



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE  
NATURALI E AMBIENTE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN SCIENZE E TECNOLOGIE PER  
L'AMBIENTE E IL TERRITORIO

TESI DI LAUREA MAGISTRALE:

**Contenuto di polifenoli nelle acque reflue di frantoio  
e loro possibile utilizzo nel controllo sostenibile  
della mosca dell'olivo (*Bactrocera oleae*)**

RELATORE: **PROF. ANDREA TAPPARO**

LAUREANDO: **GIANMARCO STORTI**

MATRICOLA N. **2052457**

**ANNO ACCADEMICO 2022/2023**



# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 OLEA EUROPAEA .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2 PRODUZIONE DELL'OLIO DI OLIVA .....</b>	<b>11</b>
1.2.1 Defogliazione e lavaggio .....	11
1.2.2 Frangitura e gramolatura.....	14
1.2.3 Estrazione e separazione .....	16
1.2.4 Acque reflue di frantoio .....	18
1.2.5 Composti fenolici nelle acque di vegetazione .....	20
<b>1.3 MOSCA DELL'OLIVO.....</b>	<b>24</b>
1.3.1 Ovodeposizione.....	24
1.3.2 Batterio simbiote di <i>B. oleae</i> .....	25
1.3.3 Lotta contro la mosca.....	26
<b>1.4 SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>27</b>
<b>2. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI.....</b>	<b>29</b>
2.1.1 Acque di vegetazione.....	29
2.1.2 Soluzioni standard di calibrazione.....	29
2.1.3 Reagenti .....	30
2.1.4 Strumentazione HPLC .....	30
2.1.5 Estrazione e purificazione .....	30
2.1.6 Calibrazione strumentale.....	31
<b>2.2 CARATTERIZZAZIONE DELLE ADV .....</b>	<b>32</b>
2.2.1 Metodo cromatografico HPLC-DAD .....	32
<b>2.3 SEPARAZIONE E RACCOLTA DEI POLIFENOLI .....</b>	<b>33</b>
2.3.1 Metodo HPLC-PREP 1, per la raccolta dei 5 polifenoli .....	33
2.3.2 Metodo HPLC-PREP 2, specifico per la raccolta di HT e T.....	35
<b>2.4 TEST DI DEGRADAZIONE DEI POLIFENOLI .....</b>	<b>36</b>

2.4.1 Degradazione nel solvente.....	36
2.4.2 Degradazione a secco .....	36
<b>3. RISULTATI E DISCUSSIONI.....</b>	<b>37</b>
<b>3.1 DETERMINAZIONE DEI POLIFENOLI .....</b>	<b>37</b>
3.1.1 Procedura di estrazione e purificazione.....	38
3.1.2 Caratterizzazione delle ADV Riva del Garda 2021 .....	41
<b>3.2 SEPARAZIONE E RACCOLTA DEI POLIFENOLI.....</b>	<b>45</b>
3.2.1 Raccolta dei polifenoli.....	45
3.2.2 Raccolta specifica di Idrossitirosolo e Tirosolo .....	48
<b>3.3 DEGRADAZIONE DEI POLIFENOLI .....</b>	<b>49</b>
3.3.1 Degradazione nel solvente .....	49
3.3.2 Degradazione a secco (senza solvente).....	51
<b>4. PROSPETTIVE FUTURE.....</b>	<b>55</b>
<b>4.1 TEST FUTURI SULLA MOSCA DELL'OLIVO.....</b>	<b>55</b>
4.1.1 Allevamento.....	55
4.1.2 Prova di ovideterrenza .....	56
4.1.3 Minimal Inhibitory Concentration (MIC).....	56
<b>4.2 ANALISI DELLA COMPONENTE VISCOSA DELLE ADV .....</b>	<b>58</b>
<b>4.3 DEGRADAZIONE DEI POLIFENOLI IN CAMPO .....</b>	<b>59</b>
<b>5. CONCLUSIONI.....</b>	<b>61</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>63</b>
<b>7. SITOGRAFIA .....</b>	<b>65</b>
<b>8. RINGRAZIAMENTI .....</b>	<b>66</b>

# 1. INTRODUZIONE

In Italia la coltivazione dell'ulivo e la produzione di olio d'oliva è sempre stata, fin dall'antichità, un'importante risorsa agricola ed economica. Infatti, oggi il settore olivicolo italiano è il secondo esportatore globale dopo la Spagna e il primo importatore di olio, in quanto, condimento principe della dieta mediterranea e della cucina italiana. Secondo il Consiglio per la Ricerca in agricoltura e l'analisi dell'Economia Agraria [CREA, 2022], in Italia ci sono un milione di ettari di superficie olivetata, gestita da 827 mila aziende agricole (localizzate principalmente in Puglia, Calabria, Sicilia, Campania, Abruzzo, Lazio e Umbria) dagli elevati standard qualitativi (42 DOP e 7 IGP per oli di oliva e 4 DOP per olive da mensa) e dalla forte caratterizzazione territoriale (oltre 500 cultivar). Nel 2022, osservando i dati ISTAT, si può notare che la produzione di olive da olio è stata di quasi 3 milioni di tonnellate con un quantitativo totale di olio di più di 400 mila tonnellate, circa il 13% della produzione mondiale. La diversa orografia del territorio italiano fa sì che siano state selezionate nel tempo molte varietà di ulivi diversi. Ad esempio, nel Veneto si suddividono in tre zone: Valpolicella, Euganei/Berici e del Grappa [AIPO, 2016].

**Zona Valpolicella:** più del 50% delle varietà sono Grignano e Favarol seguito poi da Leccino, Frantoio, Maurino, Pendolino, Leccio del Corno e Trep.

- La varietà Grignano è una pianta inizialmente assurgente, prende facilmente una forma razionale grazie al peso dei frutti che piegano i rami, legno di colore verde che si spacca facilmente. La foglia è di colore generalmente verde scuro, spessa, lucida, con estremità tondeggianti. Il frutto è relativamente grosso, rotondeggiante; di colorazione nera quando la pianta ha pochi frutti, violacea quando è carica. Molto delicato alle manipolazioni e quindi è preferibile effettuare la molitura già il giorno stesso. Produttività medio-elevata e costante. La maturazione è costante (si verifica dopo quella del Leccino) con frutto di 3-5 grammi. L'olio è molto aromatico, resa medio-bassa (10-14%). È una pianta autosterile, quindi è necessaria l'impollinazione incrociata. Questa varietà è la più resistente al freddo, resiste molto alla siccità, alla rogna e al cicloconio, particolarmente sensibile agli attacchi di mosca e carie (**Figura 1.1 e 1.2**).



*Figura 1.1 – Foglie della varietà di ulivo Grignano [foto presso vivaio Gozzo (VR), 2023]*



*Figura 1.2 – Olive della varietà di ulivo Grignano [AIPO, 2023]*

- La Favarol è un tipo di pianta assurgente a sviluppo ridotto che si allarga da sola, è la più vecchia pianta conosciuta nella provincia di Verona. La foglia è di piccole dimensioni, ovale, verde carico o lucido, a volte si intravedono delle sfumature rossicce nella pagina inferiore. Il frutto è medio piccolo ovale e schiacciato; ha una produttività alternante dal fatto che il secondo anno non genera fiori. La maturazione è media-tardiva. L'olio è di ottima qualità con ottime rese. È una varietà che resiste bene al freddo e alla rogna, è una delle poche varietà che non vengono danneggiate dalla mosca, resiste poco alla siccità, sensibile al cicloconio (**Figura 1.3 e 1.4**).





*Figura 1.3 – Foglie della varietà di ulivo Favarol [foto presso vivaio Gozzo (VR), 2023]*



*Figura 1.4 – Olive della varietà di ulivo Favarol [AIPO, 2023]*

**Zona Euganei/Berici:** più del 50% delle varietà sono Leccino e Rasara seguiti da Frantoio, Maurino, Pendolino, Marzemino, Riondella, Trep e Matosso.

- Il Leccino è una varietà di pianta con caratteristiche globali simmetriche, che risulta sempre ordinata, di colore generalmente chiaro. La foglia è ovale con una punta all'apice, internodi brevi. Il frutto matura a grappolo precocemente, perciò, viene chiamata anche "Moretta", di forma ovale schiacciata agli estremi.

Anch'essa è autosterile. È resistente al freddo, alla rogna e al cicloconio, più sensibile alla fumaggine (**Figura 1.5 e 1.6**).



*Figura 1.5 – Foglie della varietà di ulivo Leccino [foto presso vivaio Gozzo (VR), 2023]*



*Figura 1.6 – Olive della varietà di ulivo Leccino [AIPO, 2023]*

- La Rasara è una pianta particolarmente vigorosa la chioma è ampia e folta con foglie ovali. I frutti raccolti tra ottobre e novembre non sono ancora invaiati e presentano colorazione verde e nero-violacea, hanno una buona resa di olio. La maturazione è tardiva e scalare. Per quanto riguarda l'impollinazione è autofertile e ha una bassa alternanza di produzione. È una varietà che sopporta bene il freddo (**Figura 1.7 e 1.8**).





**Figura 1.7** – Foglie della varietà di ulivo Rasara [foto presso vivaio Gozzo (VR), 2023]



**Figura 1.8** – Olive della varietà di ulivo Rasara [AIPO, 2023]

**Zona del Grappa:** le varietà maggiormente presenti sono Frantoio e Leccino seguiti da Grignano, Pendolino, Maurino, Leccio del Corno e Padanina.

- La varietà Frantoio ha delle caratteristiche del tutto simili alla varietà Casaliva presente maggiormente nella zona del Garda, ovvero è una pianta che si presenta pendula, ramificazione non fitta e vigoria elevata. La foglia è grande e allungata con un verde intenso. La caratteristica del frutto è di avere dei punti bianchi, peduncolo molto lungo e raramente completa la maturazione diventando scura (**Figura 1.9 e 1.10**).

L'olio è di ottima qualità profumato, leggero, fine e con ottime rese. È una pianta autofertile e molto sensibile alla rogna, al freddo, alla mosca e al cicloconio.



**Figura 1.9** – Foglie della varietà di ulivo Frantoio [foto presso vivaio Gozzo (VR), 2023]



**Figura 1.10** – Olive della varietà di ulivo Frantoio [AIPO, 2023]

L'Associazione Interregionale Produttori Olivicoli [AIPO] mostra come le varietà presenti in Veneto sono moltissime e quasi tutte diverse fra di loro, soprattutto per quanto riguarda la resistenza a condizioni sfavorevoli, la fertilità e la quantità/qualità di olio.

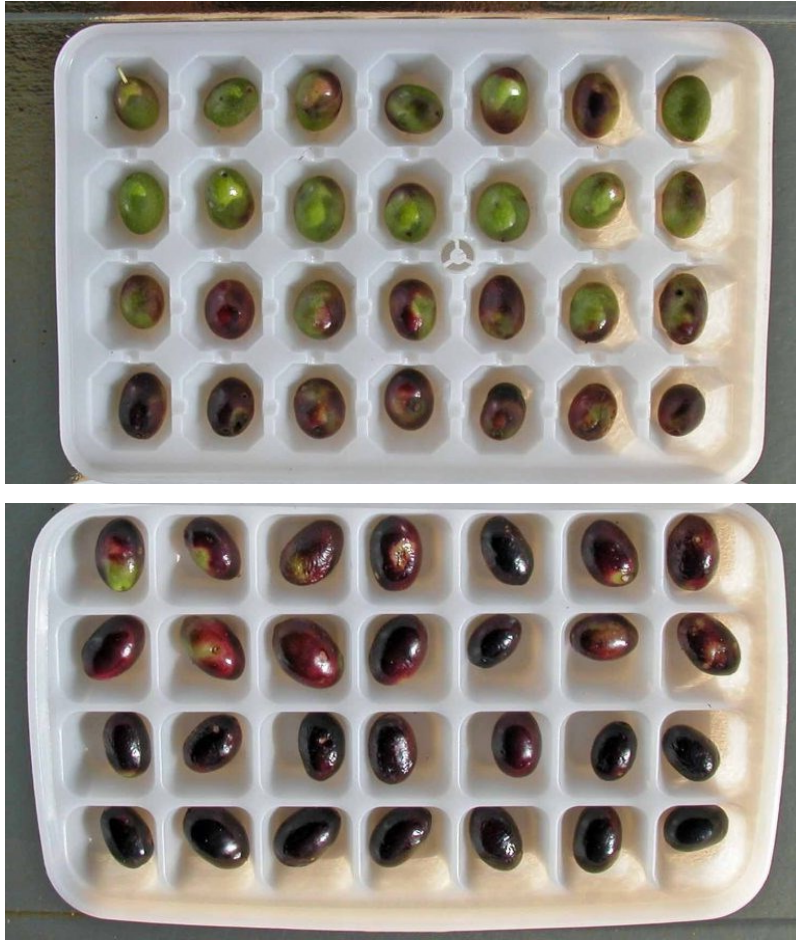
## 1.1 OLEA EUROPAEA

L'olivo appartiene alla famiglia delle *Oleaceae* è una specie arborea sempreverde con ampia chioma a comportamento cespuglioso, in quanto sviluppa rami dal basso. Le foglie, che si rinnovano ogni tre anni, sono di colore verde più scuro nella pagina superiore e più chiaro in quella inferiore. All'ascella di ogni foglia si sviluppa una gemma che potrà evolvere in infiorescenza o germoglio. I fiori sono di piccole dimensioni e riuniti in infiorescenze, che sbocciano a maggio. La corolla è formata da quattro petali bianchi saldati alla base. Il frutto è una drupa (oliva) di dimensioni e colore diversi a seconda della varietà. Con peso variabile fra i 2 e 20 g, l'esocarpo (buccia) in base alla maturazione, che avviene tra ottobre e novembre, vira dal verde al viola quasi nero. Il mesocarpo (polpa) è morbido e ricco di sostanze grasse (30% di olio). I semi sono racchiusi da un endocarpo molto duro per proteggerli. Il ciclo fenologico della pianta di olivo inizia in primavera con l'aumento delle temperature, condizione che permette la ripresa vegetativa delle gemme e successivamente la comparsa dei fiori.

Il ciclo si conclude con la maturazione dei frutti che inizia a settembre con l'invaiaitura, vale a dire con una colorazione più chiara dell'epidermide e la comparsa delle prime macchie brune intorno alla zona apicale (**Figura 1.11**). Le macchie si estendono rapidamente, mentre la polpa diventa progressivamente vinoso, perdendo consistenza e accumulando olio. Vengono riconosciuti quattro stadi di maturazione delle olive:

- 1) 50% dei frutti con chiara invaiatura a livello di buccia;
- 2) 100% dei frutti con chiara invaiatura a livello di buccia;
- 3) 50% dei frutti con chiara invaiatura della polpa;
- 4) 100% dei frutti con chiara invaiatura della polpa.





*Figura 1.11 - Invaiaatura delle olive (Giornale di olivicoltura e pensiero circolare) [Antonucci Marco, 2022]*

Relativamente al ciclo produttivo dell'olivo è opportuno segnalare il ricorrente fenomeno dell'alternanza di produzione, vale a dire il susseguirsi di annate a elevata produzione con annate caratterizzate da scarsa produzione. Le cause sono principalmente fisiologiche: nell'anno a elevata produzione gran parte delle sostanze nutritive vengono destinate ai frutti rispetto alla differenziazione delle gemme. Nell'annata successiva la produzione sarà inferiore, con un maggior accumulo di riserve nutritive e una maggior differenziazione di gemme. Altre cause possono essere dovute a avversità climatiche, stress parassitari, nutrizionali e pratiche colturali non ottimali.

La raccolta, come già descritto, deve avvenire nel periodo di invaiatura. Per produrre olio con le migliori caratteristiche organolettiche, la raccolta deve avvenire al primo e secondo stadio. L'epoca di raccolta dipende dalla latitudine: al Nord Italia inizia nel periodo di settembre; al Centro da ottobre e al Sud ancora più tardivamente. La raccolta può essere manuale oppure meccanica. I sistemi tradizionali prevedono, per le olive da mensa, la tecnica detta "brucatura" dove il raccogliatore accarezza il ramo fruttifero e raccoglie i frutti per deporli nelle ceste;

si può quindi scegliere il momento adatto, essere molto delicati e non danneggiare i frutti. Per quanto riguarda le olive da olio la tecnica manuale più utilizzata è la “pettinatura” dove i rami fruttiferi vengono accarezzati con strumenti detti “pettini” lasciando cadere i frutti su teloni o reti predisposti sotto le piante. Al giorno d’oggi le operazioni meccaniche hanno sostituito quelle manuali, quindi, in questo ambito si utilizzano macchine scuotitrici che si agganciano al tronco, lo scuotono e fanno cadere sopra i teli più del 90% delle olive.

Su un ciclo vitale ipotizzabile di circa 40-50 anni, la piena produzione viene raggiunta dal decimo anno, quando una singola pianta è in grado di produrre circa 15/50 kg di olive. La produzione media è di 4-5 t/ha di drupe, con una resa in olio di circa il 20% [Bocchi S. *et al.* 2014].

I diversi parametri di qualità degli oli prodotti con olive sono indicati nel Regolamento CEE 2568/91. I costituenti maggiori di una sostanza grassa destinata agli alimenti sono composti di origine gliceridica, con predominanza dei trigliceridi (fino al 95%), seguiti dai digliceridi (diacilgliceroli) circa 2-3% e piccole quantità di acidi grassi liberi, monogliceridi, glicolipidi e fosfolipidi. Per quanto riguarda la parte proteica sono presenti i seguenti aminoacidi in ordine decrescente: Arginina, Alanina, Glicina, Leucina, Prolina, Acido Aspartico e Acido Glutammico. I carboidrati presenti sono principalmente la cellulosa e l’emicellulosa, pari a circa il 3-6% del peso della polpa; pectine, per l’1,5% che vengono idrolizzate durante il processo di maturazione e zuccheri riduttori solubili (glucosio, fruttosio, mannosio e galattosio) (**Tabella 1.1**).

La qualità alimentare (intesa come l’insieme delle caratteristiche individuabili, intrinseche o estrinseche, di un alimento in grado di soddisfare i bisogni psicofisiologici del consumatore) è quindi significativa per determinare il grado di accettazione di un prodotto. Per l’olio essa è legata a molti caratteri riconoscibili con la tecnica dell’analisi sensoriale. L’olio d’oliva viene ottenuto con un processo meccanico, quello della semplice pressione/spremitura a freddo che non altera la composizione del frutto; ciò significa che tutti i più importanti componenti della drupa (come acidi grassi, composti fenolici, la vitamina E, il beta-carotene, la clorofilla) rimangono nel prodotto finale. Gli acidi grassi essenziali sono precursori nel nostro corpo di importanti molecole di regolazione di processi fisiologici [Lercker G. e Toschi T.G., 2005].



Tabella 1.1 - Composizione chimica e valore energetico delle olive (per 100 g di parte edibile) [INRAN, 2007]

Numero codice	ALIMENTI	Parte edibile		Acqua	Proteine	Lipidi	Carboidrati	Amido	Zuccheri solubili	Fibra alimentare	Energia		Potassio	Ferro	Calcio	Fosforo	Tiamina	Riboflavina	Niacina	Vit. A ret. eq.	Vitamina C	Vitamina E
		%	g	g	g	g	g	g	g	g	kcal	kJ	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg	µg	mg
008820	Olive verdi	84	76,8	0,8	15,0	1,0	0	1,0	3,0	142	594		1,6	64	14	0,03	0,08	0,50	48	tr		
008830	verdi in salamoia	78	78,0	1,2	11,0	1,0	0	1,0	2,8	108	450											
008800	Olive da tavola conservate	83	58,0	1,5	27,0	5,0	0	5,0	4,4	268	1120		3,5	70	25	0	0,10	1,20	30	tr		
008810	nere	74	68,6	1,6	25,1	0,8	0	0,8	3,9	235	984		1,6	62	18	0,10	0,10	1,00	15	tr		

## 1.2 PRODUZIONE DELL'OLIO DI OLIVA

L'epoca di raccolta delle olive avviene, come già descritto nei mesi autunnali, con l'invasatura parziale o completa della buccia. Una volta raccolte le olive è consigliato portarle al frantoio il prima possibile per non aumentare il grado di acidità nell'olio e quindi disprezzarne la qualità. In seguito, viene descritto il procedimento di lavorazione del "Frantoio Fornaro" a Montecchia di Crosara (VR) dove sono state raccolte parte delle acque di vegetazione utilizzate nella parte sperimentale. La famiglia Fornaro, da sempre impegnata nella coltivazione delle olive, ha scelto di offrire la possibilità ad ogni produttore, anche piccolo, di ottenere il proprio olio frutto delle proprie olive. Il frantoio è affiancato a moltissimi produttori del veronese, del vicentino ma anche del padovano, il motivo principale è dovuto all'impianto Molinova Serie Oro ad oggi il migliore della gamma Pieralisi che permette una lavorazione partitaria, continua, controllata e automatizzata. La lavorazione partitaria è stata pensata per separare l'olio di ogni singola partita dalle altre in modo tale da garantire la purezza e la resa effettiva di ogni singolo produttore. Nella **Figura 1.12** viene riassunta la procedura di lavorazione dell'olio d'oliva con tutti i passaggi suddivisi nel metodo a due fasi e a tre fasi. Nel processo tutto inizia con la raccolta, poi si ha la defogliazione e lavaggio, a seguire la frangitura e gramolatura e infine l'estrazione e la separazione.

### 1.2.1 Defogliazione e lavaggio

Igiene e pulizia delle olive sono prerequisiti essenziali per ottenere un olio di qualità. Ad oggi i moderni sistemi di raccolta, impostati per ridurre il tempo, comportano un incremento di rametti, foglie, terriccio e altre impurità presenti nei cassoni delle olive portati al frantoio che potrebbero compromettere la genuinità e le caratteristiche organolettiche dell'olio, ma anche causare danni o precoci usure ai macchinari. La partita di olive inizialmente viene pesata per ottenere i chilogrammi totali di olive che poi serviranno per il calcolo della resa finale. Il processo inizia versando le olive dei cassoni nella tramoggia in acciaio inossidabile con capienza di 600 litri collegata ad un elevatore a nastro (**Figura 1.13**).

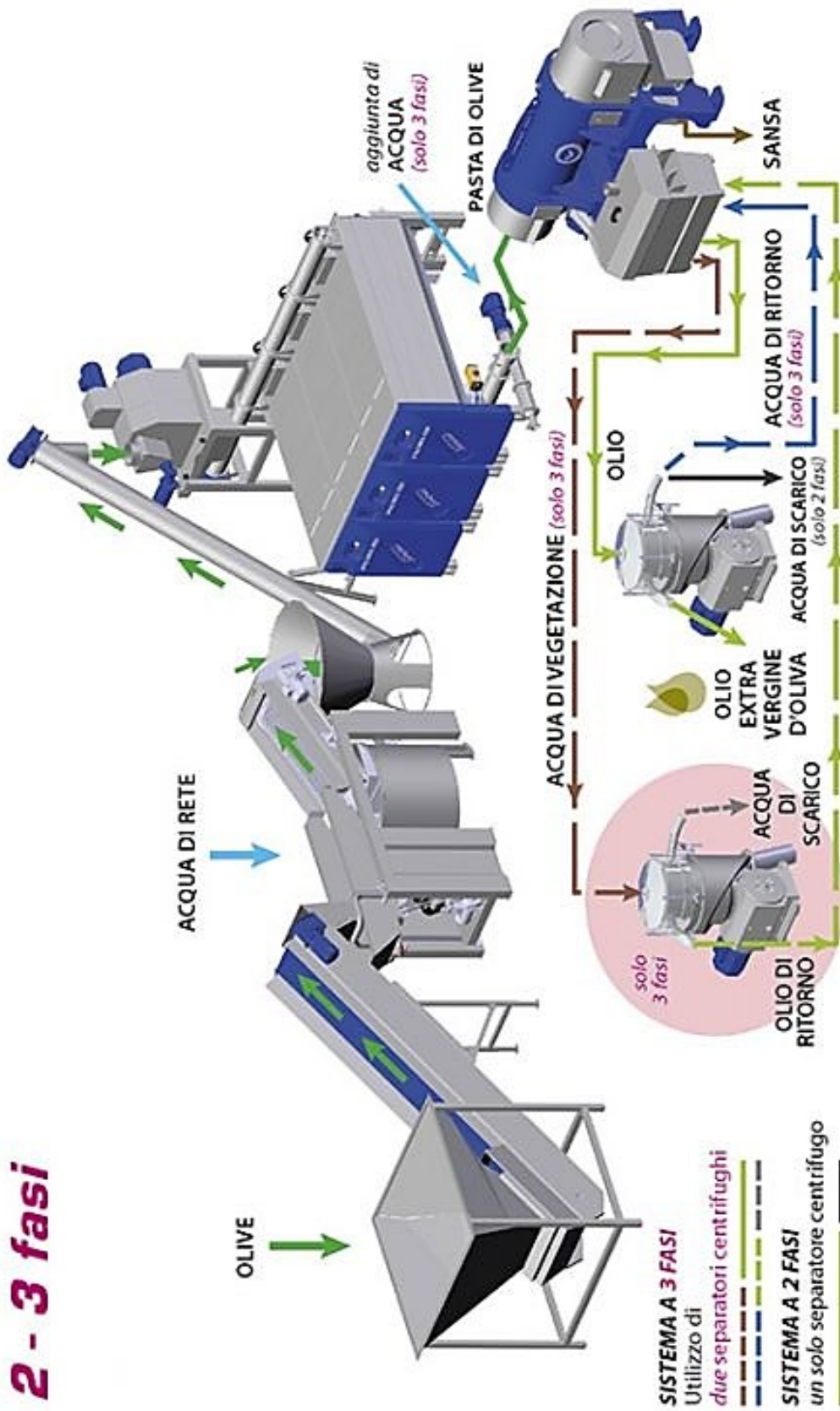


Figura 1.12 – Scema di lavorazione per la produzione di olio d'oliva [Pieralisi]

L'elevatore a nastro è composto da telaio tubolare in acciaio e dal tenditore di tensione del nastro con capacità di defogliazione regolabile. Inoltre, il nastro è realizzato in gomma antiacida per uso alimentare ed è provvisto di uno speciale rullo con spazzole che mantiene puliti i listelli per il trasporto delle olive. La progettazione con rulli autocentranti inoltre consente una maggiore durata del nastro nel tempo riducendo così i costi di gestione del frantoio.

Il deramifogliatore utilizzato per rimuovere rami e foglie è concepito e costruito per evitare, al passaggio delle olive, qualsiasi urto e contatto delle stesse con parti metalliche, evitando anche la dispersione di olio (**Figura 1.14**). Il lavaggio unitario delle olive avviene grazie al getto d'aria continuo che mantiene la drupa in sospensione nell'acqua. In questo modo le olive vengono lavate una ad una senza venire a contatto con le parti metalliche. I residui solidi (sassi e rami) vengono depositati per gravità e grazie all'impianto automatico di ribaltamento della vasca di lavaggio vengono rimossi. Infine, avviene il lavaggio finale totale grazie alla doccia, dotata di particolari ugelli e collocata sull'esclusivo nastro trasportatore a listelli inclinato, così da eliminare ogni forma di contaminazione da elementi estranei al frutto. L'inclinazione speciale del nastro limita al massimo la quantità dell'acqua presente nell'oliva, esaltando così la qualità dell'olio nella successiva frangitura.



*Figura 1.13 – Tramoggia*



*Figura 1.14 – Deramifogliatore collegato con il frangitore*

## 1.2.2 Frangitura e gramolatura

I processi di frangitura e gramolatura sono i più delicate del processo di produzione dell'olio d'oliva. La qualità dell'olio, lo sviluppo degli aromi e la resa estrattiva dipendono dalla tipologia di frangitura e dalla successiva fase di gramolatura. Il frangitore deve assicurare una frantumazione delle olive per i seguenti motivi:

- liberare maggiori quantità di olio e di sostanze minori;
- rompere in maniera adeguata il nocciolino per ottenere la giusta pezzatura dei frammenti dell'endocarpo che garantiscono una gramolatura più efficace e un'estrazione centrifuga più efficiente;
- ridurre l'ossidazione della pasta (perossidi ridotti).

Il metodo tradizionale con le macine e le presse sta scomparendo, in quanto la frangitura e la gramolatura non avvengono in condizioni controllate. Temperatura, sostanze ossidanti, luce, contaminazioni fungine e batteriche potrebbero compromettere le qualità organolettiche e soprattutto la conservabilità del prodotto finale. Il frangitore utilizzato ha una griglia rotante a 2800 giri/min e griglia controrotante che favorisce l'uscita della pasta riducendo il numero di perossidi nell'olio dovuto al continuo sfregamento della polpa con il metallo.



Le griglie con fori svasati sono facilmente intercambiabili e sono disponibili con fori variabili da diametro da 5 mm fino a 8 mm con variazioni di 0,5 mm a seconda delle dimensioni delle olive e, eventualmente, dal diverso gusto dell'olio di oliva richiesto. La forma dei martelli e della griglia, garantiscono una pezzatura costante e una frantumazione del nocciolo dell'oliva a spigoli vivi, molto importante nella successiva fase di gramolatura (**Figura 1.15**). La fase di gramolatura che segue quella della frangitura, completa il processo di preparazione delle paste per l'estrazione e contribuisce allo sviluppo delle proprietà chimico-fisiche ed organolettiche dell'olio estratto. Ottimizza i profumi ed i sapori ed è fondamentale per la resa estrattiva finale. Nella gramola avvengono complesse reazioni biochimiche ed il processo di coalescenza dell'olio, ossia l'aggregazione delle piccole goccioline dello stesso. La forma, il volume, le dimensioni, il numero di giri delle pale ed il corretto condizionamento termico della pasta sono i requisiti per avere ottima resa e qualità. Il frantoio Fornaro ha in dotazione il gruppo di gramolazione Molinova Oro (cinque vasche con capienza singola di 700 kg), concepito per la lavorazione partitaria, è completamente automatizzato anche per operare in continuo (**Figura 1.16**).

Le singole vasche, predisposte per lavorare a differenti temperature, sono dotate di una valvola a farfalla automatica in acciaio inox per lo svuotamento della pasta e di sonde per il controllo del livello minimo e massimo e della temperatura. Ogni modulo ha un sistema di lavaggio temporizzato, attivabile a richiesta o al termine della lavorazione di ogni partita di olive. Ogni gramola può essere indipendente e isolata dalle altre in base alle esigenze dei clienti, soprattutto per evitare contaminazioni di altre partite e per ridurre al minimo la presenza di ossigeno che andrebbe ad alterare i composti fenolici. Inoltre, l'importanza di controllare la temperatura con delle sonde, permette al frantoio di non superare mai i 27 °C, prerequisito per essere considerato olio extra vergine. Il tempo di gramolazione varia a seconda della maturazione delle olive, ma solitamente sono sufficienti 20/30 minuti.



*Figura 1.15 – Griglia singola con martelli*



*Figura 1.16 – Vasche di gramolazione*

### 1.2.3 Estrazione e separazione

La fase di estrazione è fondamentale per separare l'olio dalla parte acquosa e solida, questa fase deve avvenire rapidamente per mantenere alta la qualità del prodotto. L'estrazione avviene con centrifughe orizzontali, anche dette decanter, che separano le varie fasi in base alla loro densità. Ad oggi, esistono tre metodi di estrazione: a due fasi, a tre fasi e multifase (**Figura 1.17**).

Il metodo di estrazione a due fasi, presente anche nel frantoio a Montecchia di Crosara, utilizza un decanter che genera una sola uscita liquida, costituita prevalentemente da olio, ed una uscita "solida" contenente sansa ed acqua. Questo tipo di estrazione consente di ridurre o eliminare l'utilizzo dell'acqua di processo, con il duplice vantaggio di limitare l'impiego di risorse naturali (acqua) e di minimizzare la produzione di reflui. Invece, nel metodo a tre fasi, durante la separazione viene aggiunta acqua e il decanter è dotato di due uscite liquide, per lo scarico dell'olio e dell'acqua di vegetazione ed una uscita solida per la sansa. A fronte di un maggiore consumo d'acqua, questa tecnologia permette di generare una sansa asciutta facilmente gestibile e di maggior valore per i sansifici. Nella lavorazione multifase il decanter è predisposto per avere tre uscite: una per l'olio, una per la sansa e una intermedia per il pâté. Questo tipo di estrazione garantisce la migliore qualità delle varie fasi prodotte con la versatilità di essere adatta sia alla lavorazione in continuo che a quella partitaria. Nel frantoio Fornaro, il decanter lavora a 3000 giri in modo tale da separare la sansa umida dall'olio; infatti, quest'ultimo essendo più leggero rimane nella zona centrale della centrifuga.

Grazie all'azione di una coclea l'olio viene recuperato all'esterno e introdotto nella centrifuga verticale (Figura 1.18). La sansa umida è un prodotto di scarto molto dispendioso in quanto difficile da raccogliere e maneggiare a causa della sua consistenza liquida. Perciò, il frantoio raccoglie il nocciolo frantumato per ottenere nocciolino, un ottimo combustibile per il riscaldamento domestico. Mentre le acque di vegetazione e la polpa vengono destinate ad un biodigestore per produrre biogas.



Figura 1.17 – Decanter orizzontale

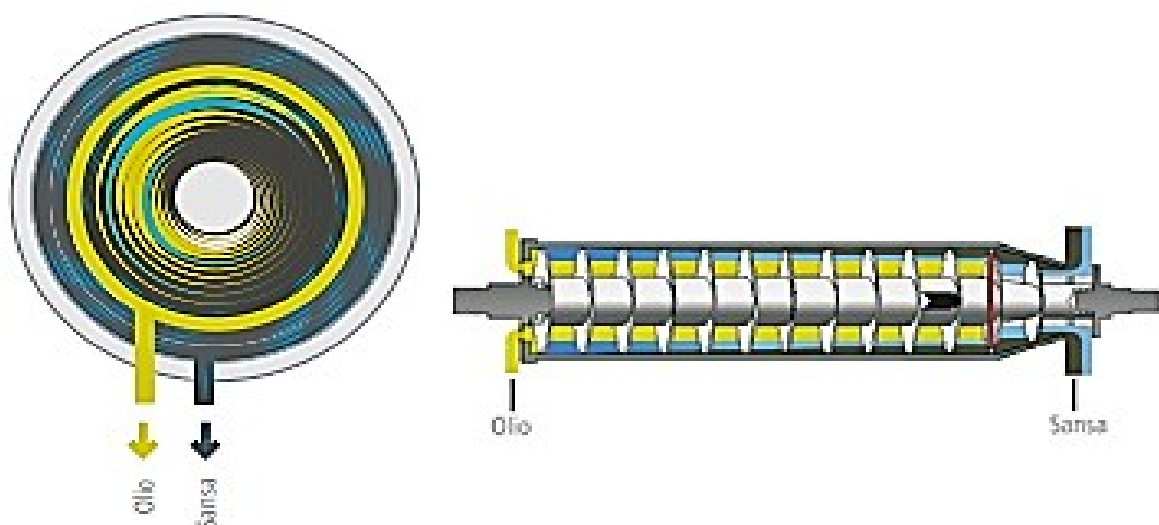


Figura 1.18 – Metodo a due fasi [Pieralisi]

Giunti all'ultima fase del processo di produzione dell'olio, i residui di acqua e di solidi rimasti nell'olio devono essere ben separati. Tali residui devono essere inoltre eliminati velocemente per mantenere alta la qualità del prodotto. L'olio con le impurità viene introdotto in un separatore verticale che lavora a 7000 giri (**Figura 1.19**). Le alte prestazioni agevolano la rimozione delle particelle di acqua e le rimanenti impurità solide. Alla fine del processo, si ottiene un olio extra vergine d'oliva ricco di composti fenolici, che garantiscono il profumo, il sapore e la durabilità nel tempo.

### 1.2.4 Acque reflue di frantoio

Il principale sottoprodotto della produzione dell'olio sono le acque di vegetazione, seguite dalla sansa e dal nocciolino. Considerando che mediamente il quantitativo di olio nella parte edibile delle olive è di circa 15-20%, mentre il quantitativo di acqua è 70-75%, si può stimare che nel 2022 il totale prodotto di reflui oleari in Italia si aggira intorno ai 2 milioni di tonnellate.



*Figura 1.19 – Separatore verticale*

Le acque di vegetazione sono di colore scuro, ricche di composti organici (zuccheri, acidi organici, tannini, polifenoli, pectine, lipidi e proteine) e minerali (potassio, fosforo e calcio). A causa dell'acidità (pH compreso tra 4.5 e 5.9) dovuta agli acidi organici, all'elevato numero di composti organici difficili da biodegradare e a composti fenolici che inibiscono l'attività enzimatica della microfauna, le acque di vegetazione sono sottoposte a una serie di normative atte al loro smaltimento. I titolari dei frantoi hanno la possibilità di smaltire le acque di vegetazione tramite:

- utilizzazione agronomica;
- scarico di acque reflue industriali;
- scarico di acque reflue assimilate alle domestiche;
- conferimento come rifiuto.

L'utilizzazione agronomica è inserita nella legge n. 574/1996, dove nell'art.1 viene espresso che: *“Le acque di vegetazione residue dalla lavorazione meccanica delle olive, che non hanno subito nessun trattamento, né ricevuto alcun additivo ad eccezione delle acque per la diluizione delle paste, ovvero per la lavatura degli impianti, possono essere oggetto di utilizzazione agronomica attraverso lo spandimento controllato su terreni adibiti ad uso agricolo.”* In aggiunta, con l'art. 112, comma 1, del D. Lgs. n. 152/2006 si stabilisce che l'utilizzazione agronomica è soggetta a comunicazione all'autorità competente, mentre sempre l'art. 112, comma 2 prevede che le Regioni devono disciplinare le attività di utilizzazione agronomica sulla base dei criteri e delle norme tecniche generali.

Lo scarico di acque reflue industriali è presente nell'art. 74, comma 1, del D. Lgs. n. 152/2006, in più si considera l'art.3 del D.P.R. AUA (Autorizzazione Unica Ambientale), il quale stabilisce la richiesta dell'Autorizzazione Unica Ambientale per chiunque intende scaricare le acque di vegetazione come acque reflue industriali. Le acque di vegetazione del 2015 con l'art. 10, comma 7 bis del D. Lgs. n. 152/2006, possono essere scaricate in pubblica fognatura secondo precise condizioni: non devono portare criticità nel sistema di depurazione, devono provenire da zone in cui ci siano aree scoscese o terrazzate dove i metodi di smaltimento tramite fertilizzazione e irrigazione non siano praticabili, devono subire dei pre-trattamenti per essere conformi con la successiva depurazione negli appositi impianti. Infine, se non possono essere applicati questi metodi di smaltimento, le acque di vegetazione vengono classificate come rifiuti e devono sottostare a tutti gli obblighi previsti dalla parte IV del D. Lgs. n. 152/2006 [Kusturin M., 2018].



La ricerca e lo studio sulle acque di vegetazione provenienti dai frantoi (**Figura 1.20**) è in continua espansione, infatti, oltre alla ricerca per lo smaltimento si stanno sviluppando dei metodi per il recupero e riutilizzo di questi scarti.

### 1.2.5 Composti fenolici nelle acque di vegetazione

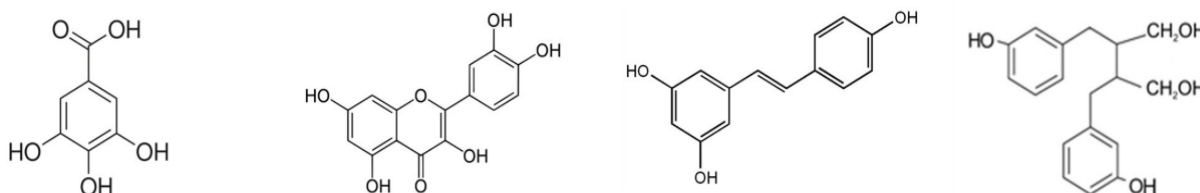
Gli studi relativi alle acque di vegetazione si concentrano maggiormente nei composti fenolici presenti. I fenoli sono composti aromatici dove è avvenuta una sostituzione, nell'anello benzenico, di un idrogeno con il gruppo ossidrilico (OH). I fenoli sono totalmente solubili nei solventi organici apolari e in acqua calda ma sono poco solubili in quella fredda [McMurry J., 2011]. Questi composti sono molto importanti perché da sempre utilizzati nell'industria farmaceutica, cosmetica e alimentare. Sono delle sostanze antiossidanti che al pari, ed anche più, della vitamina E rallentano l'ossidazione delle cellule dell'organismo umano riducendo il rischio di contrarre malattie degenerative come cancro e malattie cardiovascolari. La proprietà antiossidante è correlata alla loro struttura chimica, infatti, donando atomi di idrogeno o elettroni, prevengono la formazione di radicali liberi coinvolti nei processi di autossidazione.



**Figura 1.20** – Metodo di estrazione a tre fasi: acqua di vegetazione a sinistra, olio a destra [Bernardi B. e Benalia S., 2018]

In natura troviamo spesso metaboliti secondari delle piante, come acidi fenolici e polifenoli, che vengono sintetizzati per difesa contro le radiazioni ultraviolette, i patogeni e altri stress ambientali. I polifenoli presentano più di un gruppo fenolico per molecola, oltre ad altri possibili gruppi funzionali.

La maggior parte dei metaboliti fenolici può essere classificata in quattro grandi gruppi: acidi fenolici, flavonoidi, stilbeni e lignani come mostrato nella **Figura 1.21**.



**Figura 1.21** - Acido fenolico (Acido Gallico), Flavonoide (Quercitina), Stilbene (Resveratrolo) e Lignano (Enterodiolo)

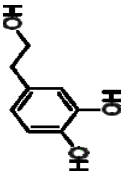
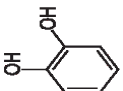
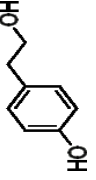
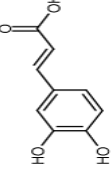
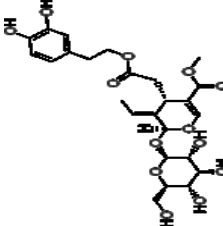
Gli acidi fenolici hanno un gruppo funzionale acido carbossilico e possono essere suddivisi in acidi idrossibenzoici e acidi idrossicinnamici. Quest'ultimo gruppo comprende composti come l'Acido Caffeico, Ferulico, p-Cumarico, Clorogenico o Sinaptico, mentre gli acidi idrossibenzoici includono, tra gli altri, gli acidi p-Idrossibenzoico, Protocatecuico, Siringico, Vanillico e Gallico e i relativi tannini idrolizzabili. I flavonoidi sono costituiti da due anelli aromatici collegati da tre atomi di carbonio che formano un anello eterociclico ossigenato. A seconda del tipo di eterociclico coinvolto, possono essere classificati in diverse sottoclassi: Flavonoli, Flavoni, Isoflavoni, Flavanoni, Antocianidine e Flavanoli. Gli stilbeni sono un gruppo di composti derivati dai fenilpropanoidi, caratterizzati dalla catena principale dell'1,2-difeniletilene. Sono presenti nella dieta umana in basse quantità e il principale rappresentante è il Resveratrolo, rilevato in più di 70 specie di piante, tra cui uva, bacche e arachidi. I lignani sono prodotti dalla dimerizzazione ossidativa di due unità di enilpropano. Questi composti sono considerati fitoestrogeni, oltre alle loro proprietà antinfiammatorie, antiossidanti, o ai loro effetti benefici nella prevenzione delle malattie cardiovascolari. Il sesamo e i semi di lino sono ricche fonti di lignani nella dieta umana. Nella **Tabella 1.2** sono elencati i composti fenolici identificati sia nella sansa che nei reflui di vegetazione della lavorazione dell'olio d'oliva [Tapia-Quiròs P. et al, 2022]. Alcuni di questi composti sono oggetto di studio anche per un loro possibile impiego nel contrasto di alcune fitopatologie, soprattutto di origine fungina e batterica [Di Simone S. C. et al, 2023].

Un ulteriore ambito di interesse riguarda la possibilità di utilizzo di polifenoli derivanti da ADV per la difesa contro la mosca dell'olivo (*Bactrocera oleae*). Recentemente, presso UniPd (nel Dipartimento di Scienze Chimiche e nel Dipartimento Territorio e Sistemi Agro-Forestali) sono stati avviati studi riguardanti una serie di composti fenolici, le cui proprietà sono elencate in **Tabella 1.3**.

**Tabella 1.2** – *Composti fenolici identificati nella sansa e nelle acque reflue di frantoio [Tapia-Quiròs P., 2022]*

Campione	Composti Fenolici Identificati	Concentrazione
Sansa di olive	Idrossitirosolo	5,3–512,6 mg kg <sup>-1</sup> dw
	Tirosolo	886,7 mg kg <sup>-1</sup> dw
	Oleuropeina	<0,5–162,9 mg kg <sup>-1</sup> dw
	Acido 3,4-diidrossibenzoico	37,2 mg kg <sup>-1</sup> dw
	Acido Vanillico	21,6 mg kg <sup>-1</sup> dw
	Acido omovanillico	12,5 mg kg <sup>-1</sup> dw
	acido <i>p</i> -idrossibenzoico	3,3 mg kg <sup>-1</sup> dw
	Luteolina	32,9–410,9 mg kg <sup>-1</sup> dw
	Rutina	1,3–354,2 mg kg <sup>-1</sup> dw
	Acido caffeico	0,7–876,2 mg kg <sup>-1</sup> dw
	Acido clorogenico	9,7–47,7 mg kg <sup>-1</sup> dw
	Acido ferulico	6,1–34,6 mg kg <sup>-1</sup> dw
	acido <i>p</i> -cumarico	8,0–67,1 mg kg <sup>-1</sup> dw
	Quercetina	0,5–36,6 mg kg <sup>-1</sup> dw
Naringenina	0,9–3,3 mg kg <sup>-1</sup> dw	
Acque reflue di frantoio	Idrossitirosolo	102-1409 mg L <sup>-1</sup>
	Tirosolo	14–425 mg L <sup>-1</sup>
	Acido caffeico	1-4 mg L <sup>-1</sup>
	Acido elenolico	87-1884 mg L <sup>-1</sup>
	Salidroside	33-265 mg L <sup>-1</sup>
	Comselogoside	1-2 mg L <sup>-1</sup>
	Idrossitirosolo 4-O-Glucoside	54–3150 mg L <sup>-1</sup>
	Idrossitirosolo 1-O-glucoside	23-27 mg L <sup>-1</sup>
	Idrossitirosolo Glicole	132-325 mg L <sup>-1</sup>
	Estere di caffeico	1 mgL <sup>-1</sup>

Tabella 1.3 – Composti fenolici e loro proprietà

	Struttura	Massa molecolare	Aspetto	Numero CAS	Solubilità in acqua	Temperatura di fusione
<b>Idrossitiroso</b>		154,16	liquido incolore	10597-60-1	50 g/L (25 °C)	128°C
<b>Pirocatecolo</b>		110,11	solido cristallino incolore	120-80-9	450 g/L (25°C)	105°C
<b>Tirosolo</b>		138,164	solido cristallino incolore	501-94-0	123.8 g/L (25°C)	90°C
<b>Ac. Caffeico</b>		180,16	solido giallo	331-39-5	Poco solubile	212°C
<b>Oleuropeina</b>		540,514	solido cristallino incolore	251-129-6	17 g/L (25°C)	91°C

## 1.3 MOSCA DELL'OLIVO

La mosca dell'olivo (*Bactrocera olea*) è l'insetto più temuto per le colture olivicole, infatti danneggia gravemente le olive e di conseguenza la qualità dell'olio prodotto. La mosca è presente in tutto il bacino del Mediterraneo e in Sudafrica, è un insetto che predilige zone fresche e umide, infatti temperature superiori ai 30 °C compromettono la fertilità delle femmine e talvolta anche la morte delle uova. In genere, se le condizioni di temperatura e umidità lo permettono, la mosca dell'ulivo è in grado di raggiungere dalle tre alle cinque generazioni per stagione. Il picco più alto degli sfarfallamenti è in autunno quando le temperature iniziano ad abbassarsi e le olive presentano il massimo grado di recettività.

### 1.3.1 Ovodeposizione

I primi segni di punture alle olive iniziano verso giugno/luglio a seconda delle condizioni climatiche, come già descritto in precedenza. Le femmine pronte a deporre ricevono stimoli sensoriali dalle olive; infatti, prima dell'ovodeposizione la femmina valuta la dimensione, il colore e l'odore dell'oliva. Sono frequenti soprattutto in piena estate le punture sterili, provocate dalle femmine per esaminare la qualità dell'oliva e per lambire il succo utilizzato per la maturazione delle gonadi. Una volta scelta l'oliva adatta la femmina estroflette l'ovopositore e perfora l'oliva per creare un canale apposito ad accogliere l'uovo (**Figura 1.22**). La schiusa avviene dopo pochi giorni e la larva inizia fin da subito a nutrirsi del mesocarpo creando canali, con il tempo sempre più grandi. Il danno è sia diretto che indiretto, in quanto direttamente viene ridotta la polpa dell'oliva che diminuisce, di conseguenza, la resa finale dell'olio e indirettamente perchè dai canali creati dalla larva si insediano funghi e batteri che causano marciumi e cascola precoce delle olive. Raggiunta la maturità, dopo circa due settimane, la larva solitamente esce dall'oliva, cade al suolo e si impupa; trascorsa una settimana sfarfalla l'adulto. Ogni femmina nel suo intero ciclo di vita può deporre 200-250 uova, deponendo generalmente un uovo per ogni oliva. Infatti, durante la valutazione dell'oliva da parte della mosca, questa recepisce se l'oliva è già stata colpita, questo accorgimento potrebbe servire alla mosca per fare in modo che le larve non entrino in competizione di cibo [Ferrari M. et al, 2006].

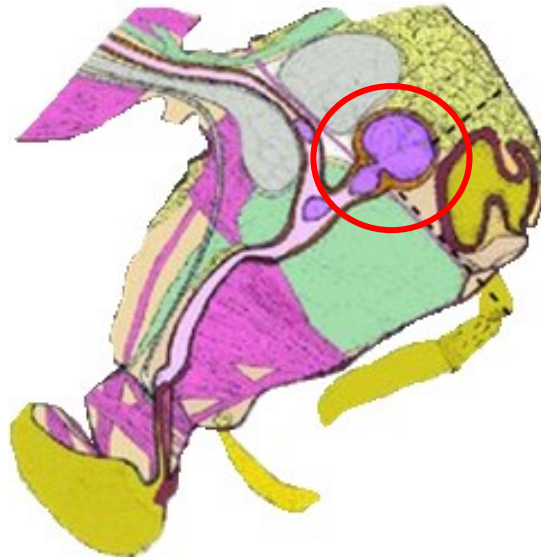




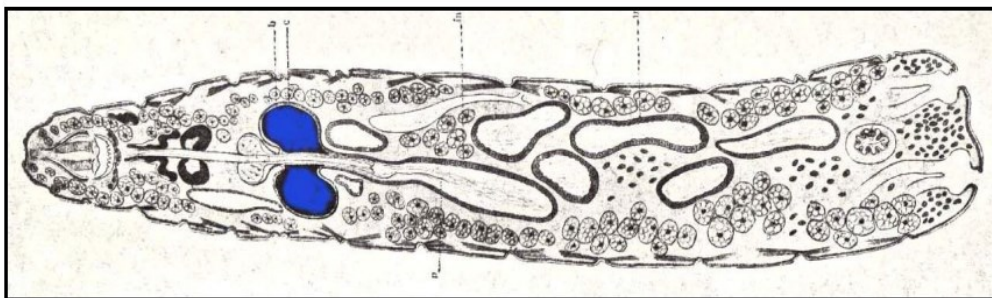
*Figura 1.22 – Ovodeposizione di femmina di Bactrocera oleae su oliva [Dott.ssa Carofano I., 2022]*

### 1.3.2 Batterio simbiote di B. oleae

La mosca dell'olivo, in tutte le sue fasi di sviluppo, è da sempre legata ad una simbiosi molto stretta con il batterio *Candidatus* Erwinia dacicola. La simbiosi è di fondamentale importanza per la sopravvivenza e sviluppo della mosca, infatti nello stadio larvale, il batterio contribuisce a detossificare l'azione dell'oleuropeina. Mentre nello stadio adulto, la simbiosi è importante per la degradazione di composti azotati altrimenti inaccessibili alla mosca. Il dittero a sua volta fornisce un luogo ideale al batterio per la crescita e lo sviluppo, infatti non è ancora possibile la coltivazione in laboratorio di *Ca. E. dacicola*. Negli adulti della mosca olearia è presente un diverticolo esofageo (**Figura 1.23**) che contiene popolazioni batteriche extracellulari in continuo accrescimento. Quest'organo rilascia periodicamente una quantità di batteri nell'esofago che colonizzano la parte anteriore dell'intestino medio [Petri, 1909; Girolami, 1973; Capuzzo, 2005]. La madre, dotata di ghiandole perianali contrattili che si riempiono di batteri, trasmette i simbionti alle uova durante l'ovideposizione. Quando l'uovo si schiude la larva ingerisce la porzione di uovo rimasta assumendo i batteri indispensabili per il suo sviluppo (**Figura 1.24**).



*Figura 1.23 – Capo di B. oleae con diverticolo esofageo [Girolami, 1973]*



*Figura 1.24 – Larva di B. oleae, in blu sono evidenziati i ciechi intestinali con la presenza del batterio Symbionte [Petri, 1909]*

### 1.3.3 Lotta contro la mosca

La lotta contro la mosca dell'oliva, fino al 2019, è sempre stata associata all'insetticida ROGOR L 40 ST composto da dimetoato puro e conformulanti. È un insetticida fosfororganico dotato di elevata azione citotropica e sistemica locale che gli consente di penetrare i tessuti vegetali. Quest'insetticida, come tutti i fosfororganici, inibisce la sintesi dell'acetilcolinesterasi, perciò è neurotossico.

Il 26 giugno 2019 viene emanato il regolamento di esecuzione (UE) 2019/1090 della Commissione relativo al mancato rinnovo dell'approvazione della sostanza attiva dimetoato, in conformità al regolamento (CE) n. 1107/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari, e che modifica l'allegato del regolamento di esecuzione (UE) n. 540/2011 della Commissione.

Esso afferma che: “non è stato possibile escludere il rischio di esposizione per consumatori, operatori, lavoratori, astanti e residenti a causa della loro esposizione a residui di dimetoato, del quale non è stato possibile escludere il potenziale genotossico, e al suo principale metabolita ometoato che, secondo le conclusioni della maggioranza degli esperti della valutazione *inter pares*, è un agente mutageno in vivo. Per tutti gli impieghi rappresentativi valutati, sussiste un rischio elevato per mammiferi e artropodi non bersaglio per quanto riguarda il dimetoato e per le api mellifere per quanto concerne il dimetoato e l'ometoato. La specifica tecnica, attuale o rivista, non è corredata della valutazione (eco)tossicologica.” Quindi con l’Articolo 1 non è stata rinnovata l’approvazione della sostanza attiva dimetoato e con l’articolo 2 è stato modificato il regolamento esecutivo (UE) 540/2011, eliminando la riga 149 relativa al dimetoato.

Un anno dopo il Ministero della Salute, a causa di un grave calo della produzione delle olive dovuto all’annata, al batterio *Xylella fastidiosa* e alla mosca dell’olivo, decreta che le imprese indicate sono autorizzate ad immettere in commercio, ai sensi dell’articolo 53, paragrafo 1, del regolamento (CE) n.1107/2009, per un periodo massimo di 120 giorni, i prodotti fitosanitari a base di dimetoato, per la lotta alla mosca dell’olivo (*Bactrocera olea*), sulla coltura dell’olivo a far data dal 1 Luglio 2020.

Ad oggi, per sostituire l’efficacia del dimetoato, si possono adottare diversi accorgimenti che partono dalla scelta dell’area di coltivazione, dalla cultivar e dal periodo di raccolta; poi con azioni preventive si possono utilizzare esche o trappole per la cattura, il monitoraggio e la confusione sessuale della mosca. Infine, valutando sempre la soglia di intervento che varia dal 6-8% fino al 10-15% delle drupe infestate a seconda della zona, si può procedere all’utilizzo di ovo-larvicidi organici di sintesi (fosmet, acetamiprid) o adulticidi sempre organici di sintesi (piretroidi) [Bagnoli B. e Guarino A., 2020].

## 1.4 SCOPO DELLA TESI

La problematica relativa alla lotta contro la mosca dell’olivo è attualmente ancora in atto, infatti con l’abbandono del dimetoato e di altri composti fosfororganici si è alla ricerca di metodiche più sostenibili e meno nocive per l’uomo e l’ambiente.

Altra tematica nel settore olivicolo, come già descritto, è quello dello smaltimento delle acque reflue dei frantoi, che risulta essere un costo significativo per molti frantoi e quindi per i produttori.

Il presente lavoro di tesi si inquadra in uno studio multidisciplinare orientato alla possibilità di riutilizzo delle ADV, e dei composti fenolici in esse presenti, nella difesa fitosanitaria contro la mosca dell'olivo.

In tale ottica si è pertanto proceduto con una caratterizzazione chimica dei reflui di interesse, in particolare acque di vegetazione provenienti da due frantoi, uno in provincia di Verona e l'altro in provincia di Trento. Il processo di caratterizzazione serve per determinare la concentrazione di cinque polifenoli quali: Idrossitirosolo, Pirocatecolo, Tirosolo, Acido caffeico e Oleuropeina. Tale caratterizzazione delle acque di vegetazione permette di esplicitare lo scopo dell'elaborato, ovvero, predisporre un metodo per la raccolta dei singoli polifenoli che verranno poi utilizzati per condurre una sperimentazione più estesa finalizzata allo studio dei meccanismi di azione di queste sostanze sulla mosca dell'olivo. Il possibile utilizzo di questi polifenoli contro la mosca dell'olivo potrebbe risolvere alcune problematiche riscontrate come per esempio: il costo elevato dei singoli polifenoli (inclusi gli standard analitici); i tempi e i costi relativi allo smaltimento delle acque nel frantoio e l'utilizzo di un prodotto di scarto di origine naturale per la creazione di un prodotto ad azione repellente/insetticida.

Gli obiettivi prefissati del presente lavoro di tesi si riassumono nei seguenti punti:

- sviluppare un metodo per la raccolta dei cinque polifenoli presenti nelle ADV;
- effettuare dei test per valutare la termodegradazione e fotodegradazione dei composti isolati;
- determinare se queste sostanze possano avere un'azione di contrasto alla mosca dell'olivo.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

#### 2.1.1 Acque di vegetazione

Nel presente lavoro di tesi sono stati utilizzati quattro campioni di acque di vegetazione (ADV) provenienti da due frantoi italiani:

- ADV 2020, pre-concentrate tramite osmosi inversa presso Agraria Riva del Garda s.c.a, Riva del Garda (TN);
- ADV 2021, pre-concentrate tramite osmosi inversa presso Agraria Riva del Garda s.c.a, Riva del Garda (TN);
- ADV 2022, Frantoio Fornaro, Montecchia di Crosara (VR), provenienti da olive di Montecchio Maggiore (VI).

I campioni sono stati raccolti in bottiglie di plastica, oscurati e conservati a 4 °C fino all'analisi.

#### 2.1.2 Soluzioni standard di calibrazione

La procedura di calibrazione strumentale (HPLC-FLD-DAD) è stata possibile grazie all'acquisto degli standard analitici dei singoli polifenoli quali:

- Idrossitirosolo (3,4- diidrossifenil)etanolo  $\geq 98\%$  (HPLC), Sigma-Aldrich;
- Pirocatecolo  $\geq 99\%$  Acros Organics;
- Tirosolo (p-idrossifenil)etanolo  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich;
- Acido caffeico  $\geq 98\%$  (HPLC), Sigma-Aldrich;
- Oleuropeina  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich.

Tutti gli standard sono stati conservati a -20 °C e protetti dalla luce fino all'utilizzo. Successivamente sono state preparate le soluzioni standard madre concentrate (1 g/L), per ciascun analita si è pesata la quantità opportuna e portati in soluzione con metanolo. Tali soluzioni sono state poi diluite con acqua milliQ e utilizzate per la costruzione della retta di calibrazione. Le stesse soluzioni standard sono state impiegate per lo sviluppo e l'ottimizzazione del metodo di estrazione dei polifenoli dalle ADV.



### 2.1.3 Reagenti

- Acqua MilliQ;
- Metanolo  $\geq 99.9\%$  (HPLC) Sigma-Aldrich;
- Acido formico  $\geq 98\%$  ACS reagent, Sigma-Aldrich;
- n-Esano 95%, BDH Laboratory Supplies;
- Etile acetato 99.5%, Carlo Erba;
- Acido cloridrico 37%, Riedel-de Haën.

### 2.1.4 Strumentazione HPLC

Nella procedura analitica è stato utilizzato un sistema cromatografico Shimadzu dotato di due pompe HPLC LC-20AD XR, un rivelatore a serie di diodi SPD-M20A, un rivelatore a fluorescenza RF-20A XS, un forno per colonna CTO-20AC e un campionatore automatico SIL-20AC XR. L'analisi è stata eseguita utilizzando una colonna Phenomenex Luna Omega polar C18 con particelle di diametro 1.6  $\mu\text{m}$ , diametro interno di 2.1 mm e lunghezza di 100 mm dotata di una precolonna Phenomenex AJ0-9505 FP Polar.

Per la cromatografia preparativa è stato utilizzato un sistema HPLC Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 munito di un modulo pompe, un collettore di frazioni e un detector a lunghezza d'onda variabile Dionex UltiMate 3000 (RS) impostato a  $\lambda=280$  nm. La separazione è stata ottenuta tramite una colonna Kinetex C18 100 Å con particelle di dimensione di 5  $\mu\text{m}$ , diametro interno di 10 mm e lunghezza di 250 mm.

### 2.1.5 Estrazione e purificazione

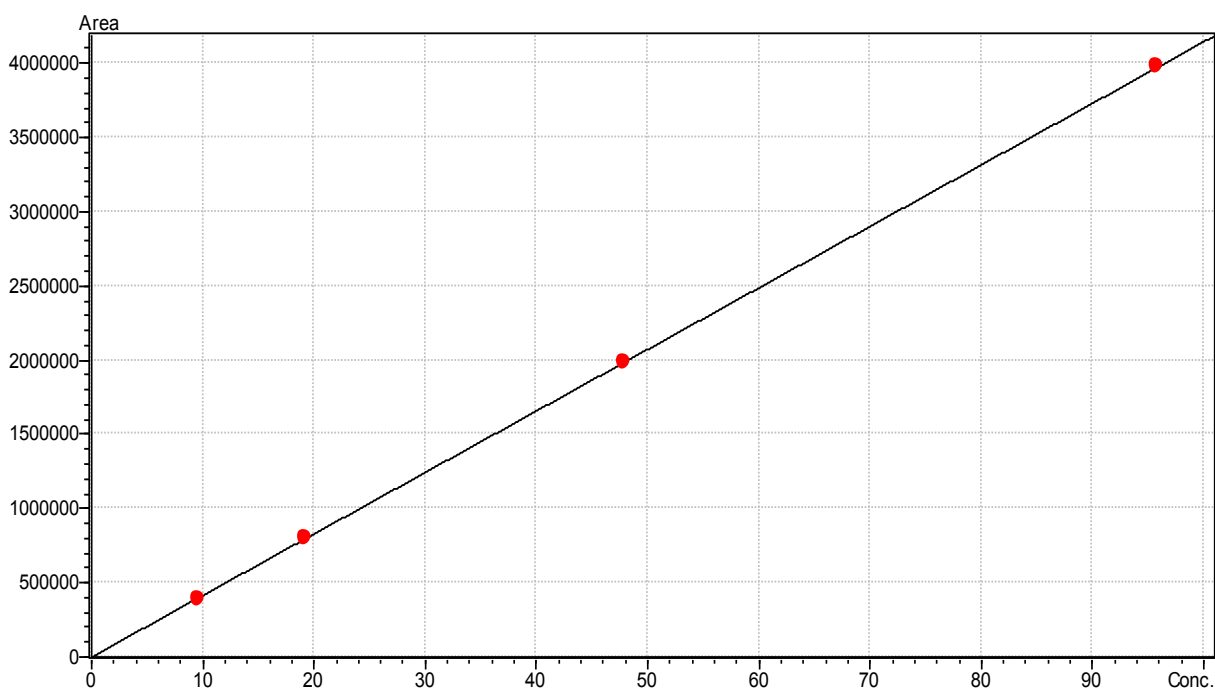
La parte sperimentale di estrazione, purificazione dei polifenoli e caratterizzazione delle acque di vegetazione è stata resa possibile grazie al lavoro di tesi precedentemente svolto (presso il Dipartimento di Scienze Chimiche, DiSC) dalla dott.ssa Clara Da Re che ha seguito un metodo descritto in letteratura [De Marco et al. 2007] apportando alcune modifiche. 50 mL di acque di vegetazione sono inserite in un imbuto separatore, acidificate con 8 mL di HCl (12 M) per raggiungere un pH pari a 2.

Una volta acidificate si rimuove la frazione lipidica con l'aggiunta di 50 mL di n-esano. Per ottenere una purificazione ottimale è stato necessario agitare vigorosamente per alcuni minuti e scartare la fase organica soprastante ricca di lipidi.

Questi passaggi vengono ripetuti tre volte. Successivamente, le acque di vegetazione delipidate vengono trattate tre volte con 50 mL di acetato di etile per estrarre i polifenoli dalle acque. La miscela è quindi agitata vigorosamente per alcuni minuti, dopodiché ad ogni lavaggio si raccoglie la fase soprastante contenente i polifenoli. Le frazioni raccolte sono riunite ed evaporate sotto flusso di azoto, per rimuovere l'acetato di etile e portare a secchezza. Il residuo è infine solubilizzato con 5 mL di soluzione costituita da 50% di acqua MilliQ e 50% di metanolo.

## 2.1.6 Calibrazione strumentale

Le soluzioni standard dei polifenoli hanno permesso di costruire le rette di calibrazione per determinare le concentrazioni dei polifenoli nelle acque di vegetazione. La calibrazione è stata effettuata solo per la misurazione in DAD,  $\lambda=280$  nm, verificato che la risposta strumentale in fluorescenza non forniva prestazioni migliori [Da re C., 2022]. Le concentrazioni utilizzate per costruire la retta di calibrazione sono state di 10, 20, 50, 100 ppm per ogni analita, quindi sono stati prelevati 10, 20, 50, 100  $\mu$ L dalle soluzioni madri concentrate (1000 ppm) e successivamente inseriti in vial separate e portate a volume (1 mL) con acqua MilliQ, in base alla concentrazione stabilita. Le rette di calibrazione sono state ottenute interpolando i valori di area dei picchi cromatografici dei quattro livelli di concentrazione (**Figura 2.1**).



**Figura 2.1** – Retta di calibrazione dell'Idrossitirosolo (HPLC-DAD,  $\lambda=280$  nm)

## 2.2 CARATTERIZZAZIONE DELLE ADV

In base al tipo di acqua da analizzare è stata adottata una diluizione differente dal residuo ottenuto dal processo di estrazione e purificazione (sez. 2.1.5). Il residuo proveniente dalle ADV di Montecchia di Crosara è stato solubilizzato con un volume di soluzione H<sub>2</sub>O/Metanolo (50%) quattro volte inferiore rispetto al volume di partenza del campione. Mentre il residuo delle ADV di Riva del Garda è stato solubilizzato con lo stesso volume di partenza del campione. Infine, per l'analisi HPLC-DAD, le ADV di Riva del Garda sono state diluite ulteriormente 1:4 e 1:40 con acqua MilliQ.

### 2.2.1 Metodo cromatografico HPLC-DAD

È stato utilizzato il metodo cromatografico proposto dalla dott.ssa Da Re per tutti i composti fenolici:

Eluente A: acqua milliQ, 15% di metanolo e 0.05% di acido formico

Eluente B: metanolo e 0.05% di acido formico

Flusso: 0.2 mL/min

Volume iniezione: 10 µL

Temperatura colonna: 30°C

Il programma del gradiente di eluizione è schematizzato nel seguente modo (**Tabella 2.1**):

**Tabella 2.1** – Programma di eluizione per la separazione dei composti fenolici in ADV

<b>Tempo (min)</b>	<b>Concentrazione eluente B (MeOH)</b>
0.00 – 5.00	2.4%
5.01 – 15.00	100% gradiente lineare crescente
15.01 – 19.00	100%
19.01 – 20.00	2.4% gradiente lineare decrescente
20.01 – 26.00	2.4%

Il rivelatore a serie di diodi (DAD) è stato impostato nell'intervallo di lunghezza d'onda tra 200 e 300 nm, registrando le corse cromatografiche a  $\lambda=280$  nm. Per la quantificazione dei singoli analiti, l'area del picco cromatografico è stata correlata alla concentrazione (calibrazione esterna) come descritto al paragrafo 2.1.6.

## 2.3 SEPARAZIONE E RACCOLTA DEI POLIFENOLI

Per la separazione e la raccolta delle singole frazioni di polifenoli si è optato per una cromatografia liquida (HPLC) preparativa: gli analiti di interesse vengono efficacemente separati in una colonna Kinetex C-18 100 Å con particelle di 5  $\mu\text{m}$ , diametro interno 10 mm e lunghezza 250 mm. La creazione del gradiente di eluizione e l'automatizzazione della raccolta delle frazioni di interesse è stata realizzata mediante il software di cromatografia Thermo Scientific Dionex Chromeleon Versione 7.1.SR1.

### 2.3.1 Metodo HPLC-PREP 1, per la raccolta dei 5 polifenoli

Le condizioni di separazione e raccolta delle frazioni dei singoli polifenoli sono qui riportate:

Eluente A: acqua milliQ e 0.05 % acido formico

Eluente B: metanolo e 0.05 % acido formico

Flusso: 2 mL/min

Volume di iniezione: 1 mL

Temperatura colonna: ambiente

Delay time: 20 s

Lunghezza d'onda di rivelazione: 280 nm

È stato creato un unico programma di eluizione che consenta la raccolta di tutti i polifenoli, con il seguente gradiente di eluizione (**Tabella 2.2**).

**Tabella 2.2** – Programma di eluizione per la raccolta complessiva dei composti fenolici in ADV

<b>Tempo (min)</b>	<b>Concentrazione eluente B (MeOH)</b>
0.00 – 16.00	20%
17.00 – 19.00	25%
20.00 – 27.00	30%
28.00 – 35.00	40%
36.00 – 46.00	50%
47.00 – 54.00	100%
57.00 – 60.00	20%

I tempi di raccolta delle frazioni sono stati i seguenti (**Tabella 2.3**):

**Tabella 2.3** – Tempi di raccolta dei singoli polifenoli con il metodo cromatografico HPLC-PREP 1

<b>Intervallo raccolto (min)</b>	<b>Frazione raccolta</b>
11.60 – 13.20	Idrossitirosolo
13.70 – 13.80	<i>Scarto</i>
14.20 – 15.20	Pirocatecolo
16.80 – 16.90	<i>Scarto</i>
18.70 – 20.00	Tirosolo
25.70 – 25.80	<i>Scarto</i>
28.50 – 29.60	Ac. caffeico
32.00 – 32.10	<i>Scarto</i>
46.00 – 46.50	Oleuropeina
57.00 - 57.10	<i>Scarto</i>

Si sottolinea che le ADV sottoposte alla cromatografia preparativa, dopo estrazione e purificazione (sez. 2.1.5) presentavano concentrazioni uguali al campione originario. Inoltre, per mantenere le prestazioni della colonna, è stato necessario lavarla ogni giorno con 100% di metanolo. Dopo aver raccolto le frazioni, la presenza e la concentrazione di ogni fenolo è stata confermata mediante analisi in HPLC-DAD, determinando anche il grado di impurità. Le soluzioni dei singoli polifenoli, una volta determinata la concentrazione, sono state conservate ad una temperatura di -20 °C al buio.



### 2.3.2 Metodo HPLC-PREP 2, specifico per la raccolta di Idrossitirosolo (HT) e Tirosolo (T)

È stato messo a punto un secondo programma di eluizione atto alla sola raccolta dell'Idrossitirosolo e Tirosolo da un campione a concentrazione 20 volte maggiore rispetto quelli analizzati con il metodo HPLC-PREP 1. Il programma adottato è stato il seguente (**Tabella 2.4**):

*Tabella 2.4 – Programma di eluizione per la raccolta specifica dell'Idrossitirosolo e Tirosolo in ADV*

<b>Tempo (min)</b>	<b>Concentrazione eluente B (MeOH)</b>
0.00 – 11.00	20%
12.00 – 22.00	100%
23.00 – 25.00	20%

Sono stati riportati i tempi della raccolta delle frazioni (**Tabella 2.5**):

*Tabella 2.5 – Tempi di raccolta dell'Idrossitirosolo e Tirosolo nel metodo cromatografico HPLC-PREP 2*

<b>Intervallo raccolto (min)</b>	<b>Frazione raccolta</b>
8.80 – 9.60	Idrossitirosolo
12.70 – 12.80	Scarto
13.80 – 14.40	Tirosolo
17.15 – 17.25	Scarto

Anche in questo caso le frazioni raccolte sono state analizzate mediante HPLC-DAD e successivamente conservate ad una temperatura di -20 °C al buio.

## 2.4 TEST DI DEGRADAZIONE DEI POLIFENOLI

### 2.4.1 Degradazione nel solvente

Per questi test sono state utilizzate le soluzioni di raccolta dei polifenoli delle ADV di Riva del Garda 2020. La purificazione del campione è stata condotta con la procedura descritta precedentemente (2.1.5), sottoponendo poi a cromatografia preparativa (HPLC-PREP 1) una soluzione a concentrazione pari a quella del campione originario.

Da ogni frazione è stata prelevata un'aliquota di 500  $\mu\text{L}$ , trasferita in vial e posta alla temperatura di 25 °C al buio. Aliquote di queste soluzioni sono state poi prelevate per determinare le concentrazioni al tempo 0 e dopo: 3, 7, 10, 14, 17, 27 giorni. Parallelamente sono state analizzate altre aliquote, stesso quantitativo, stesse tempistiche e stessa temperatura ma poste alla condizione di luce stabilizzata a 300-800 nm con fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio.

### 2.4.2 Degradazione a secco

In questo caso sono state utilizzate le ADV di Montecchia di Crosara 2022. La fase di purificazione è rimasta la stessa, ma la soluzione finale è stata concentrata quattro volte rispetto al campione fornito. Una volta separati i cinque polifenoli e raccolti in cinque provette differenti, sono stati prelevati 500  $\mu\text{L}$  per ognuno e determinata la concentrazione al tempo 0. Le aliquote (500  $\mu\text{L}$ ) per il test di degradazione a secco a 3, 7, 14 e 21 giorni sono state poste sotto flusso di azoto per rimuovere il solvente. Dopo questa operazione, le vial sono state collocate alla luce stabilizzata e 25 °C di temperatura. Ad ogni scadenza si è proceduto a portare nuovamente in soluzione gli analiti con 500  $\mu\text{L}$  di acqua, procedendo poi all'analisi mediante HPLC-DAD.

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONI

Lo studio relativo alla mosca dell'olivo e all'azione di composti polifenolici presenti nei reflui di frantoi, ha avuto inizio dopo gli anni '80 [Girolami, 1981]. La ricerca di nuovi fitofarmaci di origine naturale e non dannosi all'uomo iniziò dopo gli anni '70 perchè in questo periodo scoppiò lo scandalo del DDT (diclorodifeniltricloroetano) che incrementò la consapevolezza sulla tossicità verso l'uomo di molte sostanze utilizzate in agricoltura. La riduzione degli effetti tossici non è l'unico aspetto positivo sviluppato in quegli anni, c'è stato anche il riutilizzo di prodotti di scarto naturali che ha dato inizio al principio di economia circolare. Il concetto di economia circolare lo si può notare meglio al giorno d'oggi: la crisi climatica, l'esaurimento delle risorse e l'aumento incontrollato di malattie stanno generando un cambio di mentalità nell'ottica del recupero e riutilizzo delle risorse. Diversi studi dimostrano come alcuni composti fenolici, presenti nella linfa delle piante d'ulivo, siano coinvolti nell'azione repellente nei confronti di alcuni insetti e del loro stadio larvale [Di Ilio V., Cristofaro M., 2020]. Nel presente lavoro di tesi è stato fondamentale individuare un metodo economico e funzionale per l'estrazione dei polifenoli dalle acque reflue dei frantoi. Ottenere una quantità significativa di polifenoli, con un grado di purezza elevata, è stato l'obiettivo principale della tesi. Inoltre, considerando l'ipotetico impiego di queste sostanze in ambito agricolo, è stato necessario verificare la degradazione dovuta alla temperatura e alla luce.

#### 3.1 DETERMINAZIONE DEI POLIFENOLI

Il principale analita preso in considerazione dalla letteratura è l'Oleuropeina [Lo Scalzo et al, 1994]. È stato osservato che il liquido rigurgitato dall'adulto femmina di *Bactrocera oleae*, subito dopo la deposizione dell'uovo, impedisce ad altre femmine di ovodeporre sullo stesso frutto, a causa di una repulsione chemio-tattile. La presenza di oleuropeina e dei suoi derivati dipende essenzialmente dal grado di maturazione delle olive. A fine agosto, infatti, si ha la massima concentrazione di oleuropeina nelle olive che durante la maturazione si converte nei suoi derivati [Amiot M. J., et al, 1986].

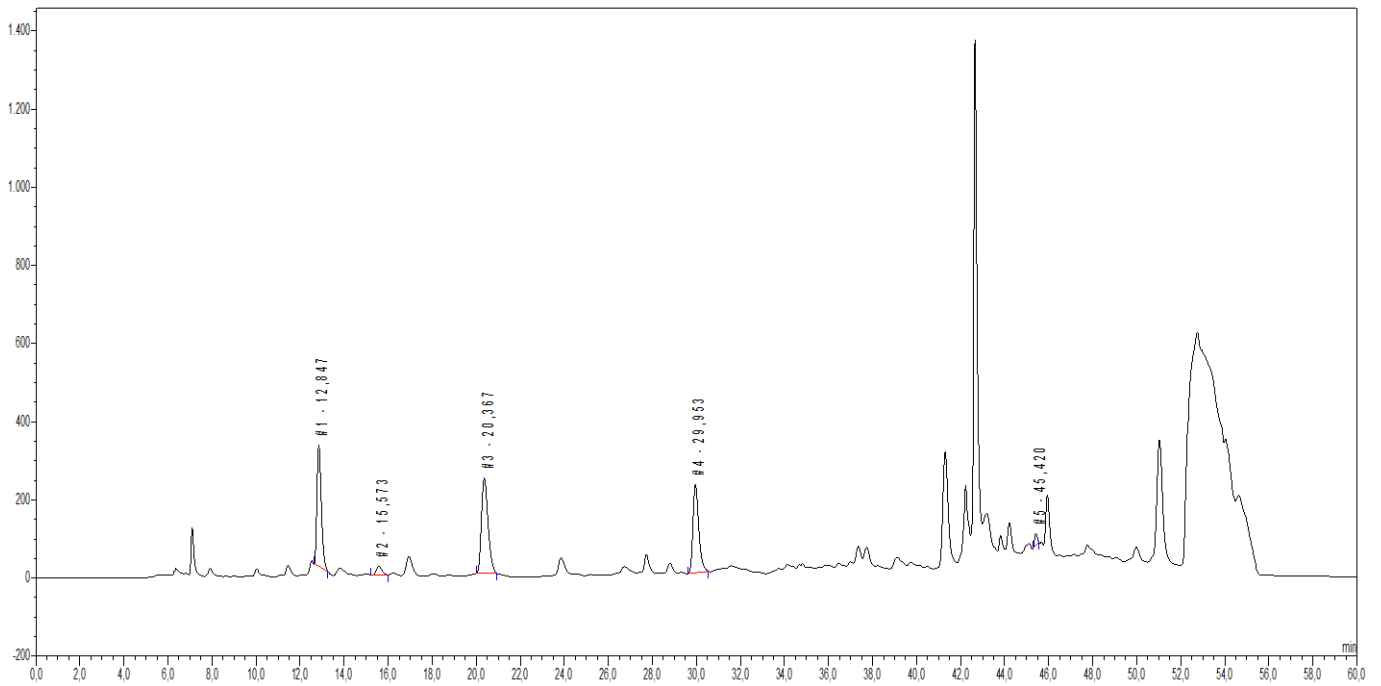
I polifenoli presi in esame, indicati nel precedente elaborato di tesi della dott.ssa Da Re, sono stati: l'Oleuropeina, l'Idrossitirosolo, il Tirosolo, il Pirocatecolo e l'Acido caffèico.

Come già visto in precedenza, queste sostanze sono presenti maggiormente nella frazione oleosa delle acque di vegetazione; perciò, è stata impiegata una tecnica analitica in grado di estrarre e purificare i polifenoli presenti (sez. 2.1.5).

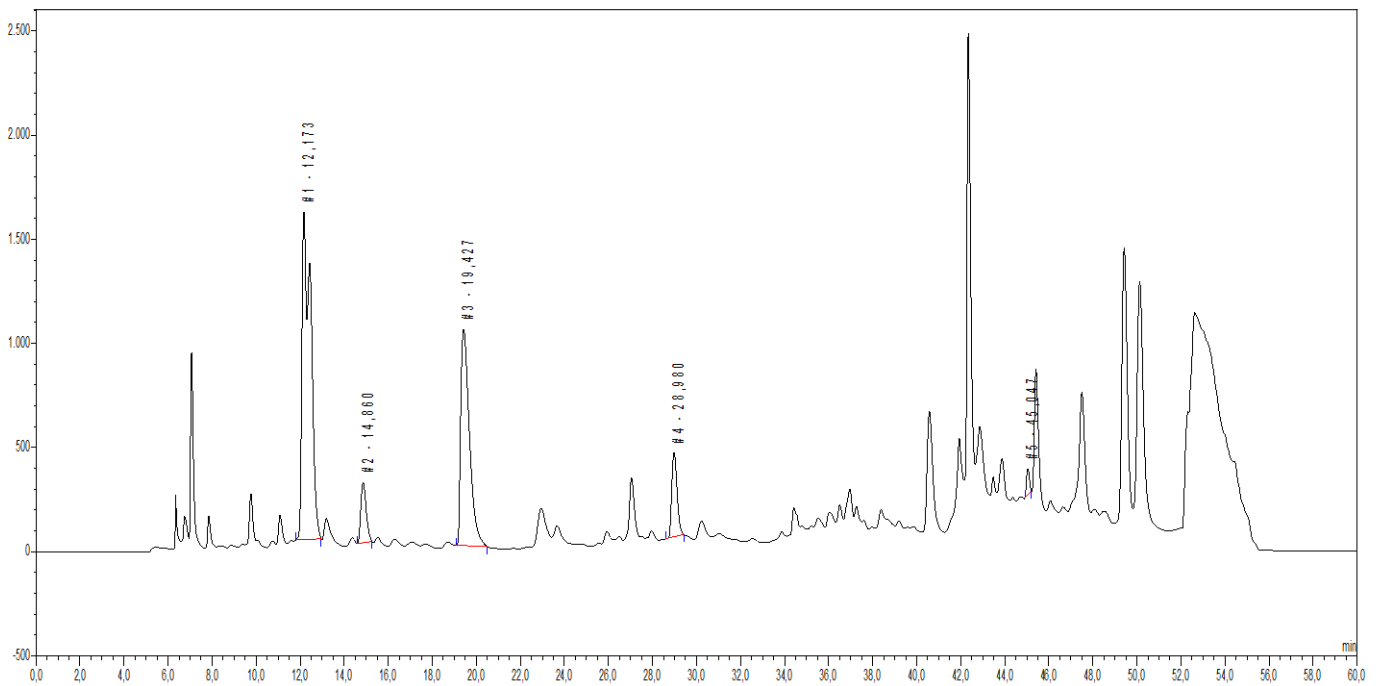
Una volta ottenuta la soluzione contenente i polifenoli, è stato possibile servirsi del metodo realizzato nell'elaborato precedente con la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) con rivelatore DAD, per la loro quantificazione.

### 3.1.1 Procedura di estrazione e purificazione

I campioni di acque di vegetazione sono stati sottoposti al processo di estrazione descritto da De Marco, Savarese, Paduano e Sacchi (2007), a cui sono state apportate alcune modifiche. Il metodo prevedeva una ripartizione liquido-liquido con diversi solventi mediante l'uso di un imbuto separatore. Questo metodo risulta funzionale per rimuovere parte delle impurità presenti nelle acque, che possono compromettere la separazione degli analiti in colonna HPLC e quindi la riuscita della sperimentazione. Le impurità presenti sono dovute essenzialmente a lipidi e altri composti fenolici. Inizialmente i campioni sono stati acidificati con HCl (12 M) fino ad ottenere un pH pari a 2, questo per ottimizzare al massimo le rese di estrazione dei polifenoli. Le ADV acidificate sono state lavate tre volte con n-esano, per rimuovere la frazione lipidica. Successivamente, le ADV sono state trattate ulteriormente con acetato di etile, in quanto i composti fenolici sono più affini all'acetato di etile piuttosto che alla fase acquosa. Per ottenere un'estrazione ottimale, sono stati ripetuti tre lavaggi. È stato scelto l'acetato di etile perché è risultato il solvente migliore in termini di selettività ed efficienza di estrazione. Le frazioni di acetato di etile contenenti i polifenoli sono state poste sotto flusso di azoto, ottenendo un residuo vischioso privo di solventi. Il residuo è stato solubilizzato con acqua milliQ e metanolo, gli stessi solventi della fase mobile utilizzati in HPLC. Nella procedura di estrazione e purificazione delle ADV provenienti da Montecchia di Crosara sono state effettuate due prove di purificazione, in quanto nella prima prova (**Figura 3.1**) i picchi del cromatogramma risultavano ben risolti ma con quantità di analita inferiore rispetto alla seconda prova (**Figura 3.2**); concentrando quattro volte il campione, si è riusciti ad ottenere un buon compromesso tra risoluzione dei picchi e quantità di raccolta.



**Figura 3.1** – Cromatogramma HPLC-PREP 1 della soluzione di estrazione dei polifenoli (Idrossitirosolo, Pirocatecolo, Tirosolo, Ac. Caffeyico e Oleuropeina) da ADV di Montecchia di Crosara



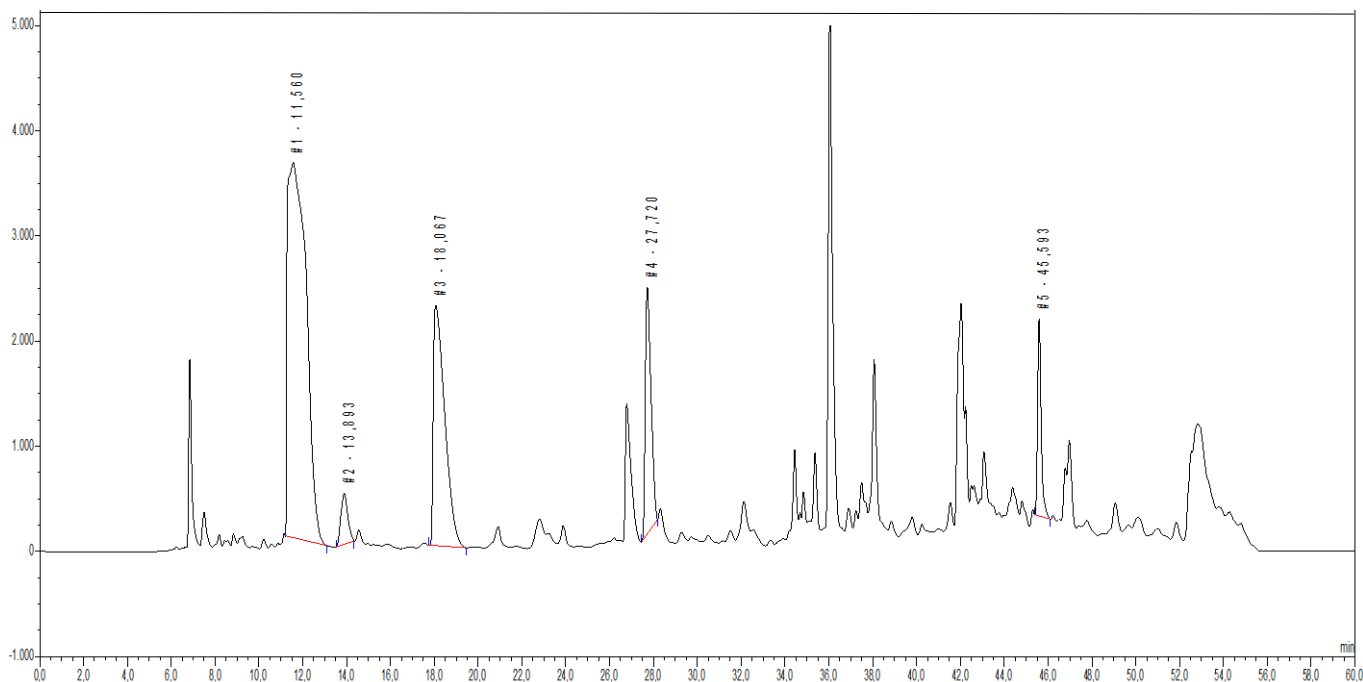
**Figura 3.2** – Cromatogramma HPLC-PREP 1 della soluzione concentrata quattro volte dei polifenoli (Idrossitirosolo, Pirocatecolo, Tirosolo, Ac. Caffeyico e Oleuropeina) da ADV di Montecchia di Crosara



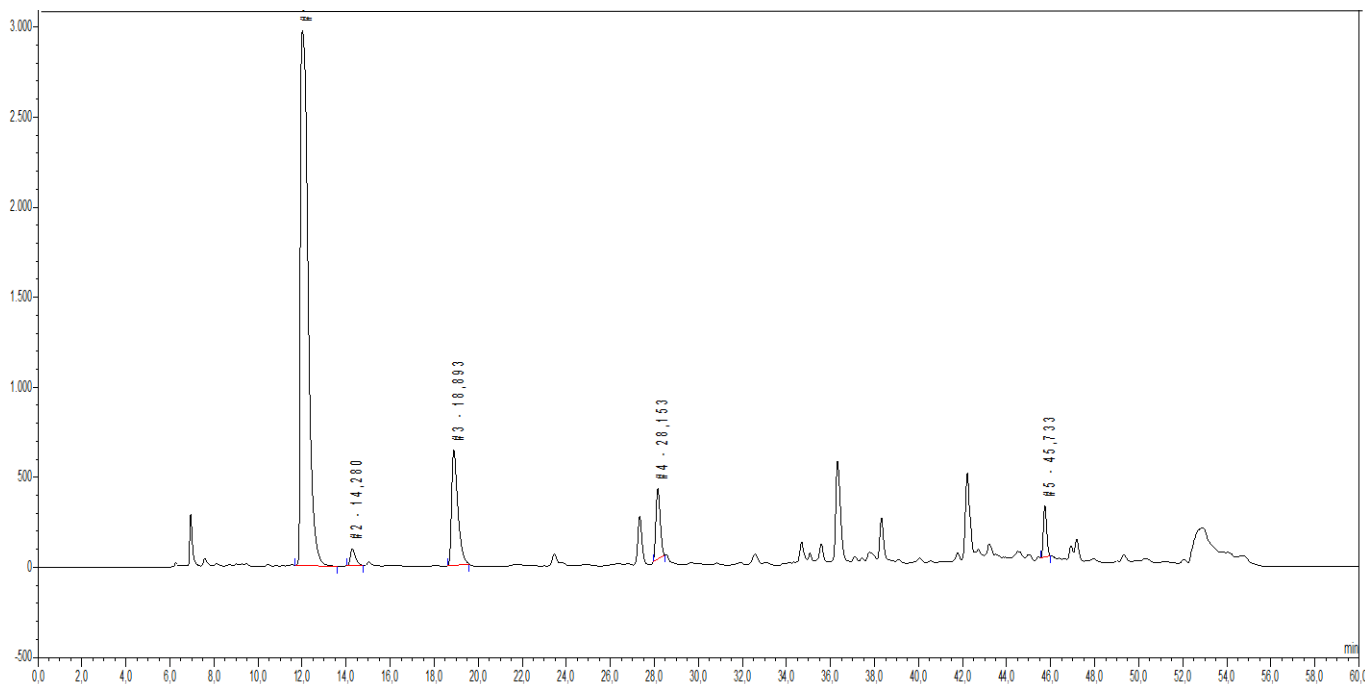
Per quanto riguarda le acque di vegetazione di Riva del Garda, più concentrate, essendo state sottoposte a trattamento di osmosi inversa, è stato necessario diluirle prima della separazione HPLC. Le soluzioni di estrazione sono state diluite rispettivamente 1:4 e 1:40 con acqua milliQ. I relativi cromatogrammi sono riportati in **(Figura 3.3)** e **(Figura 3.4)**.

Una criticità riscontrata nel precedente lavoro riguarda la temperatura a cui svolgere l'evaporazione a secco, infatti, temperature superiori ai 30 °C degradano gli analiti riducendone la concentrazione. Perciò, in ognuna delle fasi del processo di laboratorio, compresa la conservazione, non sono mai state raggiunte temperature superiori ai 30 °C.

Un'altra problematica riscontrata, sia nella fase di solubilizzazione del residuo che nelle diluizioni, è la scelta del solvente da utilizzare. L'impiego esclusivo del metanolo abbassa notevolmente la risoluzione dei picchi, creando delle sovrapposizioni o dei doppi picchi. Si è così deciso di utilizzare solo acqua milliQ per le varie diluizioni, per agevolare l'interazione degli analiti con la fase stazionaria della colonna cromatografica e ottenere così dei picchi ben risolti.



**Figura 3.3** - Cromatogramma HPLC-PREP 1 della soluzione diluita 1:4 di polifenoli (Idrossitirosole, Pirocatecolo, Tirosole, Ac. caffeico e Oleuropeina) da ADV di Riva del Garda



**Figura 3.4** - Cromatogramma HPLC-PREP 1 della soluzione diluita 1:40 di polifenoli (Idrossitiroso, Pirocatecolo, Tiroso, Ac. Caffeoico e Oleuropeina) da ADV di Riva del Garda

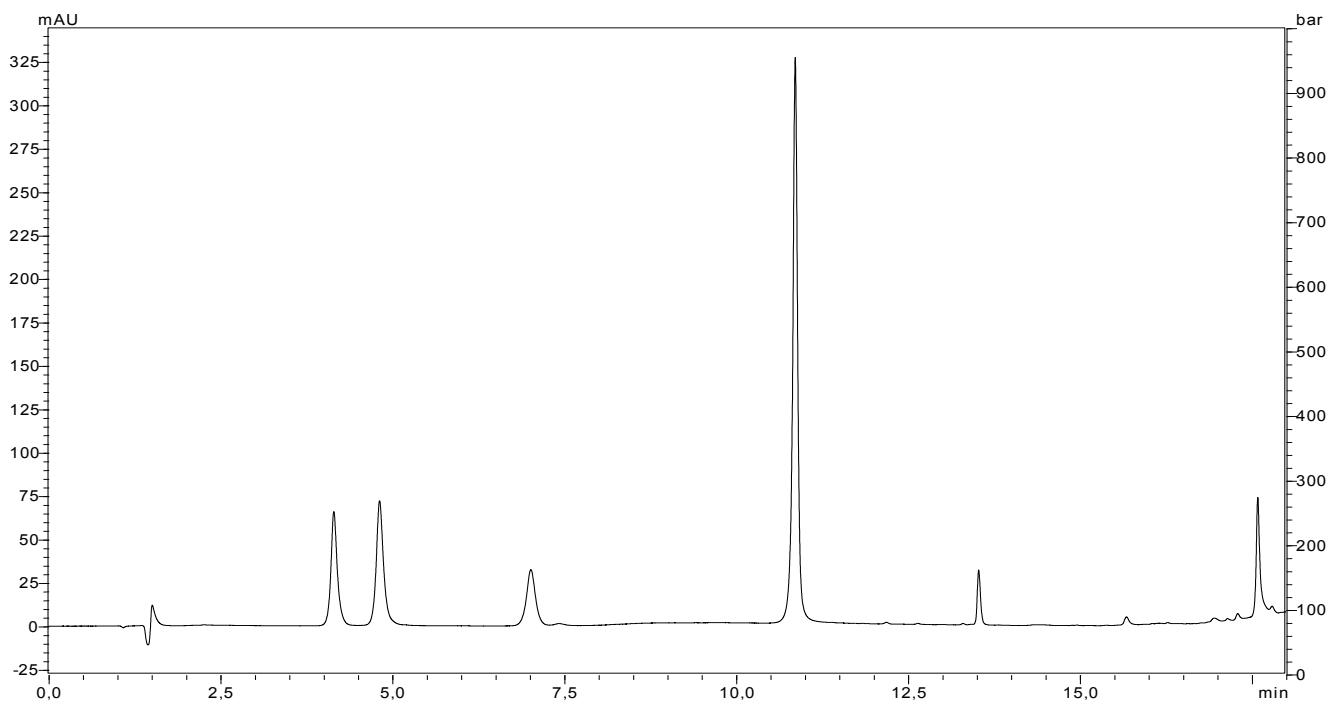
### 3.1.2 Caratterizzazione delle ADV Riva del Garda 2021

Il metodo HPLC-DAD è stato sviluppato con l'obiettivo di fornire una tecnica semplice, rapida ed accurata per quantificare i polifenoli. Il principio di funzionamento di questo strumento è legato alla ripartizione degli analiti nelle due fasi presenti in colonna: una fase stazionaria non polare, composta da particelle di piccole dimensioni, e una fase mobile, generalmente costituita da solventi polari come acqua, acetonitrile e metanolo. La colonna utilizzata, C18 Luna Omega, grazie alle sue elevate prestazioni, ha permesso di ottenere numerosi vantaggi quali: modalità di eluizione regolabile, utilizzo di piccoli volumi di campione per l'analisi (5-10  $\mu\text{L}$ ), elevata velocità ed efficienza di analisi. L'identificazione e la quantificazione degli analiti è stata possibile grazie all'impiego di un rivelatore a serie di diodi, permettendo così l'analisi in continuo dell'eluato e registrando le corse cromatografiche a lunghezza d'onda di 280 nm. A differenza dell'elaborato precedente, in questa tesi non è stata utilizzata la rivelazione fluorimetrica, perchè la risposta strumentale non fornisce prestazioni migliori alla rivelazione in DAD; in più la rivelazione fluorimetrica non permette l'identificazione dell'Acido Caffeoico.

Il programma di eluizione, descritto nel paragrafo 2.2.1, ha permesso di separare al meglio i vari picchi tra di loro, in particolare il Pirocatecolo con il Tirosolo, e di riuscire a identificare al meglio l'Oleuropeina.

Per l'ottimizzazione della procedura analitica (cromatogramma in **Figura 3.5**) è stato utilizzato un mix standard dei cinque polifenoli con concentrazione pari a 100 µg/L, rivelati in DAD. I tempi di ritenzione sono indicati nel seguente elenco, ordinato in base all'ordine di eluizione:

- Idrossitirosolo – 4.24 min
- Pirocatecolo – 4.89 min
- Tirosolo – 7.24 min
- Acido caffeico – 10.85 min
- Oleuropeina – 13.51 min



**Figura 3.5** – Cromatogramma della soluzione standard dei cinque i polifenoli (Idrossitirosolo, Pirocatecolo, Tirosolo, Ac. Caffeico e Oleuropeina)

Questo metodo di eluizione ha lo scopo di identificare gli analiti presenti nelle acque e determinare la concentrazione mediante il confronto dell'area dei picchi degli analiti con la retta di calibrazione. Per la caratterizzazione è stata utilizzata la soluzione purificata, diluita 1:40, del campione di ADV Riva del Garda 2021.

È stato scelto il campione di Riva del Garda per poter avere un confronto con lo studio precedente svolto dalla dott.ssa Da Re. L'analisi è stata condotta in due giorni differenti per poter osservare la riproducibilità del metodo.

Nella **Tabella 3.1** sono riportati i risultati delle analisi condotte il 21/11/2022 e il 20/12/2022, suddivise nella concentrazione determinata e nella concentrazione corretta dal fattore di diluizione 1:40, ottenendo così la concentrazione reale dei polifenoli nel campione di ADV.

*Tabella 3.1 – Concentrazione dei polifenoli (mg/L,  $\pm$  semidispersione max, n =2) nelle ADV di Riva del Garda 2021*

	21/11/2022		20/12/2022	
	Conc. determinata	Conc. campione	Conc. determinata	Conc. campione
<b>Idrossitirosole</b>	81.72 $\pm$ 0.23	3277.9 $\pm$ 9.0	82.43 $\pm$ 0.83	3297 $\pm$ 33
<b>Pirocatecolo</b>	7.81 $\pm$ 0.40	328 $\pm$ 16	7.59 $\pm$ 0.24	303.5 $\pm$ 9.5
<b>Tirosolo</b>	20.10 $\pm$ 0.11	808.6 $\pm$ 4.5	18.09 $\pm$ 0.65	723 $\pm$ 26
<b>Ac. Caffeico</b>	20.105 $\pm$ 0.058	806.5 $\pm$ 2.3	20.84 $\pm$ 0.90	833 $\pm$ 36
<b>Oleuropeina</b>	9.486 $\pm$ 0.059	381.8 $\pm$ 2.3	12.6 $\pm$ 1.0	504 $\pm$ 41

Come si può notare dai risultati in tabella, il metodo produce risultati soddisfacenti in termini di riproducibilità. Inoltre, ha determinato concentrazioni comparabili con quelle misurate nelle ADV prodotte negli anni 2019 e 2020 (**Tabella 3.2**). La differenza di concentrazione di alcuni polifenoli (Oleuropeina e Idrossitirosole) dipende principalmente dal grado di maturazione delle partite di olive che hanno differenziato le acque di vegetazione di quegli anni.

Tabella 3.2 – Concentrazione dei polifenoli nelle ADV [Da Re C., 2022]

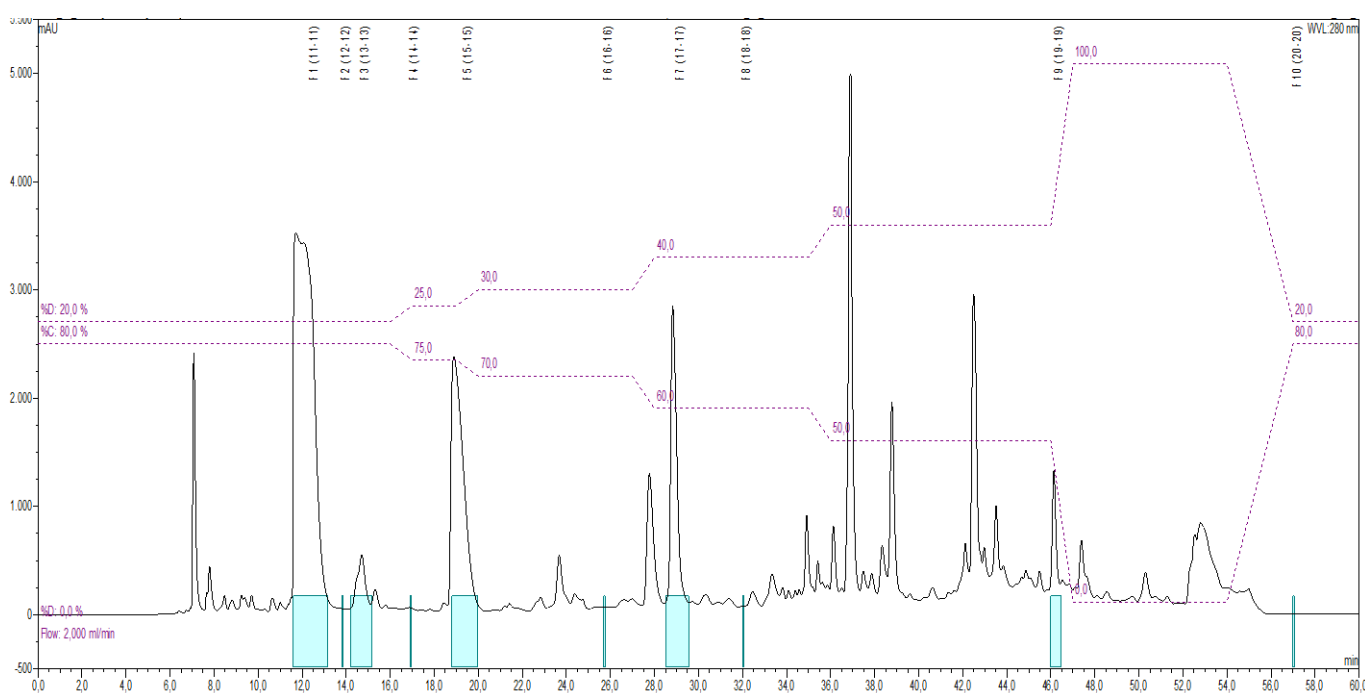
Campione	Analita	$C_0$ DAD (mg/L)	RSD %
<b>ADV 2019 (RdG)</b>	Pirocatecolo	201.8 ± 6.3	3.1
	Acido caffeico	269.2 ± 0.60	0.22
	Oleuropeina	47.9 ± 0.96	2.0
	Idrossitirosolo	9170 ± 100	1.2
	Tirosolo	3380 ± 83	2.5
<b>ADV 2020 (RdG)</b>	Pirocatecolo	247.8 ± 6.2	2.5
	Acido caffeico	277.1 ± 4.7	1.7
	Oleuropeina	23.7 ± 0.11	0.46
	Idrossitirosolo	16320 ± 220	1.3
	Tirosolo	2640 ± 120	4.5
<b>ADV 2021 (FI)</b>	Pirocatecolo	4.2 ± 0.18	4.3
	Acido caffeico	2.591 ± 0.022	0.771
	Oleuropeina	1.030 ± 0.014	0.973
	Idrossitirosolo	303.6 ± 3.9	1.3
	Tirosolo	47.9 ± 0.10	0.21
<b>ADV 2021 (PD)</b>	Pirocatecolo	10.5 ± 0.69	6.6
	Acido caffeico	0.811 ± 0.012	1.48
	Oleuropeina	0.952 ± 0.030	3.15
	Idrossitirosolo	100.1 ± 8.4	8.4
	Tirosolo	28.2 ± 2.0	7.0

## 3.2 SEPARAZIONE E RACCOLTA DEI POLIFENOLI

Il lavoro di questa parte sperimentale è stato condotto in previsione al test sulla mosca dell'olivo, dove si andrà a verificare se e quale miscela di polifenoli possa creare un effetto di repellenza. Quindi l'obiettivo principale è stato quello di predisporre un metodo che consentisse la raccolta di tutti i polifenoli in un'unica corsa cromatografica, a differenza del precedente elaborato che suddivideva in due corse cromatografiche l'Idrossitirosolo, il Pirocatecolo, il Tirosolo e l'Acido caffeico dall'Oleuropeina. In questo modo sono state ottenute delle soluzioni a titolo noto dei singoli polifenoli da impiegare nella sperimentazione in vivo sulla mosca, possibile alternativa all'utilizzo delle soluzioni standard.

### 3.2.1 Raccolta dei polifenoli

È stato utilizzato lo stesso sistema HPLC dell'elaborato precedente paragrafo 2.3.1, con una colonna preparativa a fase inversa C18 ed eluenti acqua e metanolo (entrambi con lo 0.05% di acido formico), il detector UV-Vis impostato ad una lunghezza d'onda di 280 nm. Il programma di eluizione utilizzato è descritto nello stesso paragrafo sopra citato; a titolo di esempio in **(Figura 3.7)** è riportato il cromatogramma delle frazioni raccolte dalle acque di vegetazione di Riva del Garda 2021.



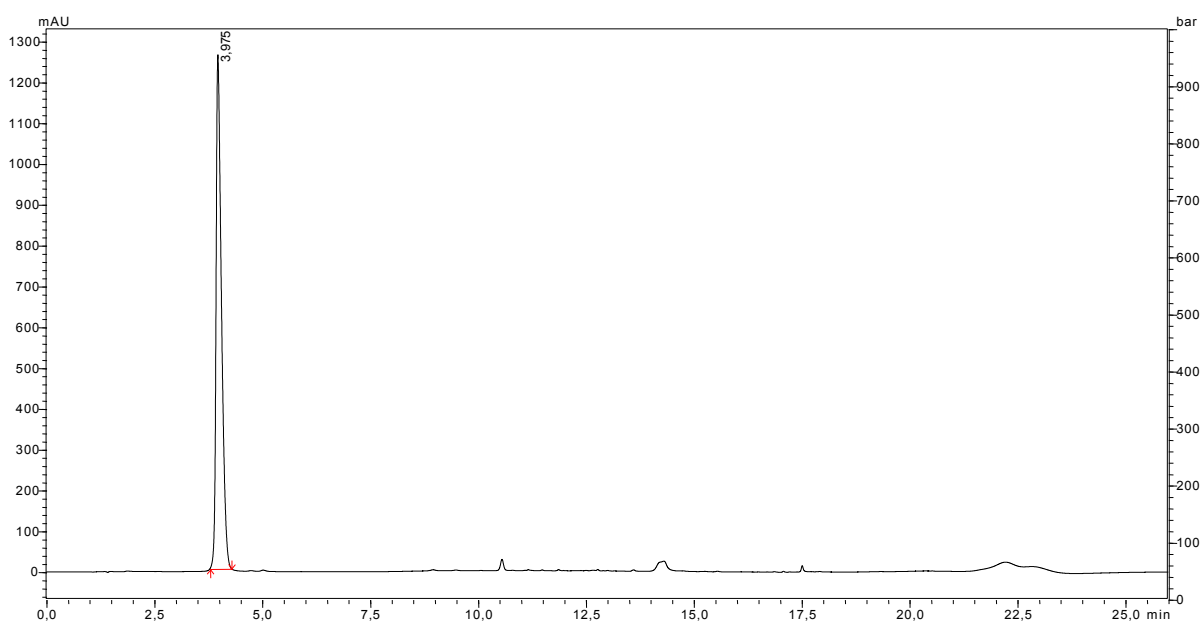
**Figura 3.7** – Cromatogramma HPLC-PREP 1 per la raccolta delle frazioni di ADV di Riva del Garda 2021



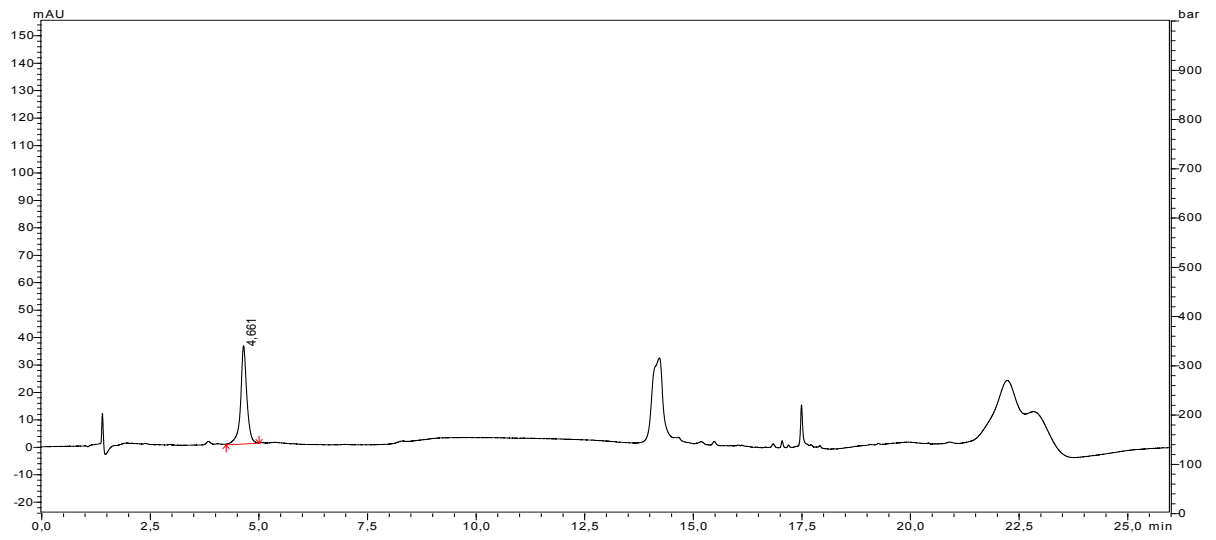
Come si può osservare dai cromatogrammi (**Figura 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4**), per ogni acqua di vegetazione, il tempo di ritenzione può risultare leggermente diverso. Questa problematica può essere dovuta al fatto che la colonna cromatografica utilizzata non è termostata; quindi, la temperatura del laboratorio può influire sui tempi di ritenzione: per questo, in alcuni casi, è stato necessario effettuare le raccolte manualmente. Ogni volume raccolto è stato sottoposto ad analisi qualitativa per confermare la presenza dei polifenoli e osservare il grado di impurità presente. Dopo ogni valutazione sono stati inseriti i volumi raccolti in apposite provette per la loro conservazione. Raggiunto il quantitativo di circa 50 mL, è stata eseguita un'analisi (HPLC-DAD) per determinare la concentrazione effettiva di tutte le raccolte e osservare il profilo cromatografico (**Tabella 3.2**) e (**Figura 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12**).

**Tabella 3.2** – Concentrazione dei polifenoli (mg/L;  $\pm$  semidispersione max,  $n=2$ ) nelle frazioni riunite delle ADV

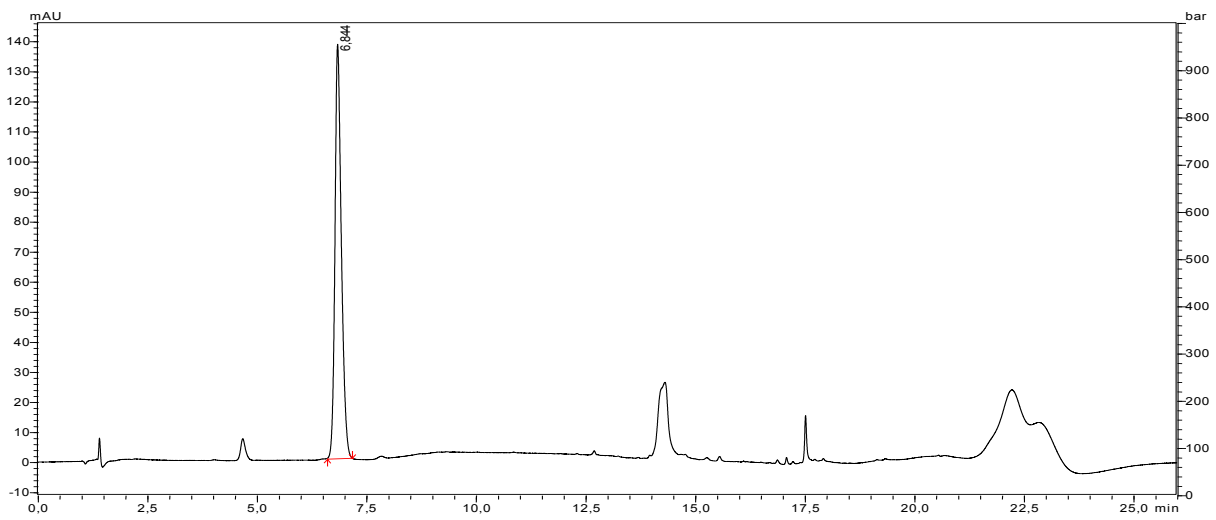
<b>Idrossitirosole</b>	$253.57 \pm 0.30$
<b>Pirocatecolo</b>	$50.32 \pm 0.16$
<b>Tirosolo</b>	$76.497 \pm 0.041$
<b>Ac. Caffeico</b>	$75.68 \pm 0.37$
<b>Oleuropeina</b>	$40.78 \pm 0.55$



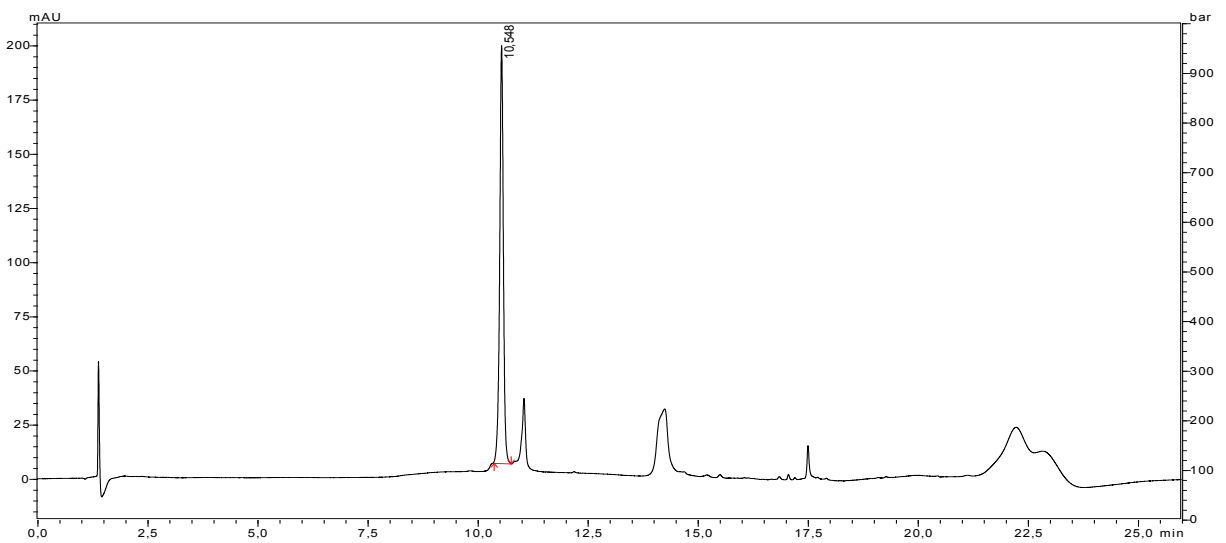
**Figura 3.8** – Cromatogramma HPLC-DAD della frazione raccolta di Idrossitirosole



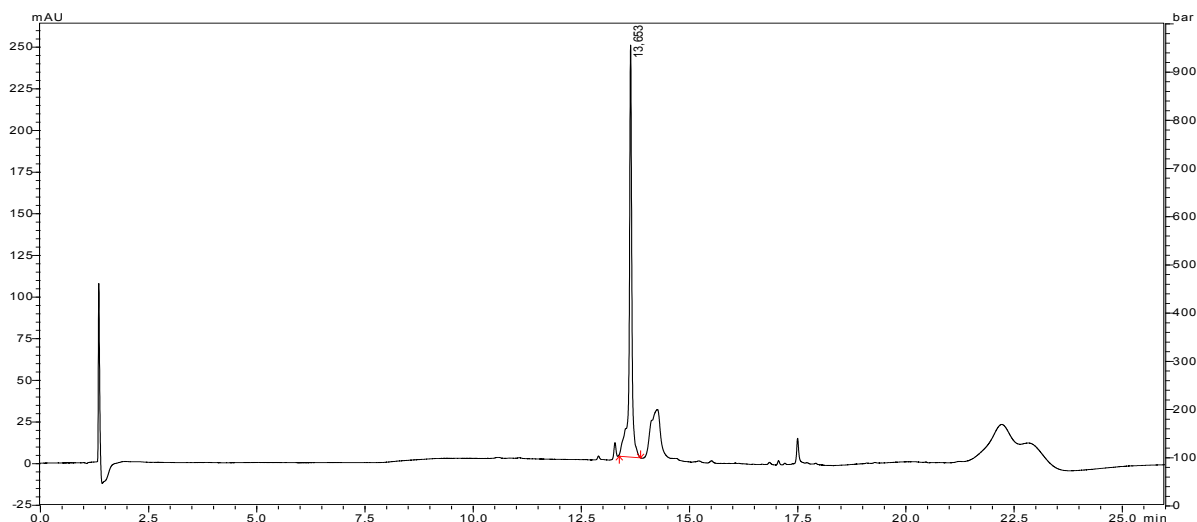
**Figura 3.9 - Cromatogramma HPLC-DAD della frazione raccolta di Pirocatecolo**



**Figura 3.10 - Cromatogramma HPLC-DAD della frazione raccolta di Tirosolo**



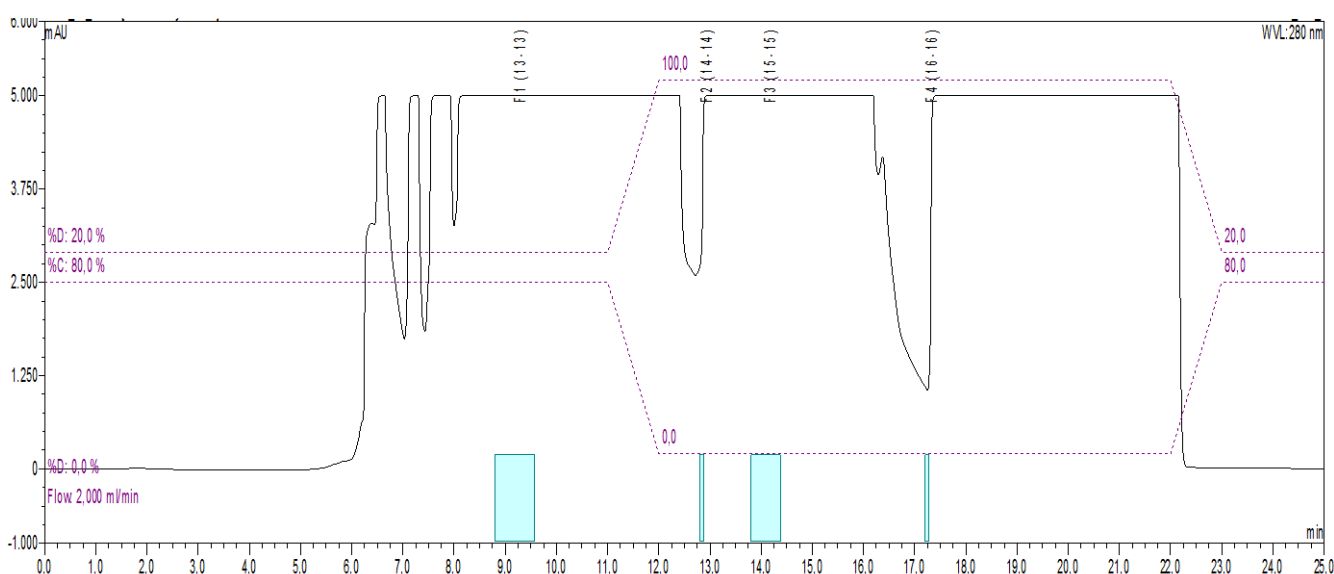
**Figura 3.11 - Cromatogramma HPLC-DAD della frazione raccolta di Acido Caffeoico**



**Figura 3.12 - Cromatogramma HPLC-DAD della frazione raccolta di Oleuropeina**

### 3.2.2 Raccolta specifica di Idrossitirolo e Tirolo

Oltre al metodo di raccolta complessiva, è stato necessario impostare un ulteriore metodo per l'estrazione specifica di Idrossitirolo e Tirolo. Alla base di questa necessità c'era l'esigenza di raccogliere due polifenoli dalle acque di vegetazione di Riva del Garda 2021 con concentrazione 20 volte maggiore rispetto al campione originario. Ovviamente, aumentare di molto la concentrazione da analizzare significa ridurre drasticamente la risoluzione dei picchi; infatti, questi uscivano fuori scala e si sommarono tra di loro. Perciò è stato essenziale creare un nuovo gradiente di eluizione e individuare il corretto intervallo di raccolta (paragrafo 2.3.2) (**Figura 3.13**).



**Figura 3.13 – Cromatogramma HPLC-PREP 2 per la raccolta delle frazioni di Idrossitirolo e Tirolo**

Dopo averle raccolte, le frazioni sono state diluite 1:100 e analizzate in UHPLC per determinare la concentrazione di Idrossitirosolo e Tirosolo e osservare il grado di impurità (**Tabella 3.3**).

*Tabella 3.3 – Concentrazione di Idrossitirosolo e Tirosolo (mg/L,  $\pm$  semidispersione max, n =2) nella frazione raccolta con il metodo cromatografico specifico*

	<b>Conc. 1:100 determinata</b>	<b>Conc. frazione</b>
<b>Idrossitirosolo</b>	52.4 $\pm$ 6.4	5240 $\pm$ 640
<b>Tirosolo</b>	18.112 $\pm$ 0.027	1811.2 $\pm$ 2.7

### 3.3 DEGRADAZIONE DEI POLIFENOLI

La degradazione è un fattore importante da considerare nello studio di queste sostanze, al fine di stabilirne il tempo di vita e quindi la loro efficacia in determinate condizioni di temperatura ed esposizione alla luce. L'elaborato della dott.ssa Da Re, ha fornito fin da subito informazioni sulla degradazione termica dei polifenoli, suggerendo, nelle varie fasi di laboratorio, come già accennato in precedenza, di non superare i 30 °C. Oltre alla degradazione termica è stato fondamentale capire se l'effetto della luce portasse a degradazione. La degradazione dei polifenoli è stata analizzata sia in presenza del solvente che a secco, questo per simulare le condizioni di stabilità anche sulle foglie dell'ulivo.

#### 3.3.1 Degradazione nel solvente

Per questo studio, non avendo a disposizione le acque di vegetazione del 2021, sono state utilizzate quelle di Riva del Garda 2020, conservate fino ad allora ad una temperatura di 4 °C e al riparo da fonti luminose. Prima di iniziare la sperimentazione si è valutata la presenza dei polifenoli e, come si può osservare dalla **Tabella 3.4**, le concentrazioni al tempo 0 sono risultate 10 volte inferiori alle concentrazioni riscontrate nel precedente elaborato. Questo dimostra che, nonostante il campione fosse conservato con i criteri sopra indicati, nell'arco di un anno questi composti tendono comunque a degradarsi.

Tabella 3.4 – Degradazione dei polifenoli nel solvente al buio e alla luce (25 °C).  
Le incertezze di misura sono espresse come semidispersione massima (n=2)

		Concentrazione ppm (mg/L)													
		25 °C buio							25 °C + 16 ore luce						
		Tempo 0	3 gg	7 gg	10 gg	14 gg	17 gg	27 gg	3 gg	7 gg	10 gg	14 gg	17 gg	27 gg	
Idrossitiroso	134.97 ± 0.48	133.67 ± 0.55	131.39 ± 0.11	134.70 ± 0.38	132.10 ± 0.18	130.160 ± 0.040	132.63 ± 0.38	145.12 ± 0.67	138.78 ± 0.79	137.548 ± 0.017	138.51 ± 0.14	135.11 ± 0.59	137.91 ± 0.62		
Procatecolo	6.222 ± 0.031	6.113 ± 0.055	6.1215 ± 0.0085	6.148 ± 0.029	6.412 ± 0.054	6.450 ± 0.0070	7.041 ± 0.035	6.025 ± 0.027	5.782 ± 0.071	5.780 ± 0.033	5.8710 ± 0.0010	5.68 ± 0.011	6.231 ± 0.019		
Tiroso	36.37 ± 0.15	43.19 ± 0.10	50.2955 ± 0.0055	54.050 ± 0.065	56.44 ± 0.59	56.455 ± 0.058	60.43 ± 0.26	35.593 ± 0.059	34.894 ± 0.044	34.936 ± 0.017	47.356 ± 0.019	80.49 ± 0.22	n.d.		
Ac. Caffèico	26.421 ± 0.052	31.08 ± 0.52	34.64 ± 0.28	36.40 ± 0.33	40.97 ± 0.13	n.d.	n.d.	18.28 ± 0.11	15.829 ± 0.039	11.143 ± 0.078	8.708 ± 0.091	6.952 ± 0.038	3.255 ± 0.044		
Oleuropeina	38.90 ± 0.16	34.8875 ± 0.0015	28.19 ± 0.77	28.423 ± 0.016	31.60 ± 0.34	30.201 ± 0.047	49.894 ± 0.064	28.458 ± 0.034	25.47 ± 0.17	23.986 ± 0.066	21.22 ± 0.34	21.107 ± 0.029	13.33 ± 0.33		
<b>Δ, Effetto della fotodegradazione*</b>															
	3 gg	7 gg	10 gg	14 gg	17 gg	27 gg									
Idrossitiroso	1.5 ± 1.2	7.40 ± 0.90	2.85 ± 0.39	6.42 ± 0.32	4.95 ± 0.63	5.3 ± 1.0									
Procatecolo	-0.088 ± 0.082	-0.340 ± 0.080	-0.368 ± 0.062	-0.541 ± 0.055	-0.751 ± 0.018	-0.810 ± 0.054									
Tiroso	-7.60 ± 0.16	-15.402 ± 0.049	-19.114 ± 0.082	-9.08 ± 0.61	24.03 ± 0.28	n.d.									
Ac. Caffèico	-12.81 ± 0.63	-18.81 ± 0.36	-25.25 ± 0.41	-32.26 ± 0.22	n.d.	n.d.									
Oleuropeina	-6.430 ± 0.036	-2.73 ± 0.94	-4.427 ± 0.082	-10.39 ± 0.68	-9.094 ± 0.076	-36.57 ± 0.39									

\* Variazione della concentrazione per effetto dell'esposizione alla luce  
n.d.: non determinato

È stato possibile notare come l'Idrossitirosole, il Pirocatecolo e il Tirosole, non abbiano subito una particolare degradazione, a differenza dell'Ac. Caffeico e dell'Oleuropeina, i quali hanno manifestato un calo notevole sia nelle condizioni di buio che in quelle di luce. La degradazione si è verificata anche alla temperatura di 25 °C ma, come si può osservare dalla tabella, l'effetto dell'esposizione alla luce ha contribuito particolarmente (in rosso l'effetto della sola fotodegradazione). Inoltre, si vuole precisare che alcune crescite di concentrazione anomale, con il passare delle settimane, sono attribuibili a una possibile evaporazione del solvente (MeOH) dalla vial, causata dalla chiusura errata del tappino.

### 3.3.2 Degradazione a secco (senza solvente)

Per questo test sono state utilizzate le acque di vegetazione di Montecchia di Crosara 2022, purificate e concentrate quattro volte rispetto al campione fornito: questo perchè, all'uscita del frantoio, erano scarse di polifenoli. A differenza della precedente sperimentazione di degradazione, è stato fondamentale portare a secco l'aliquota di frazione raccolta contenente i polifenoli. Tutte le vial, suddivise per polifenolo e per giorno di analisi, sono state collocate in condizioni di luce stabilizzata e temperatura di 25 °C. La successiva solubilizzazione è avvenuta con sola acqua milliQ, utilizzando per 1-2 minuti il vortex. La prova di degradabilità a secco ha permesso di esaminare la stabilità dei polifenoli, in assenza di acqua e MeOH, in un ambiente aperto con temperatura di 25 °C e fotoperiodo di 16 ore (**Tabella 3.5**). Questa procedura è servita a simulare un ipotetico trattamento sulla chioma dell'ulivo, con l'intento di stimare il tempo di degradazione dei polifenoli, senza l'aggiunta di stabilizzanti. Come si può notare dai grafici (**Figura 3.14 e 3.15**), in tutti i polifenoli c'è stata una degradazione generale; le due specie meno persistenti sono state l'Oleuropeina e l'Acido Caffeico che, in soli tre giorni, hanno avuto una diminuzione della concentrazione di  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{3}$  rispetto alla condizione iniziale. È doveroso soffermarsi sulle modalità di degradazione, in quanto quest'ultime sono avvenute in laboratorio in condizioni controllate.

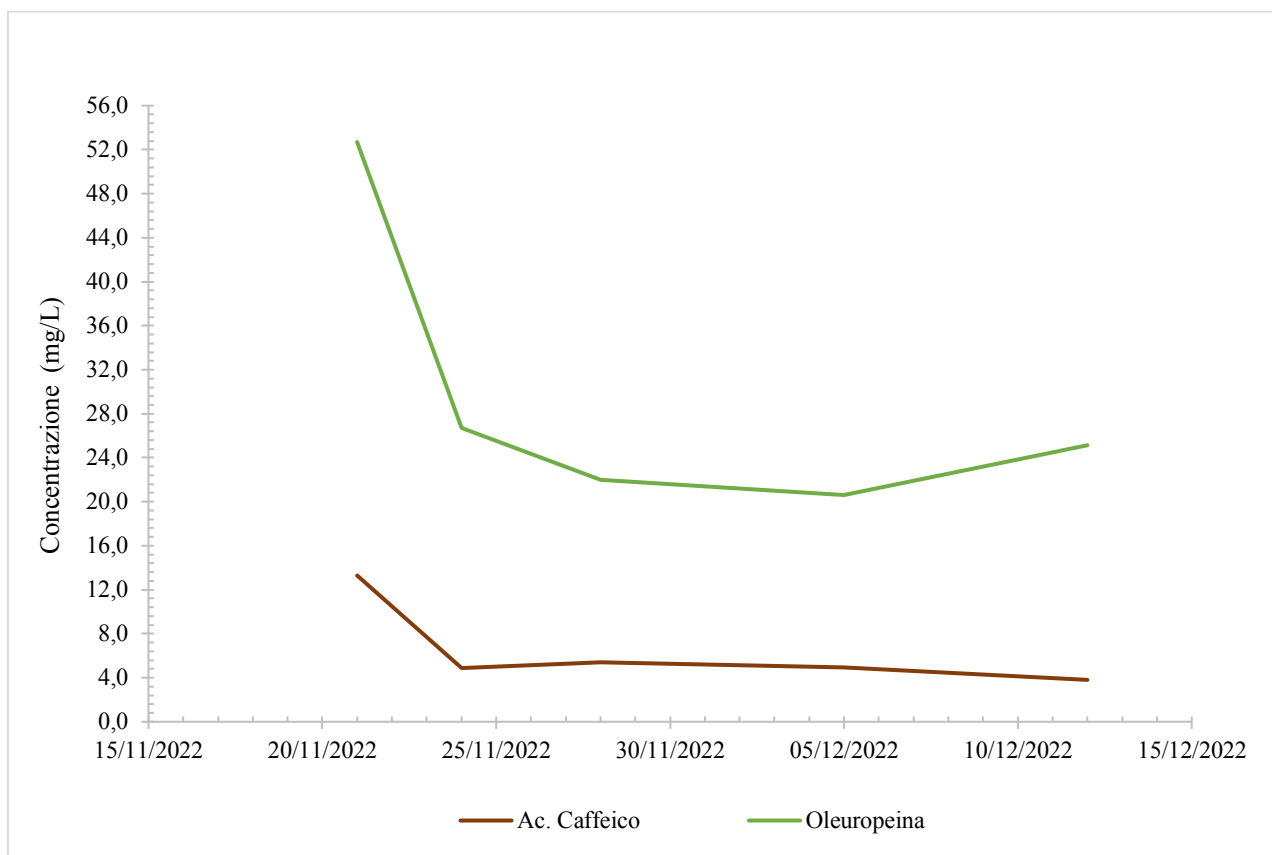


Tabella 3.5 – Degradazione dei polifenoli a secco con fotoperiodo (s=semidispersione max, n=2)

Concentrazioni ppm (mg/L)															
tempo 0 (21/1/2022)		3 giorni (24/1/2022)			7 giorni (28/1/2022)			14 giorni (05/2/2022)			21 giorni (12/2/2022)				
Misura 1	Misura 2	$\bar{x} \pm s$	Misura 1	Misura 2	$\bar{x} \pm s$	Misura 1	Misura 2	$\bar{x} \pm s$	Misura 1	Misura 2	$\bar{x} \pm s$	Misura 1	Misura 2	$\bar{x} \pm s$	
Idrossitiroso	22.2	21.634	21.92±0.28	17.329	17.009	17.17±0.16	17.525	17.242	17.38±0.14	17.244	17.223	17.234±0.011	15.894	15.951	15.923±0.028
Procatecolo	19.785	23.538	21.7±1.9	20.682	20.188	20.44±0.25	20.069	19.953	20.011±0.058	19.654	19.689	19.672±0.018	19.527	19.335	19.431±0.096
Tirosolo	28.833	28.558	28.70±0.14	25.726	25.741	25.7335±0.0075	16.964	16.953	16.9585±0.0055	25.786	25.922	25.854±0.068	22.296	22.39	22.343±0.047
Ac. Caffè	13.43	13.166	13.30±0.13	4.695	5.084	4.89±0.19	5.389	5.381	5.3850±0.0040	4.865	4.983	4.924±0.059	3.762	3.853	3.808±0.045
Oleuropeina	51.914	53.471	52.69±0.78	26.193	27.26	26.73±0.53	21.872	22.055	21.964±0.091	20.516	20.703	20.610±0.094	24.692	25.61	25.15±0.46



**Figura 3.14** – Degradabilità dell'Idrossitiroso, del Pirocatecolo e del Tiroso in assenza del solvente



**Figura 3.15** – Degradabilità dell'Acido Caffeiico, e dell'Oleuropeina in assenza del solvente

La degradazione in campo può essere molto diversa da quella di laboratorio, infatti, il primo ostacolo che può creare una notevole disparità è l'effetto della radiazione ultravioletta, molto più potente rispetto alla lunghezza d'onda posta in laboratorio. Inoltre, considerando che un possibile trattamento venga effettuato a fine estate inizio autunno, bisogna valutare l'elevata umidità dell'aria che può creare dilavamento delle foglie e quindi scomparsa dei polifenoli. Quindi, se già in laboratorio si verifica un'importante degradazione, questo fenomeno in campo sarà ancora più accentuato. Questo fattore renderà necessario lo studio di stabilizzanti, che dovranno prolungare la vita dei polifenoli e lo studio delle condizioni di applicazione di queste sostanze in agricoltura.

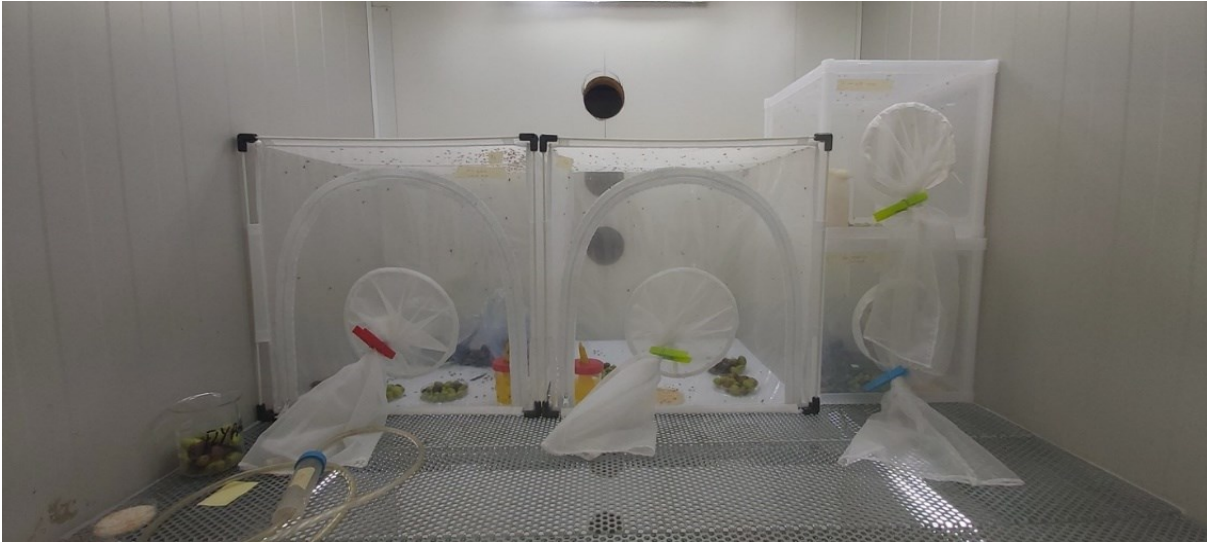
## 4. PROSPETTIVE FUTURE

La raccolta e la conservazione dei polifenoli sono di fondamentale importanza per gli studi successivi, riguardanti le proprietà di queste sostanze. Infatti, le soluzioni a concentrazione nota di polifenoli, raccolte dalle acque di vegetazione, hanno lo scopo di essere testate sulla mosca dell'olivo e sui batteri simbiotici della mosca. Il primo passo sarà l'individuazione e la cattura dell'insetto in campo, al fine di iniziare l'allevamento in laboratorio. Nel momento in cui sarà stabilito il numero di mosche da testare, verrà effettuata la sperimentazione di ovideterrenza sulle olive, mentre sarà necessario determinare la MIC (Minimal Inhibitory Concentration) per lo studio sul batterio simbiote e successivo test sulla mosca. Infine, sarà necessario affinare la procedura cromatografica di raccolta delle frazioni di polifenoli al fine di ridurre alcune possibili problematiche riscontrate nella presente sperimentazione e rendere più robusto e automatizzabile l'intero processo.

### 4.1 TEST FUTURI SULLA MOSCA DELL'OLIVO

#### 4.1.1 Allevamento

Il metodo più semplice e veloce per la cattura della mosca è quello di prelevare le olive attaccate da *B.oleae* da oliveti non trattati nei mesi di agosto, settembre, ottobre e novembre. Le olive saranno portate in laboratorio e poste all'interno di Bug dorm (30 x 30 x 30 cm); dopo circa un mese tutte le larve saranno diventate adulte (**Figura 4.1**). È quindi necessario predisporre un abbeveratoio e una piastra Petri, contenente saccarosio e lievito in polvere liofilizzato (4:1). Al fine di ottenere nuove generazioni sarà fondamentale inserire delle olive mature dove avverrà l'ovodeposizione. Una volta a settimana, le olive con l'uovo innestato, verranno separate dalle altre e poste sopra una griglia appoggiata su di un contenitore con all'interno della farina di mais, per evitare l'agglomerarsi delle pupe. Due volte a settimana sarà setacciata la farina per raccogliere le pupe e inserirle nuovamente nello sfarfallatoio.



*Figura 4.1 – Allevamento della mosca in Bug dorm*

### 4.1.2 Prova di ovideterrenza

In passato è stata condotta una sperimentazione di ovideterrenza su *B.oleae* nel lavoro di tesi magistrale della Dott.ssa Ivana Carofano. La sperimentazione consisteva nell’immergere le olive nelle varie soluzioni per 1 secondo (dipping) e lasciarle asciugare su un piano non assorbente. Come controllo sono state adoperate olive immerse in acqua. Sono state predisposte gabbie di volume di 2 L all’interno delle quali sono state introdotte 9 femmine e 20 olive. La sperimentazione è stata condotta a temperatura ambiente (18-20 °C) per 24 ore. L’alimentazione è stata effettuata strofinando sulla superficie della retina della gabbia una soluzione di acqua e zucchero, mentre per l’idratazione è stata usata una eppendorf con cotone idrofilo imbevuto di acqua. Al termine delle 24 ore, 10 olive sono state utilizzate per la valutazione del numero di punture sterili e fertili e 10 olive per monitorare lo sviluppo della mosca allo stadio di pupa. In previsione di uno studio con i composti qui isolati, è doveroso considerare che i polifenoli, soprattutto l’Oleuropeina e l’Acido Caffeico, in un giorno possono avere una significativa degradazione; quindi, sarà opportuno ridurre il più possibile i tempi del test.

### 4.1.3 Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

Attualmente il ceppo batterico *Ca. E. dacicola*, come già descritto inizialmente, non può essere coltivato in laboratorio perciò, per la sperimentazione condotta nell’elaborato della Dott.ssa Carofano, sono stati utilizzati due ceppi di *E. persicina* (LMG 11254<sup>T</sup> e LMG 25707).

I ceppi, conservati in glicerolo e mantenuti a -80 °C, sono stati riattivati su piastre di Nutrient Agar (peptone 5 g/L, Meat extract 3 g/L, Agar 15 g/L) a pH 7 e incubati in aerobiosi a 28 °C per 72 ore. Una singola colonia è stata quindi inoculata in 40 mL di Nutrient Broth (NB) e incubata a 28 °C per 48 ore. Per determinare la relazione tra il numero di OD<sub>600</sub> (Optical Density,  $\lambda=600$  nm) e il numero di colonie è stato eseguito il seguente protocollo:

- da una coltura cresciuta overnight misurare l'OD<sub>600</sub>;
- diluire la coltura 1:10 usando provette sterili e soluzione fisiologica sterile 0,9% (p/v) di NaCl (diluizione 10<sup>-1</sup>);
- calcolare il numero di cellule con vetrino FAST-READ 102<sup>®</sup>, un dispositivo di plastica composto da 10 camere di conta, ogni camera dispone di una griglia composta da 10 quadrati ciascuno dei quali è a sua volta suddiviso in 16 quadrati più piccoli (detti settori). Quindi, dopo aver riempito la camera di conta con il campione si procede al conteggio delle cellule distribuite in N quadrati, considerando che la griglia è costituita da 10 quadrati, ognuno di dimensione 1x1 mm, profondità 0,1 mm e volume di 0,1  $\mu$ L, la formula per determinare la concentrazione delle cellule (cellule/mL) è: [cellule/mL] =  $\sum$  cellule contate in N quadrati x fattore di diluizione x 10<sup>4</sup>, dove 10<sup>4</sup> è la conversione da 0,1  $\mu$ L a 1 mL;
- correlare il numero di cellule ottenuto con il valore OD<sub>600</sub> della coltura.

Il test è stato eseguito in triplicato per ciascun ceppo e il numero di cellule finali è stato standardizzato per ottenere una concentrazione pari a 5 x 10<sup>5</sup> unità formanti colonie (UFC/mL). Le diluizioni delle sostanze inibitrici sono state preparate a concentrazioni superiori e inferiori rispetto alla dose di campo e testate in micropiastre da 96 pozzetti. La preparazione delle piastre ha previsto il seguente protocollo:

- aggiungere 100  $\mu$ L di soluzione antimicrobica e 100  $\mu$ L di brodo contenente la coltura cellulare in ciascun pozzetto;
- aggiungere 100  $\mu$ L di brodo senza inoculo e 100  $\mu$ L di brodo con inoculo (no soluzione antimicrobica) per il controllo positivo;
- aggiungere 100  $\mu$ L di brodo senza inoculo e 100  $\mu$ L di soluzione antimicrobica (alla dose di campo) per il controllo negativo;
- leggere l'OD a 600 nm;
- incubare per 24 ore a 28 °C;
- leggere l'OD a 600 nm.



Per ciascuna sostanza è stato utilizzato un controllo della crescita batterica (senza sostanza antimicrobica) e un controllo di sterilità (brodo di coltura e sostanza antimicrobica alla concentrazione della dose di campo).

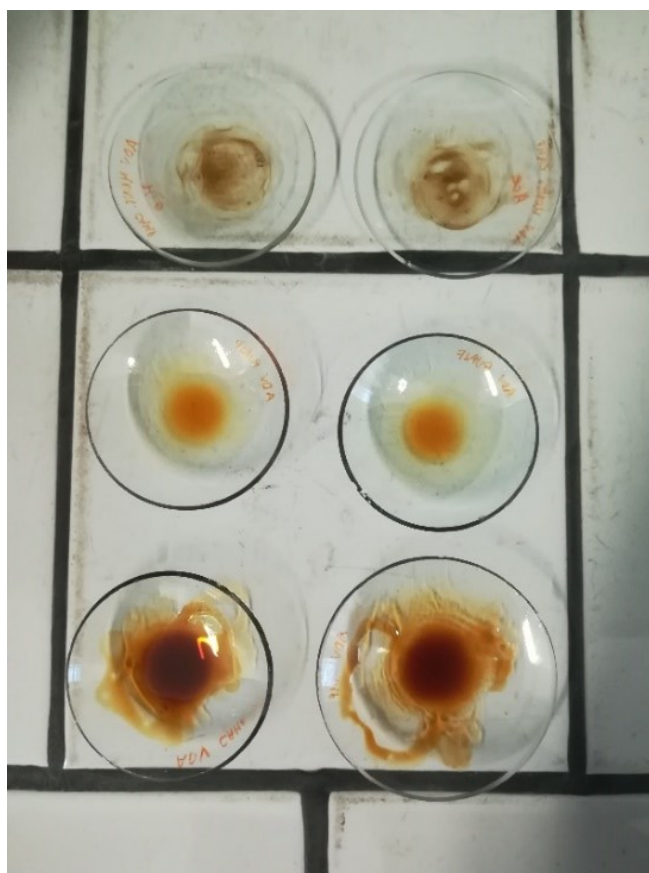
Le diluizioni che avevano inibito la crescita dei batteri (cioè quelle pari o superiori alla MIC osservata in micropiastre) sono state distribuite su piastre di Nutrient Agar (pH 7) e incubate per 24 ore a 28 °C per determinare il numero di CFU.

La stessa procedura utilizzata in questo esperimento potrebbe essere testata per i polifenoli raccolti. Quando si avrà determinato la minima concentrazione inibitoria, si effettueranno i trattamenti con i polifenoli sulle olive intaccate dalle uova. Poi si andrà ad analizzare i geni prestabiliti di *Ca. E. dacicola* su ogni stadio dell'insetto. I risultati determineranno la presenza o meno del batterio simbionte nei vari stadi.

## 4.2 ANALISI DELLA COMPONENTE VISCOSA DELLE ACQUE DI VEGETAZIONE

L'analisi delle acque di vegetazione e la raccolta di polifenoli hanno spesso causato un intasamento in colonna. Si è ipotizzato che ciò sia dovuto alla presenza di lipidi, probabilmente acidi grassi liberi. Infatti, durante la preparazione dei campioni, si è potuto notare come l'evaporazione dell'acqua e del metanolo, non portasse a completo essiccamento ma piuttosto a una soluzione viscosa. Perciò sono stati predisposti, nei vetrini, piccoli volumi (1 mL) di acque di vegetazione senza nessuna purificazione e acque purificate. Nella **Figura 4.2** si può notare, partendo dall'alto, le ADV di Montecchia di Crosara, le ADV purificate di Riva del Garda 2021, e le ADV di Riva del Garda 2021 non purificate. Tutte le acque sono state sottoposte ad evaporazione mediante flusso di azoto costante. È stato possibile osservare che tutte le ADV presentavano chi più (ADV Riva del Garda) chi meno (ADV Montecchia di Crosara) una componente viscosa e appiccicosa. Se a questa componente viscosa veniva aggiunto lo stesso quantitativo (1 mL) di acqua (vetrini di sinistra) e acetone (vetrini di destra) si osservava una parziale solubilizzazione di tutti i residui, sia in acqua che in acetone. Al fine di ridurre l'ostruzione in colonna sarà fondamentale predisporre un'analisi approfondita di tali residui per verificare quali composti causano la viscosità delle ADV. Questa caratteristica fisica potrebbe anche essere sfruttata per la creazione di un prodotto che intrappoli la mosca sulla superficie dell'oliva: l'insetto potrebbe rimanervi invischiato senza possibilità di ovideporre.

Sarà inoltre necessario capire se il pretrattamento ad osmosi inversa delle ADV, presente in alcuni frantoi, agevoli effettivamente l'analisi e la raccolta dei polifenoli.



*Figura 4.2 – Componente viscosa delle ADV*

### 4.3 DEGRADAZIONE DEI POLIFENOLI IN CAMPO

Come già descritto in precedenza, la degradazione dei polifenoli è un importante fattore da considerare in ambito agricolo. Infatti, in base a questo, vengono stabilite le modalità di conservazione degli stessi, il loro utilizzo e possibili tempi di carenza. Perciò, si dovrà stabilire un metodo di trattamento in campo e un successivo metodo di campionamento dei polifenoli sulle parti di ulivo esposte alle sostanze. Sarà necessario definire il numero di ulivi da sottoporre al trattamento per supportare i dati con i relativi test statistici. Ovviamente la sperimentazione in campo dovrà considerare tutte le condizioni ambientali e meteorologiche, per far sì che tutti i trattamenti siano congrui all'analisi. È consigliabile recuperare i polifenoli, distribuiti nella chioma dell'ulivo, nell'arco temporale che va da poche ore a qualche giorno. Quando verrà stabilita la degradazione dei polifenoli in campo sarà possibile identificare i migliori stabilizzanti per prolungare il tempo di vita dei polifenoli.



## 5. CONCLUSIONI

Questo lavoro di tesi ha permesso di individuare un metodo per la raccolta dei singoli polifenoli di interesse. È stato fondamentale ottimizzare un metodo che fosse economico e praticabile e, in futuro, possibilmente trasferibile a livello industriale. L'idea di trattare le acque reflue dei frantoi in impianti atti all'estrazione di questi polifenoli, favorisce la purificazione parziale delle acque rendendole meno dannose all'ambiente e alla microfauna. Attualmente, il mercato si sta indirizzando nella prospettiva dell'economia circolare, perciò il riutilizzo e il riciclo sono presenti in tutti i settori industriali. Riuscire ad estrarre i polifenoli da un prodotto di scarto, risulta un ulteriore passo per varcare la soglia di un mondo più sostenibile e sempre più consapevole delle risorse presenti.

In questo elaborato è stato possibile confrontare le acque di Riva del Garda 2021 con le acque di Riva del Garda 2020. I risultati ottenuti sono stati pressochè comparabili, anche se ovviamente le concentrazioni sono influenzate dall'annata di raccolta delle olive; per esempio un contenuto maggiore di Oleuropeina potrebbe significare una raccolta delle olive anticipata rispetto all'anno precedente. La raccolta dell'Idrossitirosolo, del Pirocatecolo, del Tirosolo, dell'Acido caffeico e dell'Oleuropeina, nei campioni di ADV, è stata fondamentale per questo elaborato di tesi, perchè ha permesso di ottenere delle soluzioni a titolo noto di questi polifenoli. Realizzare un unico metodo di raccolta, anziché due, ha consentito di ridurre i tempi di gestione e di evitare ripetuti cambi di programma di eluizione. Infatti si è passati da due programmi di quasi 40 minuti ciascuno, ad un programma unico di 60 min. Il tempo risparmiato è stato notevole; infatti, oltre alla corsa cromatografica, deve essere considerato anche il tempo di riequilibrio tra una corsa e l'altra (20 minuti) risparmiando così circa 40 minuti totali.

Nel caso in cui si volessero raccogliere delle frazioni più concentrate è opportuno ideare dei programmi per la raccolta a coppie, come è stato effettuato con l'Idrossitirosolo e il Tirosolo. Quali coppie di polifenoli scegliere dipende dalla vicinanza di eluizione; la scelta di raccogliere l'Idrossitirosolo con il Pirocatecolo potrebbe influire negativamente sul risultato finale, infatti, questi due polifenoli hanno un tempo di eluizione troppo vicino per poter essere raccolti ad alte concentrazioni.

La seconda parte della sperimentazione ha dimostrato che i polifenoli meno stabili alla temperatura e alla luce sono stati l'Acido caffeico e l'Oleuropeina. La presenza del solvente ha influito poco sulla stabilità dei polifenoli.

Questo studio è stato effettuato per fornire un'idea sulla degradazione dei singoli fenoli in condizioni di laboratorio e per capire il miglior modo di conservazione. Ovviamente questi

risultati dovranno essere considerati nei futuri test sulla mosca dell'olivo e il suo batterio simbiote.

In conclusione, si può affermare che questo elaborato di tesi è solo una parte di uno studio più complesso inerente alla tematica principale dell'olivicoltura. Infatti, ci sono sperimentazioni future da effettuare, che serviranno a stabilire se i polifenoli estratti dalle acque reflue dei frantoi, possano ridurre gli attacchi di *B.oleae* nelle olive. È evidente che, se i test futuri porteranno a risultati soddisfacenti, allora il mondo dell'olivicoltura potrebbe avere una svolta, sia per quanto riguarda la gestione delle acque reflue dei frantoi che per l'utilizzo di un nuovo prodotto sostenibile.

## 6. BIBLIOGRAFIA

AIPO (2016) Le principali cultivar di ulivo in Italia e nel mondo

Amiot M.J, Fleuriot A., Macheix J.J. (1986) *Importance and Evolution of Phenolic Compounds in Olive during Growth and Maturation*

Bagnoli B., Guarino A. (2020), Il controllo integrato della mosca delle olive a seguito della revoca del dimetoato, Giornate fitopatologiche

Bocchi S., Spigarolo R., Ronzoni S., Caligiore F. (2014), Produzioni vegetali, L'olivo, 338-373

Capuzzo C., Firrao G., Mazzon L., Squartini A. & Girolami V. (2005), “*Candidatus Erwinia dacicola*”, a coevolved symbiotic bacterium of the olive fly *Bactrocera oleae* (Gmelin). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1641–1647

Da Re C. (2022) Tesi di laurea Magistrale, *Determinazione di composti polifenolici nelle acque di vegetazione di frantoio in relazione al loro possibile effetto repellente e/o insetticida nei confronti della mosca dell'olivo (Bactrocera oleae)*

De Marco, E., Savarese M., Paduanoe A., Sacchi R. (2007) Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food chemistry*, 858-867

Di Ilio V., Cristofaro M. (2020) *Polyphenolic extracts from the olive mill wastewater as a source of biopesticides and their effects on the life cycle of the Mediterranean fruit fly Ceratitis capitata (Diptera, Tephritidae)*

Di Simone S. C., Flores G. A., Acquaviva A., Nilofar, Libero M. L., Venanzoni R., Tirillini B., Orlando G., Zengin G., Lai F., Fiorini D., Angelini P., Menghini L., Ferrante C. (2023) Official Journal of the Societa Botanica Italiana. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology. Phytochemical and biological properties of the water extract from roots and leaves of Lactuca longidentata, an endemic phytoalimurgic (food) species of Central Sardinia (Italy).*

Ferrari M., Marcon E., Menta A. (2006), *Fitopatologia, entomologia agraria e biologia applicata*

Gazzetta Ufficiale n. 256, legge n. 547 del 12 novembre 1996, *Nuove norme in materia di utilizzazione agronomica delle acque di vegetazione e di scarichi dei frantoi oleari*, (art.1)

Gazzetta Ufficiale n. 88, Decreto legislativo n. 152 del 3 aprile 2006, art. 112 *Utilizzazione agronomica*, (comma 1 e 2)

Gazzetta Ufficiale n. 88, Decreto legislativo n. 152 del 3 aprile 2006, art. 74 *Definizioni*, (comma 1)

Gazzetta Ufficiale n. 124, Decreto del Presidente della Repubblica n. 59 del 13 marzo 2013, art. 3 *Autorizzazione Unica Ambiente*

Gazzetta Ufficiale n. 88, Decreto legislativo n. 152 del 3 aprile 2006, art. 10 *Coordinamento delle procedure di VAS, VIA, Verifica di assoggettabilità a VIA, Valutazione di incidenza e Autorizzazione integrata ambientale*, (comma 7 bis)



Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea 173/39, Regolamento di Esecuzione (UE) n. 1090 del 26 giugno 2019, *relativo al mancato rinnovo dell'approvazione della sostanza attiva dimetoato, in conformità al regolamento (CE) n. 1107/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari, e che modifica l'allegato del regolamento di esecuzione (UE) n. 540/2011 della Commissione*

Girolami V., (1973), *Reperti morfo-istologici sulle batteriosimbiosi del Dacus oleae Gmelin e di altri ditteri tripetidi, in natura e negli allevamenti su substrati artificiali* 269–294

Girolami, V. et al. (1981). Ovipositional deterrents in *Dacus oleae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 177-188

Carofano I. (2021) Tesi di laurea Magistrale, *Valutazione dell'effetto ovideterrente ed antimicrobico di sostanze attive a basso impatto ambientale per il controllo di Bactrocera oleae (Diptera: Tephritidae)*

Kusturin M. (2018), *Diritto dell'ambiente, Analisi delle varie normative sulla materia: il destino finale delle acque di vegetazione dei frantoi oleari*

Lercker G., Toschi T.G. (2005), *Dalle olive all'olio: un viaggio alla scoperta del più nobile dei condimenti, Aspetti tecnologici e caratteristiche degli oli da oliva*

Lo Scalzo R., Scarpati M.L., Verzegnassi B., Vita G., (1994) *Olea europaea, Chemicals repellent to Dacus oleae females*

McMurry J. (2011), *Fondamenti di chimica organica, Alcoli, feneoli, eteri e loro analoghi solforati* 221-243

Petri L., (1909) *Ricerche sopra i batteri intestinali della mosca olearia* 1–130

Tapia-Quiròs P., Montenegro-Landívar M.F., Reig M., Vecino X., Cortina J.L, Saurina J., Granados M. (2022), *Recovery of Polyphenols from Agri-Food By-Products: The Olive Oil and Winery Industries Cases*

Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea n. 248 Regolamento CEE n. 2568/91 della Commissione dell'11 luglio 1991, *Caratteristiche degli oli d'oliva e degli oli di sansa d'oliva nonché ai metodi ad essi attinenti*

## 7. SITOGRAFIA

- CREA, (2022) <https://www.crea.gov.it/-/olivicultura-italiana-un-nuovo-slancio-per-oliveti-tradizionali-e-intensivi>
- ISTAT, (2022) <http://dati.istat.it/Index.aspx?QueryId=33706>

## **8. RINGRAZIAMENTI**

Infine, in questa ultima pagina di tesi desidero dedicare uno spazio a tutte le persone che mi hanno supportato in tutto il mio percorso universitario. In primis desidero ringraziare immensamente, il mio relatore, il prof. Andrea Tapparo per essere una persona sempre solare, pronta e disponibile nel fornire i consigli adeguati e le conoscenze fondamentali per la tesi. Un ringraziamento sentito anche alla Dott.ssa Lidia Soldà che ha dimostrato una smisurata pazienza nel colmare ogni mio dubbio e perplessità e per essere sempre stata una figura di riferimento, gentile e amichevole. Desidero ringraziare Katia Fornaro del frantoio di Montecchia di Crosara per avermi accolto con molta prontezza e cortesia al frantoio e avermi fornito tutte le informazioni in merito. Un sentito grazie al Dott. Federico Marangoni e la Dott.ssa Ivana Carofano per avermi accolto nei loro laboratori e avermi illustrato le loro conoscenze di entomologia. Ringrazio infinitamente i miei genitori, mio fratello e mia sorella per avermi permesso di arrivare fin qui, credendo sempre in me e in quello che faccio e assecondando ogni mia passione. Ringrazio anche mia nonna che, a modo suo, ha voluto ascoltare ogni mio singolo ripasso in preparazione agli esami. Un sentito grazie anche a mio cognato Luca che ha valutato scrupolosamente la grammatica dell'ultima parte di tesi. Un ringraziamento particolarmente alla mia fidanzata Jessica che mi ha dato sempre la motivazione per non mollare, per spingermi sempre a fare meglio e per essermi sempre stata accanto. Grazie anche alla sua famiglia che mi ha aiutato nei momenti del bisogno. Grazie ai miei amici per la spensieratezza ricevuta, per le giornate e le serate passate insieme. Concludo, dedicando questa tesi alla mia determinazione e perseveranza nel raggiungere i propri obiettivi e i propri sogni.