullet) è dato dall'addizione di ossigeno molecolare a radicali alchilici (R^\bullet) (2), generati dall'estrazione di idrogeno da parte di radicali OOH^\bullet (1) (ALLINGER et al., 1982):



Il termine ROS include, come specie reattive all'ossigeno, anche molecole che non sono radicali, ma derivano egualmente dall'ossigeno: queste molecole sono l'acqua ossigenata (H_2O_2), l'ossigeno singoletto (O_2), l'acido

Dorinda Pellicani

Prof. Maria Rita

ipocloroso (HClO) e l'ozono (O_3). L'acqua ossigenata (H_2O_2) è prodotta da diverse enzimi ossidativi e può generarsi anche per dismutazione del superossido $O_2^{\bullet -}$ da parte della superossido dismutasi (SOD) (SOLDATINI, 1997): $2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. L'ossigeno singoletto (1O_2), agente tossico di grande rilevanza, deriva dall'attività fotosintetica, dalla reazione dell'acqua ossigenata con l'ipoclorito nei fagosomi (3) e per interazione molecolare fra radicali perossidici (4):



I ROS, a livello cellulare, sono molto importanti in quanto esplicano la loro azione degradativa su diversi substrati: DNA, proteine, lipidi e carboidrati.

I ROS inducono possibili fenomeni di mutazione, che possono causare tumori e danni cellulari; sul DNA modificando la struttura e la funzione delle proteine con alterazione delle attività enzimatiche; sui lipidi si possono instaurare fenomeni di perossidazione che modificano la struttura e le funzioni delle membrane; modificazioni nei confronti delle lipoproteine o degenerazioni a livello neurologico e sui carboidrati possono avvenire alterazioni a carico dei recettori.

La catechina (FRANKEL et al., 1993), presente nel vino rosso è stata indicata per essere assorbita, metabolizzata ed escretta raggiungendo concentrazioni sufficienti, in plasma umano, per contribuire ad una certa protezione di LDL in vivo (DONOVAN et al., 1999).

Quindi, in individui con fattori di rischio dell'arteriosclerosi, il consumo di catechina contribuisce alla protezione dei lipidi dalle reazioni deterioramento e di ossidazione che sono legate all'arteriosclerosi.

Studi diversi dimostrano l'assorbimento di flavonoidi e vari polifenoli potrebbe avere effetti antiossidanti e protettivi nel tratto gastrointestinale (TEMPLE, 2000; AZZI et al., 2004). LAU et al. (2006) in un articolo sui mirtili attribuiscono gli effetti benefici agli antociani. Essi sostengono che la loro proprietà antiossidante dovrebbe proteggere il tessuto del cervello da danni ossidativi indotti da vari stress ossidativi come ad esempio l'infiammazione.

Ad ogni modo, gli antociani possono indurre cambiamenti favorevoli alterando il segnale cellulare. SANG et al. (2006) pongono l'attenzione sul tè verde, in particolare sui relativi effetti anticancerogeni che sono stati attribuiti ai

Docente *Paolo*

Giuseppe

composti polifenolici e l'articolo illustra i vari meccanismi di azione che sono stati proposti per spiegare gli effetti e i meccanismi che coinvolgono le chinasi del MAP e del NF- κ B.

Numerosi studi epidemiologici sono stati condotti in merito alla correlazione tra l'assunzione di flavonoidi e il rischio di malattie cardiovascolari (ARTS, VITA, 2005). Questi studi hanno coinvolto la patogenesi di malattie da danno ossidativo e infiammazione, fattori di rischio delle malattie cardiovascolari quali lipidi nel sangue, emocistatina, pressione sanguigna e peso, e marcatori delle malattie cardiovascolari quali funzioni endoteliali.

Per molti di questi i risultati sono diversi e deve ancora emergere un quadro univoco, ma i risultati complessivi indicano che i flavonoidi possono inibire il danno ossidativo in vivo.

I risultati di SCHROETER e coll. hanno dimostrato che l'epicatechina del cacao è il responsabile primario dell'effetto vascolare. Somministrazioni orali di (-)-epicatechina pura hanno evidenziato effetti vascolari sovrapponibili a quelli riferiti alla somministrazione dei flavonoidi del cacao. Questi effetti sono simili a causa dell'aumento di sintesi di NO da parte dei flavanoli. Il cacao contiene epicatechine, ma a più bassa concentrazione, e contiene un'alta concentrazione di altre catechine con struttura simile.

I polifenoli hanno una vasta gamma di proprietà come anti-cancerogeni, anti-tumorali, anti-invecchiamento ed effetti cardio-protettivi (YANG et al., 1997; ZERN et al., 2005).

Pertanto lo scopo principale della presente invenzione è fornire un procedimento studiato ad hoc per isolare polifenoli, segretamente flavonoidi, dai reflui della produzione industriale birriera.

In coda al processo tecnologico di produzione industriale della birra

Guardando l'intero processo di produzione industriale della birra - che qui omettiamo per brevità e perché esso non è oggetto di brevettazione - sotto l'inusuale aspetto della presenza di molecole ascrivibili alla categoria dei polifenoli si osserva che esso rappresenta, fino all'ultimo passaggio della filtrazione chimica con PVP, un perfetto procedimento di selezione e concentrazione di flavonoidi. Infatti le fasi preliminari di fermentazione e filtrazione fisica mistrozzano la presenza di zuccheri e di altri agenti, biotici e abiotici, che possano essere di disturbo al recupero dei flavonoli residuali.

Una caratteristica peculiare dei reflui dell'industria birraria è, da un lato, l'elevata concentrazione in polifenoli e, dall'altro, una concentrazione trascurabile di glucidi e proteidi. La presenza dei primi di questi composti, infatti,

Domenico Pellegrino

Giuseppe

costituisce una grave mortificazione della qualità del prodotto finale in quanto tali sostanze, legandosi alle proteine, pregiudicano la stabilità chimico-fisica della birra, provocando intorbidimenti tanto-proteici (CARRAS P, MARTELLI A., Chimica degli alimenti, Piccin editore).

Quindi una fase importante del processo produttivo è la "stabilizzazione della birra". La stabilizzazione riguarda, in generale, i prodotti e i processi per rendere la birra inalterabile. Con l'aiuto di prodotti per la stabilizzazione vengono rimosse dalla birra le torbidità chimiche (ad es. proteine), biologiche (ad es. lieviti) e altre sostanze in sospensione. In questo modo la birra viene stabilizzata sia dal punto di vista microbiologico che chimico-fisico. Il compito di stabilizzazione della birra viene affidato, ad esempio, grazie alla loro purezza, ai gel di silice ed al polivinilpirrolidone (PVP) che stabilizzano le proteine e i polifenoli. Per operare il recupero di questi substrati chimici di filtrazione questi composti vengono sottoposti a lavaggio con soluzioni alcaline. I reflui di lavaggio confluiscono nel ciclo ecologico dell'acqua, rappresentando un problema di non secondaria importanza, attesa la lentissima biodegradabilità degli stessi reflui a causa dell'elevata concentrazione dei suddetti antiossidanti.

Il processo di recupero

Per quanto detto il filone tecnico-applicativo si inquadra nel vastissimo ambito del trattamento delle acque reflue dell'industria alimentare, con l'obiettivo di recuperare le sostanze antiossidanti ed in particolare i polifenoli. Queste sostanze, infatti, oltre che di ottimo valore sotto il profilo nutracutico, sono responsabili della scarsa biodegradabilità del refluo, in quanto la loro capacità antiossidante ostacola l'azione dei micro-organismi utilizzati nei tradizionali impianti di depurazione, con conseguente loro ridotta efficienza.

Preliminarmente alla fase di messa a punto del procedimento estrattivo si sono compiute numerose e ripetute prove analitiche di laboratorio su campioni di refluo prelevato "tal quale" dagli stabilimenti di produzione con la finalità di individuare presenza e rapporti percentuali delle molecole polifenoliche nella soluzione reflua.

L'analisi qualitativa delle sostanze presenti ha rivelato diverse molecole sventi principi farmacologicamente attivi, quali, ad esempio, Apigenina, Naringenina, 8-Metoxycampferol, Quercetina-3, 3'-dimetiletero, Quercetin-3, 7-dimetiletero, Rutina, (-)-Catechina, (-)-Epicatechina.

La concentrazione media della frazione polifenolica, rilevata in questo refluo che ha le caratteristiche di presentare una viscosità simile all'acqua, una torbidità variabile dal lieve all'intenso ed un colore dal giallo-oro

Domenico Pellegrino

Giuseppe Marchi

al rosso vinoso, totale rilevata è di non meno 5,29 mg/ml di refino liquido tal quale. Orbene, al netto del dato relativo alla concentrazione totale che appare di portata notevole, i risultati qualitativi sono in accordo a quelli relativi a bibliografia scientifica riguardante il contenuto polifenolico di altri vegetali [NAWAZ H, SHI J, GAURI S, MITTAL, KARUDA Y. Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. Separation and Purification Technology 48 (2006) 176-181].

Di seguito si riportano le caratteristiche chimico-terapiche salienti dei composti sopra citati.

Apigenina

Nome I.U.P.A.C.: 5,7-Diidrossi-2-(4-idrossifenil)-4H-1-benzopirani-4-one

- [1] Enhancement of UVB-Induced Apoptosis by Apigenin in Human Keratinocytes and Organotypic Keratinocyte Cultures. ABU-YOUSIF AO et al. Cancer Res, 68(8):3057-3065, 2008.
- [2] Apigenin Prevents UVB-Induced Cyclooxygenase 2 Expression: Coupled mRNA Stabilization and Translational Inhibition. TONG X et al. Mol Cell Biol, 27(1):283-96, 2007.
- [3] Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. LIANG XC et al. Carcinogenesis, 20(10):1945-52, 1999.
- [4] Inhibition of TPA-induced cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by apigenin through downregulation of Akt signal transduction in human keratinocytes. VAN DROSS ET al. Molecular carcinogenesis 44:83-91, 2005.
- [5] Inhibition of mammalian collagenase, MMP-1, by naturally occurring flavonoids. LIM H, and KIM H.P. Planta Med, 73(12):1267-1274, 2007.
- [6] Induction of human UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 by flavonoids: structural requirements. WALLIS UK, WALLIS T. Drug Metab Dispos, 30(5):564-9, 2002.
- [7] Interactions between sulforaphane and apigenin in the induction of UGT1A1 and GSTA1 in CaCo-2 cells. Yanda SYEHLIKOVA et al. Carcinogenesis, 25(9):1629-37, 2004.
- [8] Effect of flavonoids and cynarine from cynara cardunculus L. on liposxygenase activity. BEZAKOVA L. Acta facultatis pharmaceuticae universitatis comenianae Tomus LIV, 2007.

Esempio di effetto: riduzione dello sviluppo del cancro al seno del 50% dei casi osservati

Domenico Palleschi

Giuseppe Hahn

Meccanismo d'azione: l'apigenina inibisce la crescita dell'endotelio vascolare del tessuto amaro.

Naringenina

Nome I.U.P.A.C.: 5,7-diidrossi-2-(4-idrossifenil)eroman-4-one

GOLDWASSER J, et al. (2010) Transcriptional regulation of human and rat hepatic lipid metabolism by the grapefruit flavonoid naringenin: role of PPARα, PPARγ and LXRα. PLoS ONE, pubblicato il 25 agosto. DOI: 10.1371/journal.pone.0012399

Effetto: cura dell'iperlipidemia, del diabete di tipo 2

Meccanismo d'azione: attivazione di una famiglia di piccole proteine, chiamate recettori nucleari, che fanno in modo che il fegato sennoponga gli acidi grassi imitando l'azione di farmaci come il Fenofibrato, un antilipidico, e il Rosiglitazone, un antidiabetico, aumentando due importanti meccanismi biochimico-farmacologici, il PPAR-alfa e il PPAR-gamma, e inibendone un terzo, LXR-alfa

Formula di struttura:

Quercetin

Nome IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)

3,3',4',5',7-pentaidrossiflavone

Quercetin induced apoptosis in association with death receptors and fludarabine in cells isolated from chronic lymphocytic leukaemia patients M RUSSO, C SPAGNUOLO, S VOLPE, A MUPO, I TEDESCO, GI RUSSO British Journal of Cancer advance online publication, July 20, 2010.

Effetto: terapie antileucemiche

Meccanismo d'azione: inibizione del processo di trasformazione di una cellula normale in tumorale, inversione del processo già in atto

Methoxycampherol

3,4',5',7-Tetraidrossiflavone

Vedasi quanto in letterature scientifica per 3,3',4',5',7-pentaidrossiflavone

Rutina

Nome IUPAC 2-(3,4-diidrossifenil)-4,5-diidrossi-3-(3,4,5-triidrossi-6-(3,4,5-triidrossi-6-acetil-ossato-2-

Roberto Pellesso

Roberto Pellesso

BA2013A000013

Dossamenti| essan-2-il|ossi-cromen-7-one

Studio del dott. R. C. ROBBINS, dell'Università della Florida, contro la trombosi. Citato in il libro completo delle vitamine - Gabriele NOFERI, Laura DRAGHI

(-)-Catechina

Formula di struttura della (-)-catechina (flavan-3-olo)

Studio di Norman HOLLENBERG, professore di medicina alla *Harvard Medical School*,

Effetti riduzione del rischio infarto, cancro e diabete.

(-)-Epicatechina

(-)-Epicatechin enhances fatigue resistance and oxidative capacity in mouse muscle. Leonardo NOGUEIRA¹,

Israel RAMIREZ-SANCHEZ^{1,2}, Gay A. PERKINS², Anne MURPHY², Pam R. TAUB², Guillermo

CEBALLOS², Francisco J. VILLARREAL, Michael C. HOGAN¹ and Moh H. MALEK³ - 1 Department of

Medicine, School of Medicine, University of California, San Diego, CA, USA - 2 National Centre for

Microscopy & Imaging Research, and - 3 Department of Pharmacology, La Jolla, CA 92093, USA - 4 Facultad

Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, Sección de Posgrado, Mexico City, Mexico - 5

Integrative Physiology of Exercise Laboratory, Wayne State University, Eugene Applebaum College of

Pharmacy & Health Sciences, Detroit, MI 48201, USA; in M. H. Malek: Wayne State University, Eugene

Applebaum College of Pharmacy and Health Sciences, 359 Mack Avenue, Room 2244, Detroit, MI 48201,

USA. Published online before print July 25, 2011, doi:10.1113/jphysiol.2011.209924. September 15, 2011 The

Journal of Physiology, 589, 4615-4631

Effetti: riduzione delle malattie degenerative e proprietà cardioprotettive

Mecanismo d'azione: ossidazione dei lipidi attraverso l'interazione con i gruppi funzionali polari dei lipidi

DESCRIZIONE DEL PROCESSO DI RECUPERO.

Dalla raccolta del questo refluo di lavaggio prende inizio il procedimento di recupero degli antiossidanti presenti.

Fase 1. Caratterizzazione mediante analisi a campione del refluo in ingresso.

Fase 2. Il primo intervento consiste, quindi, nella neutralizzazione della soluzione di lavaggio. Pertanto si

effettua un trattamento di neutralizzazione acida con l'aiuto, ad esempio, di acido carbonico, che può





essere generato anche nella soluzione stessa mediante gorgogliamento di anidride carbonica nel refluo in trattamento.

Fase 3. Alla fase precedente segue un trattamento di finalizzato alla rimozione della frazione salata inorganica mediante essiccazione, ed eluzione con etanolo dell'essiccato.

Fase 4. In questa fase il processo di estrazione degli antiossidanti prevede che il solvente dell'eluito venga allontanato mediante evaporazione e recuperato per cicli successivi e l'essiccato venga raccolto.

Fase 5. In funzione dell'esito chimico-analitico della fase 1, segnatamente in presenza di tracce di glucidi, può essere utile/necessario procedere alla estrazione delle molecole polifenoliche mediante processo a membrana a stadi combinati comprendenti, dalla sostanza secca di cui alla fase 4 preventivamente idratata, con, a seconda dei casi specifici in dipendenza delle caratteristiche analitiche di dettaglio di cui alla fase 1, microfiltrazione, ultrafiltrazione, nanofiltrazione e osmosi inversa.

La Fase 1 consiste nella speditiva caratterizzazione, ad esempio, con il metodo del reattivo di Folin-Ciocalteu seguito da spettrometria HPLC, delle caratteristiche chimico-organiche del refluo.

La Fase 2 consiste nella aggiunta al refluo di lavaggio, mediante opportune soluzioni bilanciate stochiometricamente, di cariche ioniche in concentrazione idonea a permettere, se necessario, la precipitazione dei relativi sali (come ad esempio sali di carbonato di sodio (Na_2CO_3) e idrogeno-carbonato di sodio (NaHCO_3) nel caso in cui sia stato utilizzato acido carbonico).

La Fase 3 consiste nella essiccazione della soluzione ottenuta in fase 2. Tale fase può considerarsi conclusiva del processo di estrazione delle sostanze antiossidanti in quanto la sostanza secca estratta in questa fase ha già caratteristiche tali da poter essere commercializzata ad esempio nell'industria alimentare dei prodotti da forno. Nel caso in cui occorranò sostanze polifenoliche non in miscuglio con altri sali inorganici bisogna prevedere l'eluzione dell'essiccato con etanolo. Questa operazione consente di separare i sali di sodio sopra citati, che non sono solubili in etanolo, dai polifenoli che oltre che essere idrosolubili passano anche in soluzione alcolica.

La Fase 4 prevede l'evaporazione dell'etanolo in modo da recuperare la sostanza secca residuale.

Tanto, per precisare che l'analisi delle SA contenute nelle refluo è di primaria importanza anche per comprendere i limiti di temperatura entro i quali poter spingere i trattamenti termici. Anche in base a queste

Domenico Pellicani

Giuseppe Motta

caratteristiche potrà essere effettuata la scelta della tecnologia da impiegare.

La fase 5 se prevista in relazione alla qualificazione di cui alla fase 1, può procedere con idratazione della sostanza secca con acqua e successivi passaggi filtranti con processi a membrana semipermeabile, che prevedano l'impiego di membrane per micro-, ultra-, nano-filtrazioni seguite da un stadio terminale di osmosi inversa che assicura da al fine un permeato limpido e purificato, dall'altro un retentato costituito da sostanze intraccettabili.

ESEMPIO APPLICATIVO 1

Impianto per la produzione della birra che ha la necessità di smaltire 10 mc di refluo ogni settimana.

Fase 1) Dalla caratterizzazione del refluo risulta: contenuto di sostanze antiossidanti nel refluo pari allo 0,8 % in peso, pH del refluo pari a pH 12,1.

Fase 2) Saturazione anionica degli ioni NA^- e cationica degli OH^- a mezzo di acido carbonico in soluzione acquosa 0,625 molare.

Fase 3) Trattamento per la rimozione della frazione salina mediante essiccazione a temperatura non superiore a $120^{\circ}C$ per non oltre 5 minuti. Si ottengono 50 kg di sostanza secca. Tale sostanza secca viene eluita con 2 mc di etanolo.

Fase 4) Con evaporazione del solvente viene recuperata la sostanza secca costituita da antiossidanti e da frazioni glucidiche che vengono allontanate con successiva fase 5.

Fase 5) Idratazione della sostanza secca di cui alla fase 4 con 10 mc di acqua e successiva filtrazione a stadi fino alla osmosi inversa. Si ottengono glucidi e glucosidi polifenolici nei primi tre stadi di filtrazioni e polifenoli come retentato nella fase di osmosi inversa.

ESEMPIO APPLICATIVO 2

Impianto per la produzione della birra che ha la necessità di smaltire 3 mc di refluo ogni settimana.

Fase 1) Dalla caratterizzazione del refluo risulta: contenuto di sostanze antiossidanti nel refluo pari allo 0,2 % in peso, pH del refluo pari a pH 11,8.

Fase 2) Saturazione anionica degli ioni NA^+ e cationica degli OH^- a mezzo di acido cloridrico in soluzione acquosa 0,60 molare.

Fase 3) Estrazione della sostanza secca con essiccazione e raccolta dell'essiccato. In questo caso l'essiccato

Domenico Pellegrini 15

Piero...

BA2013A000013

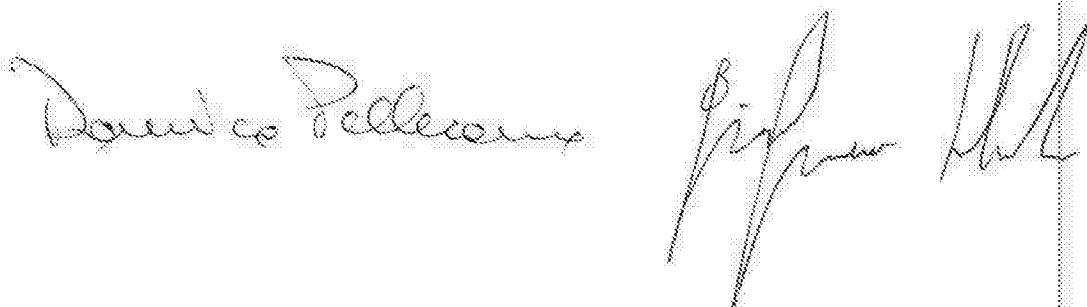
viene avviato alla commercializzazione nell'industria alimentare della parafesione.

Domenico Felbrano

[Handwritten signatures]

RIVENDICAZIONI

1. Processo di estrazione di Sostanze Antiossidanti dal refluo derivante dal processo di produzione della birra che prevede le seguenti operazioni:
 - A. Caratterizzazione chimico-fisica della matrice liquida derivante come refluo dal processo di produzione della birra e del contenuto di sostanze antiossidanti attraverso la quantificazione e la qualificazione della concentrazione per ciascuna molecola antiossidante individuata;
 - B. Trattamento della matrice liquida per raggiungere caratteristiche chimiche e fisiche idonee alle successive lavorazioni con aggiunta di soluzione acquosa acida finalizzata alla neutralizzazione delle cariche ioniche minerali presenti nel refluo di lavaggio.
 - C. Essiccazione della matrice liquida con processi ordinari e successiva eluizione con alcool.
 - D. Evaporazione dell'alcool con procedimenti ordinari per il recupero della sostanza secca antiossidante residuale.
 - E. Idratazione della sostanza secca residuale e successiva micro, ultra, nano-filtrazione seguita da osmosi inversa.
2. Processo come al punto 1 che prevede le sole fasi indicate ai precedenti punti 1.A, 1.B e 1.C senza procedere alla eluizione con alcool dell'essiccato ottenuto.
3. Processo come al punto 1 che prevede le sole fasi indicate ai precedenti punti 1.A, 1.B e 1.C e 1.D senza procedere a quanto indicato al punto 1.E.

The image shows two handwritten signatures in black ink. The signature on the left is written in a cursive style and appears to read 'Domenico Pellegrino'. The signature on the right is also cursive and more stylized, possibly reading 'Piero' followed by a surname.