

# PIATTAFORMA POLIFUNZIONALE PER LA PRODUZIONE DI ANTIOSSIDANTI ED ENERGIA DA SCARTI DEL SETTORE OLIVICOLA-OLEARIO

A. ROMANI<sup>\*§</sup>, D. TACCONI<sup>\*</sup>, F. IERI<sup>§</sup>, P. PINELLI<sup>\*§</sup>

<sup>\*</sup> Laboratorio di Merceologia e Qualità delle Risorse, Facoltà di Economia,  
Università di Firenze

<sup>§</sup> Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Firenze  
[annalisa.romani@unifi.it](mailto:annalisa.romani@unifi.it)

## INTRODUZIONE

Gli innumerevoli studi sulle proprietà salutistiche dell'olio di oliva e sulla sua correlazione con la minor incidenza di rischio cardiovascolare ed oncologico, hanno permesso di attribuire tali effetti al contenuto in composti polifenolici e composti minori polari (CMP) stimolando l'interesse dei ricercatori nei confronti della concentrazione di tali sostanze nei prodotti di scarto quali foglie di potatura, acque di vegetazione e sanse. Il mercato dei prodotti nutraceutici, in continua espansione, ha spinto il settore farmaceutico, della nutrizione e della cosmesi a puntare su matrici naturali ricche di principi attivi, in particolare su quelli di natura polifenolica. I polifenoli costituiscono un insieme di molecole largamente diffuse nel regno vegetale e sono da molto tempo oggetto di interesse e di studi sia scientifici che clinici. Sono presenti in molte matrici, tra cui anche l'olio vergine ed extravergine di oliva al quale questi composti minori polari conferiscono, oltre che un pregio biologico/nutrizionale, un'elevata stabilità all'ossidazione e ne aumentano quindi la shelf-life (Mulinacci et al., 2001). Recenti studi medici e fitofarmacologici hanno evidenziato particolari attività biologiche per i CMP dell'*Olea europaea*, come ad esempio: azione antiossidante ed antiaterogena, azione coronario dilatatrice, attività anticolesterolemica ed attività ipoglicemica. In accordo con i lavori più recenti, possiamo dire che i principali composti polifenolici presenti nell'olio extravergine e vergine di oliva sono: tirosolo ed idrossi-tirosolo, oleuropeina, aglicone e relativi prodotti di idrolisi e/o riarrangiamento, acidi fenolici, apigenina e luteolina (Romani et al., 2002) e che questi sono la minima parte del contenuto polifenolico dell'oliva che viene quindi dilavato dalle acque reflue di frantoio considerata la loro elevata polarità e quindi solubilità in acqua (Balice et al., 1990).

Al momento gli scarti del settore olivicolo oleario rappresentano un problema di ordine economico ed ambientale, essendo destinati solo in parte a fertirrigazione ed il restante a smaltimento. I biofenoli presenti nei reflui, se da un lato sono fitotossici per l'ambiente e inibiscono i processi fermentativi per la produzione di biogas, dall'altro sono molecole ad elevato valore aggiunto per le dimostrate attività biologiche. Lo scopo del lavoro è quello di proporre un nuovo modello di valorizzazione, a ciclo chiuso ed integrato, dove gli scarti di settore olivicolo-oleario possano essere valorizzati per il recupero di componenti bioattivi come fase preliminare della produzione di energia. La potenziale efficacia del modello sta nell'integrazione fra innovazione e sostenibilità, sia nel recuperare scarti ad elevato contenuto in antiossidanti applicabili in campo alimentare, cosmetico e fitoterapico, sia nel poterli riprocessare per l'ottenimento di biogas ed energia da cogenerazione.

## **MATERIALI E METODI**

### **Estrazione, Pretrattamento ed analisi quali-quantitativa dei biofenoli.**

Le acque di vegetazione, dopo un trattamento costituito dalle fasi di preossidazione, centrifugazione, estrazione di biofenoli con tecnologia a membrana e a resina, pretrattamento con colonne a piatti di separazione ed a biomassa adesa, possono essere inviate alle fasi anaerobiche per l'ottenimento di biogas. Il frazionamento ed il recupero di estratti standardizzati è stato effettuato mediante un impianto a membrane ceramiche, oggetto di un brevetto internazionale (WO 2005/123603 A1, ENEA – Verdiana srl), e successivo trattamento su resina per la ulteriore isolamento e purificazione di principi attivi. Allo scopo di standardizzare la biomassa in entrata alle fasi anaerobiche, i polifenoli, composti tossici per i microorganismi metanigeni e biocomponenti da recuperare, sono stati monitorati mediante metodi analitici cromatografici di tipo HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) usando strumenti equipaggiati con DAD (*Diode Array Detector*), MS (*Mass Spectrometry*).

Le analisi quantitative HPLC/DAD dei singoli composti polifenolici presenti negli estratti, sono state effettuate mediante curve di calibrazione ottenute utilizzando standard e/o composti isolati.

**Impianto di cogenerazione di Biogas.** La biodigestione anaerobica per la produzione di biogas, fertilizzanti e cogenerazione, con fase aerobica preliminare (Brevetto FG2008A000004, in estensione come PCT) è stata condotta su reattore a bistadio. Il primo stadio è caratterizzato da reazioni biochimiche che portano alla riduzione delle masse molecolari tramite idrolisi enzimatiche a carico delle sostanze complesse (cellulosiche e polimeriche e molecole organiche ad alto peso molecolare) e reazioni acidofile con formazione di sostanze semplici; questo stadio è caratterizzato da formazione di acidi organici a basso PM (acetico, succinico, propionico, ecc.). Il secondo stadio è definito come metanigeno in quanto si instaura una flora microbica che

utilizza gli acidi organici a basso PM formatesi nel precedente stadio, per formare biogas ed il rapporto tra il primo e secondo stadio di reazione è di fondamentale importanza per la standardizzazione e stabilità di marcia del processo.

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

La piattaforma prevede pertanto fasi di: pre-ossidazione, centrifugazione, estrazione di biofenoli con tecnologia a membrana e a resina, pretrattamento con colonne a piatti di separazione ed a biomassa adesiva, biodigestione anaerobica per la produzione di biogas e fertilizzanti, cogenerazione (Figura 1).

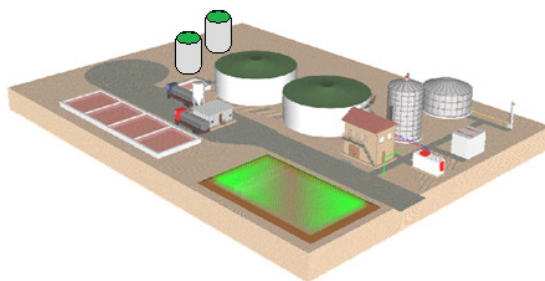
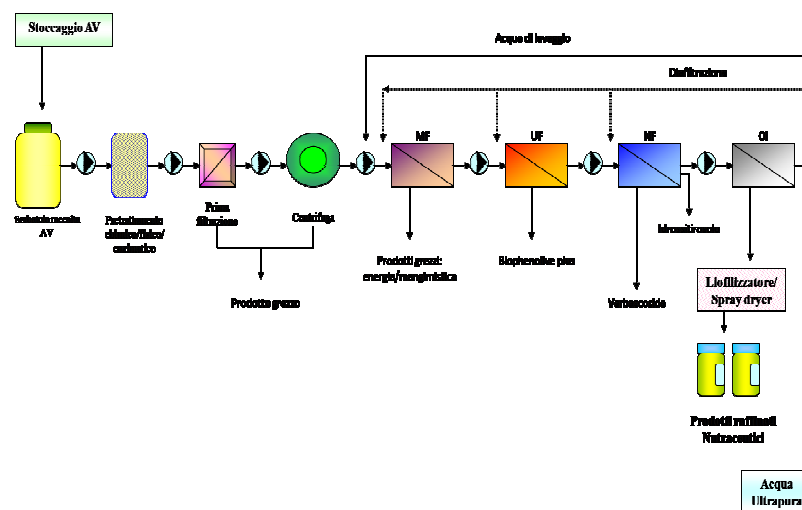


Fig 1 – Piattaforma polifunzionale per la produzione di estratti antiossidanti e biogas da matrici di scarto di *Olea europaea* L., Brevetto FG2008A000004, in estensione come PCT.

Tale piattaforma comprende una fase di biodigestione anaerobica su acque di vegetazione per la produzione di biogas, conforme al processo brevettato AquatecOLIVIA-Verfahren, prevedendo però una fase di pretrattamento dei reflui, che consente la standardizzazione della biomassa in entrata e dell'inoculo necessario per innescare la fermentazione. Il processo di pretrattamento consente inoltre l'ottimizzazione della resa energetica, la continuità produttiva e l'ottenimento di fertilizzanti di pregio, rappresentando così l'innovazione tecnologica rispetto a piattaforme già esistenti. La produzione degli estratti da acque di vegetazione, si basa su un processo di raffinazione fondato sull'impiego di tecnologie separative mediante membrane. La tecnologia estrattiva consente di ottenere: acqua ultrapura, da re immettere nel ciclo produttivo o da destinare al mercato delle bevande funzionali; una frazione grezza derivante da retentato di microfiltrazione, valorizzabile per la produzione di biogas insieme ai sottoprodotti della fase preliminare; tre tipi di estratti differenziati, sia in titolazione che in presenza di molecole a diversa attività ed efficienza biologica e quindi dotati di diverse applicabilità.



Le molecole presenti nelle frazioni a maggiore interesse biologico, sono idrossitirosolo e derivati e verbascoside e derivati. L'idrossitirosolo è un potente antiossidante e cardioprotettivo (Cova et al. 2006; Visioli et al. 1998), è il composto a maggiore attività funzionale presente nell'olio extravergine di oliva. Ritarda l'ossidazione delle LDL (Visioli and Galli, 1998). L'idrossitirosolo ha ridotto l'espressione genica di iNOS e COX-2 in linee cellulari, prevenendo l'attivazione dei fattori di trascrizione NF-KB, STAT-1 $\alpha$  e IRF-1 (Maiuri et al. 2005). Secondo alcuni autori inibisce l'aggregazione piastrinica in vitro (Petroni et al. 1995). In letteratura sono presenti numerosi studi relativi alle attività biologiche di molecole a struttura fenilpropanoidica, circa l'azione antiossidante, antinfiammatoria, antivirale ed antifungina (Daels-Rakotoarison et al. 2000; Deepak, 2000). La maggior parte di tale studi è focalizzata principalmente a valutare gli effetti del verbascoside e acteoside, uno fra i fenilpropanoidi ad oggi più studiato. Il verbascoside ha evidenziato anche attività immunomodulatoria in vitro, in particolare aumenta l'attività chemio tattica dei neutrofili; un effetto opposto è stato osservato all'aumento della dose dovuto principalmente ad una soppressione dell'attività killer dei linfociti neutrofili (Akbay, 2002). Si riportano inoltre anche attività antineoplastiche sia per il verbascoside che per il suo isomero, l'isoacteoside. Da test in vivo, condotti su cellule murine leucemiche P-388, i due fenilpropanoidi hanno dimostrato un'azione citotossica a concentrazione di ED50 pari a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  per l'isoverbascoside e 26  $\mu\text{g}/\text{mL}$  per il verbascoside (Pettit, 1990). Dai risultati ottenuti in laboratorio e dalle analisi preliminari di mercato emerge la possibilità, e al tempo stesso l'interesse, di proporre estratti

da *Olea europaea* in grado di distinguersi rispetto ai prodotti concorrenti sia in termini di molecole presenti (per es. il verbascoside) che di concentrazione delle stesse. In particolare da questa tipologia di estrazione possono essere ottenute tre diverse frazioni da acque reflue e una diverso contenuto in principi attivi proveniente da polpa di olivo denocciolate.

**BPO PLUS:** Idrossitirosolo derivati superiori al 30%, verbascoside e derivati superiori al 5% - Antiossidante, agente cardio-protettivo, antimicrobico, antiinfiammatorio.

**BPO OH-TY:** Idrossitirosolo derivati superiori al 60% - Elevate proprietà antiossidanti, prevenzione del danno ossidativo derivante dall'azione dei radicali liberi, foto protezione contro le radiazioni solari - Elevata attività antiossidante nei confronti di LDL umane; azione preventiva sull'insorgenza dell'aterosclerosi; azione anti-tumorale in vitro.

**BPO ultra:** Verbascoside e derivati superiori al 7% - Elevate proprietà antinfiammatorie, antivirale, antifungina e immunomodulatoria.

**BPO Ultra Red:** antocianosidi (Cy-rut)15-20%, secoiridoidi (Oleur)60-70%, Flavonoidi (Lutglic e Apigglic)10-15, Derivati idrossicinnammici (verbascoside)3-7% - Elevate proprietà coronaroprotettrici e cardioprotettrici Azione vaso protettiva ed attivano alcuni importanti meccanismi di riparazione a livello delle pareti venose. Potenziano il miglioramento della funzione visiva. Indicati nel trattamento dei disturbi circolatori specie di origine venosa e in tutti i casi di fragilità capillare, in particolare a carico della retina.

Tali frazioni potrebbero costituire la base per la formulazioni di nuovi prodotti alimentari, cosmetici e fitoterapici anche a marchio territoriale da diffondere nelle strutture ricettive ed aziende del territorio, con l'ambizione di andare a sostituire l'uso di estratti di origine non mediterranea.

Si riporta come esempio una scheda relativa ad uno dei prodotti sopra elencati.

<b>BPO PLUS</b> concentrato in polifenoli da <i>Olea europaea</i> L.	
<b>Scheda tecnica</b>	
GENERALITA'	Estratto naturale da <i>Olea europaea</i>
CATEGORIA	Antiossidante, agente cardio-protettivo, antimicrobico, antiinfiammatorio
FONTE E METODO DI ESTRAZIONE	Acqua vegetale da molitura di olive frazionata mediante filtrazione a membrana (brevetto ENEA) e concentrata in ultrafiltrazione senza apporto di calore

MOLECOLE ATTIVE	Idrossitirosolo derivati superiori al 30%, verbascoside e derivati superiori al 5%
PREPARAZIONE	Estratto secco in polvere addensanti in maltodestrine al 10%
FORMULAZIONI ALTERNATIVE	Estratto liquido concentrato
PROPIETA' ORGANOLETTICHE	Stato fisico: polvere Consistenza: microgranulare Gusto: amaro, astringente, piacevole Olfatto per via diretta: sentore di olive fresche Vista: polvere omogenea, colore bianco-marrone
SHELF LIFE	Il prodotto si conserva per 24 mesi in luogo fresco asciutto e ventilato, lontano dal calore e dalla luce

IL BIOGAS al 65% di metano prodotto oscillerà per un valore di +/- 50% rispetto ai valori medi

acqua di vegetazione nmc/metano/kg SSV abbattuto = 0,285-0,855  
sansa nmc/metano/kg SSV abbattuto = 0,325-0,975

Il biogas prodotto al 65% di metano alimenta un motore a combustione interna per la produzione di elettricità e termica con i seguenti rendimenti;

-energia elettrica	Kwh/nmc biogas	2,23
-energia termica	Kcal/nmc biogas	3575
Acqua calda 90°c	%	45

La frazione liquida contiene elementi essenziali per la fertilità del terreno ed in particolare contiene in forma solubile il carbonio e l'azoto in gran parte di origine biologica : ciò accresce enormemente il valore fertilizzante del prodotto.

La frazione liquida contiene gli elementi base della fertilità :

- fosforo solubile
- potassio solubile
- microelementi solubili

La frazione liquida viene concentrata con un processo di osmosi inversa realizzata con membrane tubolari. Successivamente per poter arrivare alla concentrazione prevista dal Decreto Legislativo del 26 aprile 2006 N°217 della Repubblica Italiana si procede a una ultima concentrazione termica su evaporatore. Il prodotto finale è: Concime organo minerale NPK, Titolo 12% ( N+P2O5 + K2O ) + 3,0% carbonio organico. Sono eventualmente da prevedersi aggiunte di sostanze a base di N,P,K per raggiungere il titolo. Riferimento Decreto Legislativo N°217/2006 Comma 6.4.1:L'azoto deve essere almeno 2% minerale e 0,3% biologico. Si procede ad una parziale riduzione dell'umidità per trattamento termico su evaporatore. Il prodotto finale è: Concime organo minerale NPK, Titolo 15% (N+P2O5 + K2O) + 7,5%

carbonio organico. Si possono prevedere formulazioni a concentrazione di unità fertilizzante diversa : ciò si ottiene variando il processo di concentrazione della matrice liquida o solida.

## CONCLUSIONI

Il presente lavoro ha la potenzialità di presentare una serie di ricadute economico- ambientali di ampio profilo. L'aspetto innovativo della piattaforma consiste nell'applicazione di un nuovo modello di valorizzazione, a ciclo chiuso ed integrato, in grado di potenziare l'uso di scarti oleari e di altri comparti agro-industriali. Gli sviluppi di questo lavoro prevedono l'ottimizzazione di piattaforme polifunzionali non solo per aree industriali sostenibili ma anche per il possibile utilizzo di entrambi i vettori energetici sia in aree residenziali che in aree urbane dedicate, sino a poter servire comuni di provincia di media densità. L'impianto integrato, già esistente per la produzione di biogas in Grecia ed in Spagna, è in costruzione in tre diverse zone italiane in collaborazione con attività finanziate dalle aziende RACE, OPTIMA e RaceMed e consentirà la valorizzazione del vettore elettrico e termico attraverso tecnologie di cogenerazione a biogas e di trigenerazione, progettate e personalizzate anche in ambito di progetti finanziabili dallo stesso Ministero dell'Ambiente, in recenti bandi pubblici. La parziale piattaforma di pretrattamento e estrazione di polifenoli e il loro mercato in ambito food e farmaceutico, è inoltre in progettazione e costruzione nell'ambito di attività di ricerca e sviluppo industriale in collaborazione con l'azienda Leadergy ed ENEA-Casaccia Roma. Lo sviluppo futuro di tale proposta è pertanto quella di conferire un sostanziale valore aggiunto ad eventuali percorsi intrapresi a livello territoriale in termini di innovazione tecnologica, sostenibilità produttiva e di tutela della qualità della vita.

## BIBLIOGRAFIA

- Akbay P, Calis I, Undeger U, Basaran N, Basaran AA. In vitro immunomodulatory activity of verbascoside from *Nepeta ucrainica* L. *Phytother. Res.* 2002; 16: 593.
- Balice V., Carrieri C., Cera O. (1990) Caratteristiche analitiche delle acque di vegetazione. Nota I, *Rivista Italiana Sostanze Grasse*, vol. 67, pp. 9-16.
- Covas M.I. et al. (2006) The effect of polyphenols in olive oil on hearth disease risk factors. *Annals of Internal Medicine*.
- Daels-Rakotoarison DA, Seidel V, Gressier ., Brunet C, Tillequin F, Bailleul F, Luyckx M, Dine T, Cazin M, Cazin JC. Neurosedative and antioxidant activities of phenylpropanoids from *Ballota nigra*. *Arzneimittelforschung* 2000; 50: 16.
- Deepak M, Handa SS. Antiinflammatory activity and chemical composition of extracts of *Verbena officinalis*. *Phytother. Res.* 2000; 14: 463.
- Maiuri MC. , De Stefano D., Di Meglio P. , Irace C. , Savarese M., Sacchi R., Cinelli M.P., Carnuccio R. (2005) Hydroxytyrosol, a phenolic compound from virgin olive oil, prevents

macrophage activation. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, Springer, pp. 457-465.

Mulinacci N., Romani A., Pinelli P., Galardi C., Vincieri F.F.(2001) Acque reflue da frantoio: analisi HPLC/DAD ed HPLC/MS dei polifenoli presenti, *Ricerche e innovazioni nell'industria alimentare*, volume IV, Pinerolo, Chiriotti Editore, p. 1081.

Petroni A., Blasevich M., Salami M., Papini N., Montedoro G. F., : Galli C. (1995) Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thrombosis Research*, Apr. 15, 78(2), pp. 151-60.

Pettit GR, Numata A, Takemura T, Ode RH, Narula AS, Schmidt JM, Cragg GM, Pase CP. Antineoplastic agents, 107. Isolation of acteoside and isoacteoside from *Castilleja linariaefolia*. *J Nat Prod*. 1990; 53: 456.

Romani A., Mulinacci N., Galardi C., Cassiani C., Innocenti M., Giaccherini C., Vincieri F.F. (2002) Varietà di olive, maturazione del frutto e qualità dell'olio. *Ricerche e innovazioni nell'industria alimentare*, volume V, Chiriotti Editore, Pinerolo 2002, p. 374.

Visioli F. and Galli C. (1998) Olive Oil Phenols and Their Potential Effects on Human Health. *J. Agric. Food Chem.*, 46 (10), pp. 4292–4296.

Visioli F., Bellomo G., Galli C. (1998) Free Radical scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Elsevier.

## RIASSUNTO

Nell'ambito delle attività volte alla valorizzazione e all'innovazione del settore olivicolo oleario, è stata progettata e ottimizzata una piattaforma industriale polifunzionale a ciclo chiuso per il recupero di antiossidanti e la produzione di biogas da scarti di *Olea europaea*. I biofenoli presenti nei reflui, se da un lato sono fitotossici per l'ambiente e inibiscono i processi fermentativi per la produzione di biogas, dall'altro la dimostrata attività biologica ne favorisce il recupero come chemicals ad elevato valore aggiunto. La piattaforma prevede pertanto le fasi di: pre-ossidazione, estrazione di biofenoli con tecnologia a membrana (brevetto ENEA), biodigestione anaerobica per la produzione di biogas da cogenerazione e fertilizzanti, con fase aerobica preliminare (Patent in estensione come PCT). Il recupero di polifenoli, l'ottimizzazione in termini di resa in biogas e continuità produttiva e l'interazione tra alta tecnologia e sostenibilità ambientale ed economica, rendono tale piattaforma altamente innovativa rispetto ad impianti di produzione di biogas da acque reflue già esistenti (es. Spagna e Grecia), in termini di innovazione tecnologica, di qualità dei prodotti e di sostenibilità economico-ambientale.

## SUMMARY

### INDUSTRIAL PRODUCTION OF BIOGAS, ENERGY AND NEW ANTIOXIDANTS FROM OLIVE OIL WASTE WATER

*In the field of activities aimed at the exploitation and innovation of the olive oil sector, has been designed and optimized an industrial closed cycle platform for the recovery of antioxidants and the production of biogas from Olive oil waste waters. Polyphenols are phytotoxic for the environment and inhibit the fermentation processes for the production of biogas but, at the same time, the biological activity promotes the recovery as chemicals with high added value.*

*Preliminary pre-oxidation, extraction of polyphenols with membrane technology (patent ENEA), bio-digestion process to obtain biogas (as a fuel for cogeneration) and fertilizer. The recovery of polyphenol compounds, the biogas productivity, the continuous process and the interaction between high technology and environmental and economic sustainability, making this platform highly innovative compared other plants already existed (Spain and Greece).*