

ECONOMIA CIRCOLARE: NON SOLO GEOMETRIE

*La valorizzazione sostenibile
degli scarti della filiera vitivinicola*



La valorizzazione delle materie prime secondarie è oggi per l'industria un'occasione per incrementare la propria competitività convertendo i costi di smaltimento in nuove strategie di profitto, creando nuovi prodotti e favorendo l'occupazione di personale specializzato alla gestione dei nuovi processi produttivi. Le nuove politiche europee di governo sostenibile delle produzioni potrebbero così diventare strumento propulsivo di benessere sociale e contribuire al miglioramento della salubrità ambientale e alla conservazione e difesa della biodiversità.

***Gianni Sacchetti**

****Alessandro Massi**

***Alessandra Guerrini**

***Massimo Tacchini**

***Immacolata Maresca**

***Ilaria Burlini**

***Alessandro Grandini**

****Tatiana Bernardi**

****Carmela De Risi**

Il costante incremento dell'impatto antropico sull'ambiente in termini di inquinamento, sfruttamento delle risorse, impoverimento della biodiversità, aumento della popolazione globale, accompagnato da una conseguente crescita costante della domanda in termini di energia, materie prime e prodotti, ha stimolato

istituzioni di governo e di ricerca a perseguire obiettivi focalizzati su nuovi approcci produttivi, alternativi allo sfruttamento diretto delle risorse prime, contribuendo a costruire e a consolidare un nuovo paradigma, ovvero quello dell'economia circolare concretizzato industrialmente nel concetto di bio-raffineria.



Mentre il concetto di economia circolare è definibile - in termini sintetici ma certamente esaurienti - come un sistema in grado di auto-alimentarsi e sostenersi economicamente, il termine di bio-raffineria concretizza lo stesso concetto a livello di processi produttivi industriali dove vengono massimizzate le rese di *output* (energia, prodotti con riferimento a ogni campo industriale) rispetto all'utilizzo delle materie prime, minimizzando o annullando la produzione di scarti. In sostanza, ciò che tradizionalmente veniva considerato *scarto della produzione*, con l'approccio del-

la bio-raffineria diventa sottoprodotto, *materia prima secondaria* convertita in nuovi prodotti commerciabili utilizzando un panel di strategie produttive a basso impatto ambientale e sostenibili rispetto alla circolarità dell'economia *bio* che li alimenta (Lin *et al.*, 2013).

Le materie prime secondarie: nuove risorse al servizio della sostenibilità e dell'innovazione industriale

Questo nuovo paradigma di ricerca e di produzione ha generato e consolidato l'interazione

dei saperi e delle competenze, da quella chimica a quella biologica, da quella ambientale a quella dell'ingegneria impiantistica, per rendere sempre più concreta la realtà della bio-raffineria, oggi sempre più consolidata in un modello industriale *bio-based*. Il passaggio dell'industria verso una maggiore sostenibilità per migliorare l'efficacia in termini di costi, l'efficienza dei processi e le credenziali ecologiche rende economicamente valido lo sviluppo di strategie sostenibili e innovative per il riutilizzo degli sprechi. Questa visione produttiva, di orizzonte globale e multidisciplinare, si accompagna necessariamente alla presa di coscienza delle istituzioni governative, chiamate a regolamentare la riduzione degli sprechi e dell'impatto sull'ambiente delle produzioni non virtuose - talvolta con modalità emergenziali (per es. il problema dell'inquinamento da agro-farmaci) - sostenendo un nuovo sviluppo sociale e industriale nella promozione della cultura del riuso e dell'annullamento dello scarto (*cradle-to-cradle policy*). Sulla base di queste premesse, l'Europa ha posto in essere, con progressiva scalarità virtuosa e rigidità nell'applicazione, diversi *drivers* normativi che vanno dalle *Landfill directives* alla più recente revisione della *Waste Policy Legislation* (http://ec.europa.eu/environment/waste/target_review.htm).

I rifiuti prodotti dalle aziende di trasformazione alimentare sono un buon esempio di un tipo di rifiuti - anche *pre-consumer* - generati su larga scala e a livello globale. Questo tipo di scarti sta diventando sempre più problematico in quanto in alcuni casi può rappresentare oltre il 50% del totale dei rifiuti prodotti nei Paesi, di cui almeno il 60-70% è costituito in media da sostanze organiche.

Da qui, la scala e il ritmo con cui le nostre filiere di trasformazione agroalimentare producono scarti

organici, per loro natura fermentabili e putrescibili, determinano inevitabilmente un problema normativo, di smaltimento, di logistica e in ultima analisi di costi per l'industria stessa.

La valorizzazione delle materie prime secondarie – non più scarti – è invece oggi per l'industria un'occasione per incrementare la propria competitività convertendo i propri costi di smaltimento in nuove strategie di profitto (nuovi prodotti), per favorire l'occupazione assumendo personale specializzato alla gestione profittevole dei nuovi processi produttivi, per adeguarsi alle nuove politiche europee di governo sostenibile delle produzioni diventando strumento propulsivo di benessere sociale e contribuendo al miglioramento della salubrità ambientale e alla conservazione e difesa della biodiversità.

Le strategie di valorizzazione e il progetto VALSOVIT (POR-FESR Emilia Romagna)

In generale, lo stato dell'arte della valorizzazione degli scarti agroalimentari consiste sostanzialmente in due tipi di approccio (Lin *et al.*, 2013):

- *Approccio di prima generazione.* Gli scarti vengono indirizzati al compostaggio, alla produzione di energia (digestione anaerobica) o trasferiti in discarica;

- *Approccio di seconda generazione.* Gli scarti vengono indirizzati verso processi con un più alto livello tecnologico e con elevata sostenibilità e un ridotto impatto ambientale (per es. tecnologie estrattive con basso o nullo impiego di solventi organici; strategie biotecnologiche e trasformatrice integrate; utilizzo di sistemi catalitici ad alta efficienza in processi a cascata) per ottenere (bio) sostanze ad alto valore aggiunto e con ricadute diversificate in più settori di mercato.

Sulla base di questi paradigmi, il laboratorio in rete Terra&Acqua

Tech del Tecnopolo dell'Università di Ferrara, il Centro Interdipartimentale di Ricerca Industriale Energia e Ambiente (CIRI-EA) dell'Università di Bologna, il Centro Ricerche Produzioni Animali (C.R.P.A. Lab.) di Reggio Emilia, il Consorzio Laboratorio Energia Ambiente (L.E.A.P.) di Piacenza, Caviro Distillerie (Faenza, RA; <http://www.caviro.com/it/>), Eridania Sadam SpA (Parma; <https://www.sadam.it>), CBC (Europe) Srl (Biogard Division; Cesena; <http://www.biogard.it/index.php/it/>), AmbrosiaLab Srl (Ferrara; <http://www.ambrosialab.it/it/>) hanno insieme costituito una partnership che si è coagulata attorno a un progetto di ricerca industriale strategica, rivolto agli ambiti prioritari della Strategia di Specializzazione Intelligente (POR-FESR 2014-2020) della Regione Emilia Romagna, dal titolo *Valorizzazione sostenibile degli scarti della filiera vitivinicola per l'industria chimica e salustistica* (acronimo: VALSOVIT).

La natura del partenariato, caratterizzata da soggetti industriali di rilevante importanza nel panorama produttivo della regione Emilia Romagna e da istituti di ricerca specializzati nel trasferimento tecnologico, si inserisce in un contesto regionale di filiera vitivinicola che allo stato attuale considera principalmente processi di valorizzazione di prima generazione degli scarti (raspi freschi, bucce, vinaccia bianca, feccia, teste e code di distillazione dell'etanolo). Le finalità progettuali di Valsovit invece si rivolgono in particolare a una valorizzazione di seconda generazione per ricercare importanti ricadute per l'industria chimica e salustistica, nonché della difesa delle piante in agricoltura promuovendo, con un approccio operativo ispirato a un modello di simbiosi industriale, uno sviluppo tecnologico sostenibile della filiera. Per gli aspetti di progetto relativi alla valorizzazione rispetto a ricadute nel comparto chimico

(produzione di polioidrossialcanoati, bio-anidride maleica, etc.) si veda Massi *et al.* (2018). In questo contesto, invece, verranno descritte le strategie di approccio, le attività e i risultati ottenuti relativamente all'ottimizzazione dei processi estrattivi applicati ai sottoprodotti della lavorazione delle uve per ottenere estratti, frazioni e biomolecole biologicamente attive per una valorizzazione industriale nutraceutica, cosmetica e per la difesa delle piante coltivate veicolata a parte del partenariato aziendale specificatamente legato a questi settori di mercato. Per quanto attiene nello specifico alle valutazioni di attività biologica, in questo articolo saranno riportati i dati preliminari che sono stati di indirizzo per i riscontri ottenuti da altri partner di progetto e riportati in Caliceti *et al.* (2018, in stampa).

MATERIALI E METODI

Il materiale vegetale: le materie prime secondarie

Gli scarti della lavorazione delle uve erano costituiti da vinacce (da uve bianche, VCB; e rosse, VCR) e da vinaccioli isolati, forniti dal partner di progetto Caviro Distillerie (Faenza, Ravenna) che provenivano dalla vendemmia del 2016 e 2017.

Le vinacce da uve rosse e bianche dealcolate contenevano rispettivamente il 51% e il 36% di umidità. All'uscita dei processi di lavorazione aziendale, i campioni di vinacce sono stati posti in stufa a 70 °C per 24 ore ed essiccati fino a peso costante. Una volta essiccati, i campioni di vinacce sono stati macinati in mulino con rotore a velocità variabile e griglia di macinazione con pori da 2 mm (Fritsch, Germania).

I campioni così polverati sono stati conservati a -20 °C fino al momento delle analisi. I campioni di vinaccioli invece (VLB, vinaccioli da uve bianche; VLR,

vinaccioli da uve rosse), caratterizzandosi per un contenuto d'umidità inferiore al 5%, sono stati posti immediatamente a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sin dal momento della consegna e mantenuti in quella condizione fino al momento delle estrazioni e analisi. Parte dei campioni di vinacce, sia bianche (VCB) sia rosse (VCR), non sono state invece sottoposte a essiccamento ma invece immediatamente sottoposte a distillazione in corrente di vapore per valutare la qualità e la quantità della componente volatile.

I reagenti chimici impiegati

Tutti i solventi e i reagenti impiegati per le analisi chimiche erano di qualità cromatografica, mentre tutti i reagenti impiegati per le valutazioni biologiche erano coerenti per qualità e purezza con quanto riportato in letteratura. Lo standard malvidina-3-O-glucoside è stato acquistato da Extrasynthese (Genay, Francia). Trolox, DPPH (1,1-difenil-2-picrylhydrazil), metanolo deuterato (CD_3OD), cloroformio deuterato (CDCl_3), metanolo, etilacetato, etanolo, acido formico, acido acetico, NP/PEG e acido gallico sono stati acquistati da Sigma-Aldrich Italia (Milano, Italia). Toluene è stato acquistato da Carlo Erba Reagents (Milano, Italia).

Le strategie estrattive

Sono state effettuate estrazioni su campioni essiccati e polverizzati di vinacce bianche (VCB) e rosse (VCR), utilizzando le seguenti tecniche di estrazione: estrazione di fluidi supercritici (SFE), estrazione assistita da ultrasuoni (UAE) e estrazione di fluido pressurizzato tramite estrattore Naviglio® (PFE-NAV). Campioni non essiccati di vinacce bianche (VCB) e rosse (VCR) sono stati sottoposti a distillazione in corrente di vapore d'acqua (DIS). Ogni estrazione è stata effettuata in triplicato. Gli estratti ottenuti con UAE e PFE-NAV sono stati

liofilizzati e conservati a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fino al momento delle analisi. Gli estratti SFE sono stati conservati a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ tal quali in quanto privi della frazione solvente, mentre gli estratti ottenuti per distillazione in corrente di vapore d'acqua sono stati immediatamente analizzati per gas cromatografia.

Estrazione assistita da ultrasuoni (UAE)

L'estrazione assistita da ultrasuoni è stata eseguita utilizzando un bagno a ultrasuoni (Ultrasonik 104X, Ney Dental International, MEDWOW, Cipro) impostato a una frequenza operativa di 48 kHz. Le condizioni estrattive non sono riportate per ragioni di riservatezza vincolate da un accordo di partenariato.

Estrazione con fluidi pressurizzati (PFE: Naviglio®)

L'estrattore Naviglio® (mod. 500 cc; Atlas Filtri, Italia) è stato utilizzato per estrarre materiale solido con un metodo di estrazione con solvente pressurizzato (Naviglio, 2003).

Le condizioni estrattive non sono riportate per ragioni di riservatezza vincolate da un accordo di partenariato.

Estrazione di fluidi supercritici (SFE)

I campioni sono stati sottoposti a estrazione con fluidi supercritici (CO_2 ; SFE) utilizzando un estrattore Speed SFE modello Applied Separations (Allentown, PA, USA).

Le condizioni estrattive non sono riportate per ragioni di riservatezza vincolate da un accordo di partenariato.

Estrazione per distillazione in corrente di vapore d'acqua

Campioni non essiccati di vinacce bianche (VCB) e rosse (VCR), e di vinaccioli da uve bianche (VLB) e rosse (VLR) sono stati sottoposti a distillazione in corrente di vapore.

Le distillazioni sono state effettuate seguendo le metodiche riportate in Scalvenzi *et al.* (2017) opportunamente modificate.

La caratterizzazione chimica

La caratterizzazione chimica degli estratti è stata focalizzata sulla rilevazione di classi di composti generalmente noti per proprietà funzionalmente utili nei contesti di ricaduta della ricerca, in particolare: polifenoli, fenoli semplici, flavonoidi e derivati, acidi organici, eventualmente attesi con rilevante abbondanza negli estratti idroalcolici (UAE, PFE-NAV); acidi grassi, steroli e sostanze lipofile come stereoisomeri della vitamina E, eventualmente attesi con rilevante abbondanza negli estratti con CO_2 supercritica (SFE); composti terpenici e derivati (mono-, sesqui-, di-terpeni) eventualmente attesi con rilevante abbondanza negli estratti ottenuti con la distillazione in corrente di vapore d'acqua (DIS).

Analisi (HP)TLC: cromatografia su strato sottile ad alta risoluzione

Le analisi sono state eseguite su una lastra di gel di silice HPTLC 60F254 (10 cm 20 cm; Camag, Swizerland). 8 μl di una soluzione etanolica al 50% degli estratti (20 mg/mL) sono stati depositati sulla lastra in bande di 6 mm di ampiezza utilizzando un microdepositore Linomat V (Camag, Swizerland) in flusso di azoto. Le bande depositate sono state eluite in due step e successivamente derivatizzate con soluzione NP-PEG (Wagner e Bladt, 2009).

Contenuto in polifenoli e proantocianidine totali

La determinazione del contenuto polifenolico totale negli estratti è stata eseguita utilizzando uno spettrofotometro Helios-Gamma, ThermoSpectronic seguendo le metodiche precedentemente descritte in Tacchini *et al.* (2015). I risultati sono stati espressi come mg di acido gallico/g di estratto secco per la quantificazione dei polifenoli totali e mg di cianidin cloruro/g di estratto secco per la quantificazione delle proantocianidine totali.



Immagine tratta dal sito <http://nordestboulevard.it/2013/10/grappa-e-design/>

Analisi HPLC: Cromatografia liquida ad alta prestazione

La caratterizzazione dei campioni finalizzata alla rilevazione dei principali flavonoidi è stata eseguita sui campioni di estrazione idroalcolica utilizzando un sistema HPLC modulare JASCO (Tokyo, Giappone, modello PU 2089) accoppiato a un detector a fotodiodi (MD 2010 Plus). Per l'analisi si è fatto riferimento a quanto riportato in Kammerer *et al.* (2004).

Analisi GC-MS: gas cromatografia accoppiata a spettrometria di massa

Le analisi gas cromatografiche sono state sviluppate sui campioni ottenuti dalla distillazione di matrici (VCA, VCB, VLB, VLR) fresche e non essiccate. Le analisi sono state sviluppate seguendo le indicazioni riportate in Tarduño *et al.* (2018).

L'attività biologica

Proprietà antiossidanti

Le proprietà antiossidanti sono state valutate per poter verificare in via preliminare gli estratti potenzialmente utili a una proiezione salutistica nutraceutica e/o cosmetica.

L'attività antiossidante degli estratti è stata valutata sia mediante analisi bioautografica (DPPH-(HP)TLC-bioautographic assay) sia mediante saggio spettrofotometrico (Spettrofotometro UV-Vis Helios) impiegando per entrambi i test il radicale DPPH (1,1-difenil-2-picrylhydrazil). I saggi sono stati sviluppati come riportato in Nostro *et al.* (2016). Tutti gli esperimenti sono stati effettuati in triplicato e i risultati ottenuti sono stati riportati come media \pm deviazione standard.

L'attività antimicrobica

L'attività antimicrobica è stata valutata sia verso batteri sia verso funghi fitopatogeni per verificare in via preliminare quegli estratti potenzialmente utilizzabili per proprietà fitoiatriche.

Per valutare l'attività antibatte-



Pulitura dello strizzo idraulico

Le vinacce dopo la strizzatura



rica degli estratti vegetali è stato utilizzato un batterio, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall ATCC 19310. Gli esperimenti di attività antibatterica (MIC, Minima Concentrazione Inibente; MCB, Minima Concentrazione Battericida) sono stati allestiti seguendo le indicazioni riportate dal National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, standard M7-A6).

Per la valutazione dell'attività antifungina sono stati invece utilizzati due funghi fitopatogeni, *Sclerotinia minor* e *Sclerotinia sclerotiorum*; l'allestimento delle colture dei funghi filamentosi e gli esperimenti di attività antifungina sono stati condotti seguendo le indicazioni riportate in Guerrini et al. (2009). La Minima Concentrazione Inibente la crescita fungina (MIC) e la Minima Concentrazione Fungicida (MCF) sono state determinate seguendo le indicazioni riportate in Cavaliero et al. (2005). Infine, è stata calcolata la concentrazione efficace in grado di dare il 50% di effetto massimale (EC_{50}).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Le strategie estrattive bioguidate da fingerprinting HP-TLC

Le matrici di scarto della lavorazione delle uve sono state fornite dall'azienda Caviro Distillerie (Faenza, RA; <http://www.caviro.com/it/>), partner aziendale di progetto, ed erano caratterizzate da vinacce rosse (VCR), vinacce bianche (VCB), vinaccioli da uve rosse (VLR) e bianche (VLB) (Figura 1).



Figura 1. Gli scarti della lavorazione delle uve sottoposti ad estrazione. A, vinacce bianche essiccate (VCR); B, vinacce rosse essiccate (VCR); C, vinaccioli da uve bianche e rosse (VLB, VLR).

Per le estrazioni, si è scelto di selezionare quelle metodiche che meglio potessero coagulare, come finalità di principio, criteri di efficienza (alta resa quali-quantitativa di biomolecole attive), sostenibilità (basso o nullo impiego di solventi organici) e opportunità di trasferimento tecnologico (*scale up* laboratorio vs. industria). In relazione a questi aspetti, peraltro caratterizzanti la finalità di valorizzazione sostenibile del progetto Valsovit, si è quindi optato per individuare nell'ampio e moderno contesto della *green chemistry* l'estrazione con ultrasuoni (UAE), l'estrazione con fluidi sotto pressione con strumentazione Naviglio®, l'estrazione con CO₂ supercritica (SFE) e la distillazione in corrente di vapore d'acqua (DIS) (Baiano, 2014). Ciascuna matrice di scarto è stata dunque sottoposta ad ogni metodica estrattiva individuata per verificare quale risultasse la più performante rispetto alle finalità di principio sopra descritte (Tabella 1).

Prima di procedere alle estrazioni UAE, PFE-NAV, SFE, le matrici da vinacce rosse (VCR) e da vinacce bianche (VCB) sono state sottoposte a essiccazione in stufa a 70 °C per 24 ore fino a ridurre il contenuto di acqua a valori inferiori al 5%, seguendo un protocollo di trattamento degli scarti normalmente adottato in azienda. I vinaccioli da uve rosse (VLR) e da uve bianche (VLB) presentavano già un tenore di umidità coerente con le esigenze di conservazione ed estrazione (<5%). Tutti i campioni sono stati successivamente polverizzati in mulino refrigerato per ottimizzare e uniformare le

interazioni matrice-solvente in ciascuna delle metodiche estrattive adottate. Per le distillazioni in corrente di vapore d'acqua, invece, tutti i campioni sono stati utilizzati allo stato fresco minimizzando in questo modo la perdita dei composti più volatili. Le molecole target per l'ottimizzazione delle estrazioni erano rappresentate da polifenoli, fenoli semplici, flavonoidi e derivati, acidi organici, eventualmente attesi con rilevante abbondanza negli estratti idroalcolici (UAE, PFE-NAV); acidi grassi, steroli e sostanze lipofile come stereoisomeri della vitamina E, eventualmente attesi con rilevante abbondanza negli estratti con CO₂ supercritica (SFE); composti terpenici e derivati (mono-, sesqui-, di-terpeni) eventualmente attesi con rilevante abbondanza negli estratti ottenuti con la distillazione in corrente di vapore d'acqua (DIS). Per le metodiche UAE e PFE-NAV si è scelto di operare con solvente idroalcolico (etanolo-acqua) individuando sperimentalmente nel rapporto 50:50 la combinazione più efficace rispetto alle categorie chimiche estratte, valutate per numero e ampiezza delle bande su lastre per cromatografia su strato sottile ad alte prestazioni (HP-TLC), confermando così anche le indicazioni di letteratura (Da Porto et al., 2013). Analogamente, si è operato con SFE individuando le condizioni di *set up* strumentale e tempistiche di estrazione statica e dinamica più adeguate. Per DIS, si è fatto invece riferimento a quanto riportato in Scalvenzi et al. (2017) opportunamente modificato (Figura 2).

Per ciascuna categoria di campioni, l'efficienza estrattiva in termini di resa quantitativa di estratto totale è risultata ottimale con UAE, più ridotta (fino anche al 60%) con PFE-NAV, e ulteriormente più bassa con SFE. Estremamente bassa è risultata la resa in olio essenziale (0.02-0.008%) ottenuto con la distillazione in

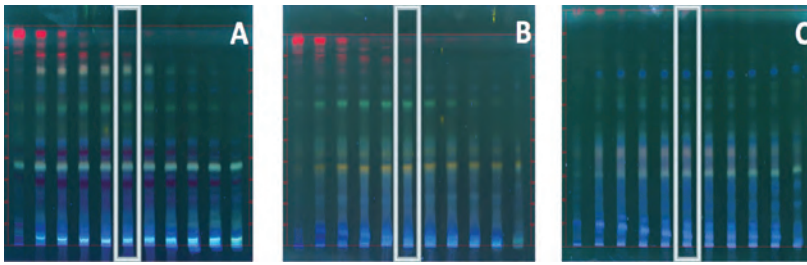


Figura 2. Cromatografia su strato sottile ad alta risoluzione (HP-TLC) degli estratti idroalcolici (a titolo d'esempio) per l'individuazione delle condizioni ottimali per ottenere un profilo fitochimico di compromesso qualitativamente e quantitativamente ottimale rispetto alle categorie chimiche di interesse. Bande blu-azzurre: polifenoli; bande giallo-verdi: flavonoidi; bande rosse: clorofille. A, campioni VCR; B, campioni VCB; C, campioni VLB. La regione circonscritta in ciascuna lastra corrisponde all'eluizione di un estratto idroalcolico al 50%.

corrente di vapore d'acqua (DIS, Tabella 1), rendendo sostanzialmente impraticabile l'ipotesi di scale-up industriale di processo per uno sfruttamento razionale dei distillati. Il dato quantitativo riflette quanto riportato in letteratura per quanto attiene alle rese totali di estrazioni idroalcoliche e SFE, mentre sostanzialmente inedito è il dato relativo agli estratti DIS.

| Campioni | Metodo estrattivo | Resa % | Dev. St. |
|----------|-------------------|--------|----------|
| VCR | UAE | 25,13 | 3,71 |
| | PFE-NAV | 10,42 | 2,38 |
| | SFE | 4,99 | 0,06 |
| | DIS | 0,05 | 0,002 |
| VCB | UAE | 27,59 | 1,68 |
| | NAV | 13,41 | 6,25 |
| | SFE | 1,67 | 0,03 |
| | DIS | 0,05 | 0,002 |
| VLR | UAE | 12,40 | 1,04 |
| | NAV | 13,38 | 0,56 |
| | SFE | 8,36 | 0,19 |
| | DIS | 0,008 | 0,002 |
| VLB | UAE | 11,61 | 4,39 |
| | NAV | 9,52 | 0,76 |
| | SFE | 6,63 | 0,50 |
| | DIS | 0,008 | 0,002 |

Tabella 1. Rese di estrazione (riportate come valori percentuali medi), relativamente ad estrazione assistita con ultrasuoni (UAE), estrazione con fluidi sotto pressione con metodo Naviglio® (PFE-NAV), estrazione con fluidi supercritici (SFE) e distillazione in corrente di vapore (DIS; su matrici non essiccate). VCR, vinacce rosse essiccate; VCB, vinacce bianche essiccate; VLB, vinaccioli da uve bianche; VLR, vinaccioli da uve rosse. Dev. St., deviazione standard.

La caratterizzazione chimica

I campioni di vinacce di uve rosse (VCR) e bianche (VCB) e di vinaccioli da uve rosse (VLR) e da uve bianche (VLB) ottenuti con le estrazioni con solvente idroalcolico mediante ultrasuoni (UAE) e con fluidi pressurizzati con strumentazione Naviglio® ottimizzate per la migliore resa quantitativa in polifenoli, sono stati valutati con metodo spettrofotometrico per la quantificazione dei polifenoli totali (Figura 3).

te al contenuto totale in polifenoli non si è dimostrata altrettanto efficace. Infatti, per tutte le matrici, tranne che per i campioni VCR dove peraltro lo scarto è risultato ridotto al 15%, la metodica PFE-NAV è risultata più performante nell'estrazione dei polifenoli totali. In particolare, i campioni che si sono rilevati più ricchi in polifenoli totali sono risultati sempre gli estratti da vinaccioli. In particolare, i vinaccioli da uve bianche (VLB) hanno dato in assoluto i risultati migliori con entrambi i metodi estrattivi ed evidenziando uno scarto di circa il 48% rispetto ai campioni VLR a parità di metodo estrattivo più performante (PFE-NAV). Il contenuto negli estratti VLB con PFE-NAV è risultato sensibilmente superiore a quello con UAE (12% circa). Maggiore lo scarto quantitativo (25% circa) tra gli estratti PFE-NAV e UAE per i campioni VLR. Decisamente più ridotti i risultati relativi alle vinacce, benché gli estratti da vinacce rosse (VCR) siano risultati con il maggior contenuto

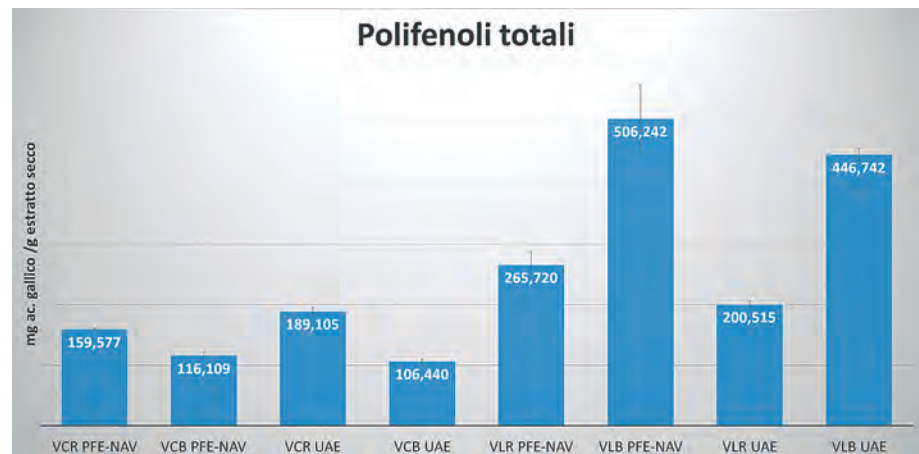


Figura 3. Nel grafico sono riportati i valori dei polifenoli totali (mg acido gallico/g estratto secco) degli estratti (VCR, vinacce rosse; VCB, vinacce bianche; VLR, vinaccioli da uve rosse; VLB, vinaccioli da uve bianche) ottenuti con le metodiche UAE (estrazione con ultrasuoni) e PFE-NAV (estrazione con fluidi sotto pressione con strumentazione Naviglio®) ottimizzate per la migliore rilevazione qualitativa e quantitativa. I dati sono relativi a quanto ottenuto con solvente idroalcolico al 50%.

Benché l'estrazione UAE sia risultata più performante rispetto alla variabile della resa totale di estratto (Tabella 1), relativamen-

in polifenoli totali rispetto ai campioni VCB, con uno scarto medio del 39% rispetto al dato riferito al metodo estrattivo più performan-

te. Benché in letteratura siano numerosi gli esempi relativi al contenuto polifenolico di scarti della lavorazione delle uve compatibili con quelli da noi usati per quanto attiene alla loro tipizzazione, non è invece possibile effettuare un confronto costruttivo in quanto non ne viene mai indicata la provenienza rispetto ai diversi *step* di lavorazione in filiera. Infatti, dalla nostra esperienza, condivisa con la partnership di progetto, il contenuto in composti polifenolici può ragionevolmente e significativamente cambiare in relazione al momento di processo in cui le matrici vegetali vengono considerate scarti e quindi indirizzabili ad altri processi di lavorazione. Pertanto, per ragionevoli motivazioni di accordo di partenariato e di potenziale ricaduta applicativa, i risultati prodotti e qui riportati sono da ritenersi puramente indicativi e non sostanziali per quanto attiene al dato fitochimico, ma utili sul piano del riscontro della strategia operativa ed estrattiva più adeguata all'individuazione del momento più adatto al prelievo dei sottoprodotti in filiera come adeguate fonti di polifenoli.

Analoghe premesse e considerazioni sono alla base dei risultati spettrofotometrici ottenuti per le proantocianidine totali (Figura 4). In particolare, va sottolineato che a differenza del dato relativo ai polifenoli totali, per tutti i campioni la metodica estrattiva più performante rispetto al contenuto totale di proantocianidine è risultata quella con ultrasuoni UAE (Figura 4). In particolare, la differenza a parità di qualità di campione tra i metodi estrattivi (PFE-NAV, UAE) rispetto alla quantità totale di proantocianidine era estremamente diversificata ma sempre piuttosto rilevante, ovvero: del 42% per VCR, del 64% per VCB, dell'89% per VLR e del 93% per VLB. I campioni più ricchi in assoluto di proantocia-

nidine sono risultati comunque i vinaccioli, sia da uve rosse (VLR) sia da uve bianche (VLB). Come per i polifenoli totali, però, anche per il contenuto totale in proantocianidine i campioni VLB sono risultati i più ricchi con uno scarto rispetto agli stessi campioni da uve rosse di circa il 29% a parità di processo estrattivo più performante (UAE).

anche per il contenuto di flavonoidi (Figura 5).

In generale, derivati glicosilati della quercetina e del kaempferolo con relativi agliconi, e rutina sono risultati sempre presenti in tutti i campioni, sebbene con sensibili variazioni quantitative di profilo cromatografico.

In figura viene riportato, a titolo di esempio, il profilo cromatogra-

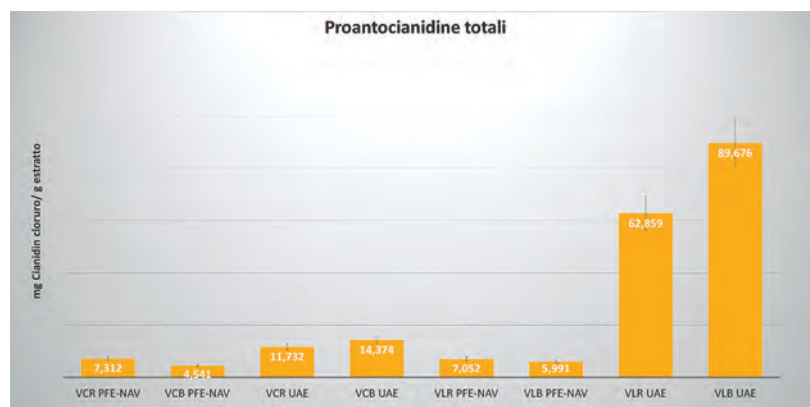


Figura 4. Nel grafico sono riportati i valori delle proantocianidine totali (mg di cianidin cloruro/g di estratto secco) relativi agli estratti (VCR, vinacce rosse; VCB, vinacce bianche; VLR, vinaccioli da uve rosse; VLB, vinaccioli da uve bianche) ottenuti con le metodiche UAE (estrazione con ultrasuoni) e PFE-NAV (estrazione con fluidi sotto pressione con strumentazione Naviglio ©) ottimizzate per la migliore rilevazione qualitativa e quantitativa. I dati sono relativi a quanto ottenuto con solvente idroalcolico al 50%.

Gli estratti idroalcolici UAE e PFE-NAV dei campioni VCR, VCB, VLR e VLB sono stati analizzati qualitativamente via HPLC

fico relativo ai campioni di vinacce bianche (VCB) ottenuti con metodo estrattivo con ultrasuoni (UAE).

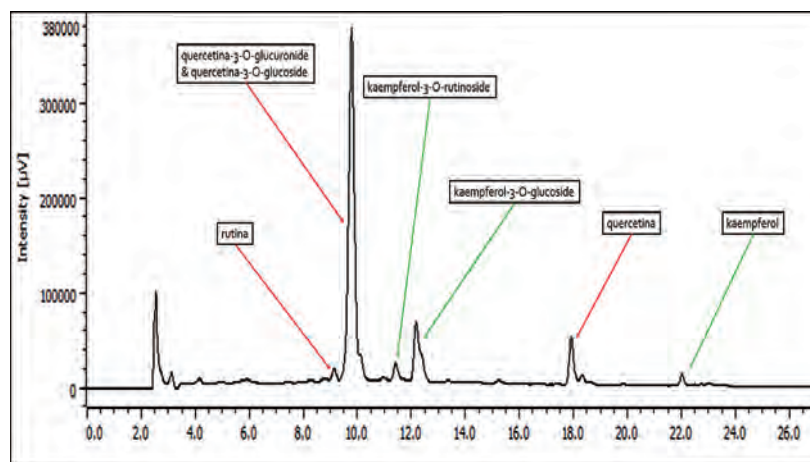


Figura 5. Profilo cromatografico di un estratto da vinacce bianche (a titolo di esempio) ottenuto con analisi HPLC in fase inversa e con detector a fotodiodi (RP-HPLC-DAD) da cui è possibile evincere i composti flavonoidici rilevati glicosilati e non glicosilati più abbondanti.

Sono state poi effettuate analisi gas cromatografiche degli estratti con CO₂ supercritica per valutare la qualità degli estratti lipofili con specifico riferimento al contenuto di acidi grassi e alla composizione della frazione insaponificabile (Figura 6). In particolare, particolarmente interessante sono risultati i campioni di vinaccioli, già peraltro noti per essere fonte di un olio dalle pregiate qualità nutrizionali e per cui emerge la prevalenza dell'acido linoleico confermando peraltro i dati di letteratura relativi a estratti ottenuti con la medesima tecnica (Passos *et al.*, 2010). Per quanto riguarda gli estratti

punto di vista di quantità relative sono emerse differenze interessanti. In particolare nei campioni di vinacce rosse (VCR) i composti più abbondanti espressi per area % sono risultati l'acido palmitico (53,7%), acido miristico (7,6%), acido dodecanoico (6,1%), acido oleico (5,2%). Nei campioni di vinacce bianche (VCB) erano presenti l'acido palmitico (41,3%), acido palmitoleico (6,7%), acido oleico (5,49%), acido miristico (4,8%). I campioni di distillato di vinaccioli invece sia da uve bianche e sia da uve rosse sono risultati con un profilo quali-quantitativo sostanzialmente analogo caratterizzato da acido palmitico

già di composti né per la quantità. Il dato atteso era piuttosto quello di un fitocomplesso prevalentemente terpenico, mentre invece i composti rilevati erano presenti sostanzialmente con una abbondanza inferiore all'1%. Questo aspetto è probabilmente spiegabile con il fatto che le vinacce fresche, prima di essere fornite per le analisi, avevano subito condizioni per cui la maggior parte dei componenti volatili era scomparsa. Ha sorpreso invece la composizione in acidi grassi che per i nostri campioni è risultata sia qualitativa sia quantitativamente più ricca rispetto ai campioni ottenuti con SFE. Dal momento che

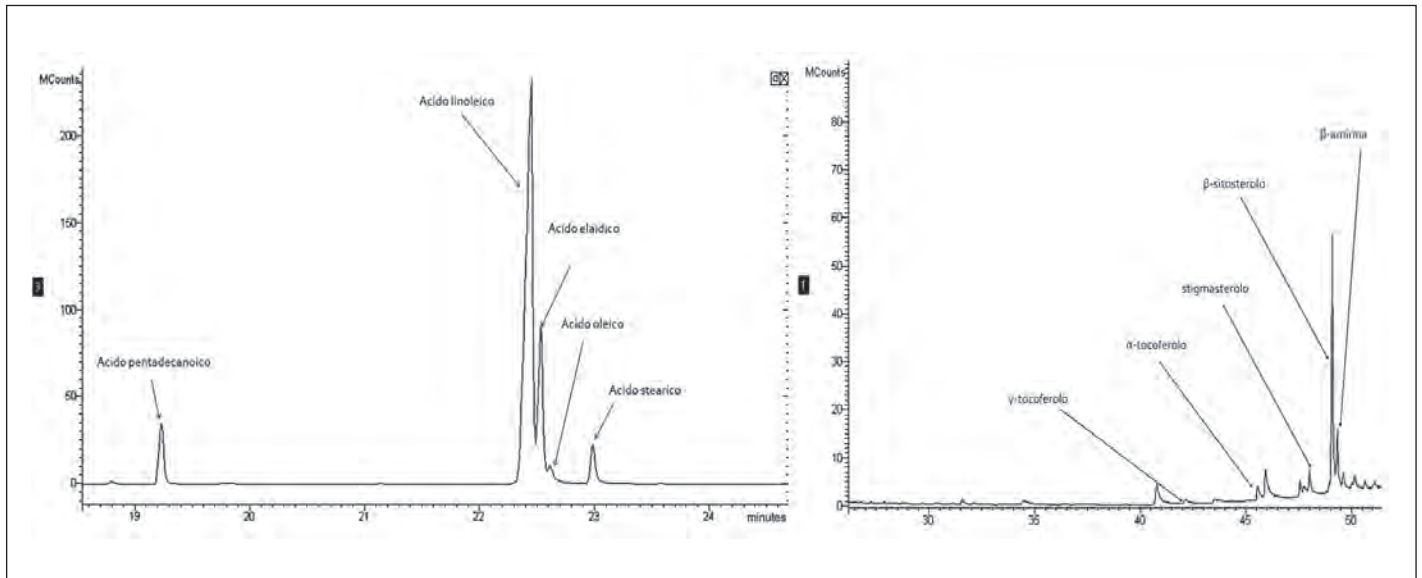


Figura 6. Estratti SFE. Profili gas cromatografici di un estratto SFE di vinaccioli da uve bianche (VLB). A, profilo gas cromatografico dove vengono evidenziati i principali acidi grassi. B, profilo gas cromatografico della frazione insaponificabile.

ottenuti per distillazione in corrente di vapore (DIS), l'analisi gas cromatografica ha rivelato una composizione di tutti i campioni prevalentemente caratterizzata da acidi grassi (Tabella 2) con tracce di composti sesquiterpenici (dati non presentati). I campioni hanno presentato tutti un profilo qualitativo sostanzialmente simile, mentre da un

(29,6%), acido linoleico (19,4%), etilestere dell'acido palmitico (11,1%), acido alfa linolenico (10,5%), acido oleico (6,9%). Non ci sono dati di letteratura che ci permettano di confrontare questi risultati relativamente a distillati di scarti, tuttavia è possibile fare alcune considerazioni rispetto al dato oggettivo. Innanzitutto, il dato non era atteso né per tipolo-

i campioni estratti con SFE erano stati essiccati mentre gli stessi campioni distillati erano stati estratti freschi (con la speranza fossero ricchi nella componente volatile terpenica) è possibile ipotizzare che il pre-trattamento in stufa a 70 °C abbia degradato la gran parte della componente di acidi grassi, rimasta invece nelle matrici fresche.

| Composto | Area% |
|-------------------------------------|--------------|
| Octanoic acid, ethyl ester | 0,14 |
| Octanoic acid | 0,89 |
| Decanoic acid | 1,24 |
| Nonanoic acid, 9-oxo-, ethyl ester | 1,48 |
| Dodecanoic acid, ethyl ester | 0,28 |
| Dodecanoic acid | 2,04 |
| Octanedioic acid, bis | 0,21 |
| myristic acid, ethyl ester | 0,41 |
| Azelaic acid, bis | 2,67 |
| 2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl- | 0,29 |
| myristic acid | 4,83 |
| cis-10-Pentadecenoic acid | 0,73 |
| n-Pentadecanoic acid | 1,18 |
| palmitoleic ethyl ester | 2,64 |
| palmitic acid, ethyl ester | 5,21 |
| Palmitoleic acid | 6,73 |
| palmitic acid | 41,33 |
| Linoleic acid ethyl ester | 0,37 |
| oleic acid, ethyl ester | 1,81 |
| elaïdic acid, ethyl ester | 0,40 |
| stearic acid ethyl ester | 0,76 |
| linoleic acid | 0,95 |
| oleic acid | 5,49 |
| elaïdic acid | 0,91 |
| stearic acid | 1,57 |
| Tritetracontane | 0,18 |
| 1-Decanol, 2-hexyl- | 0,50 |
| Eicosen-1-ol, cis-9- | 0,26 |
| Tritetracontane | 0,35 |
| (Z)-14-Tricosenyl formate | 0,63 |

Tabella 2. Estratti ottenuti per distillazione in corrente di vapore d'acqua (DIS). A titolo di esempio viene riportata la composizione dell'estratto ottenuto dalla distillazione di vinacce bianche (VCB) dal momento che, benché estremamente bassa, hanno rivelato una resa complessivamente più elevata (0,05%).

I risultati preliminari sull'attività biologica e le possibili proiezioni applicative

Gli estratti di vinacce rosse e bianche (VCR, VCB) e da vinaccioli da uve rosse e bianche (VLR, VLB) sono stati valutati preliminarmente per le proprietà antiossidanti con metodo spettrofotometrico del DPPH, e antimicrobiche *in vitro*. La scelta rispetto a questa tipologia di saggi è stata guidata dal fatto che da un punto di vista preliminare l'attività antiossidante è senz'altro una proprietà di sicuro interesse per le possibili proiezioni nutraceutiche e cosmetiche del progetto Valsovit. Per le proprietà antiossidanti con test DPPH sono stati presi in consi-

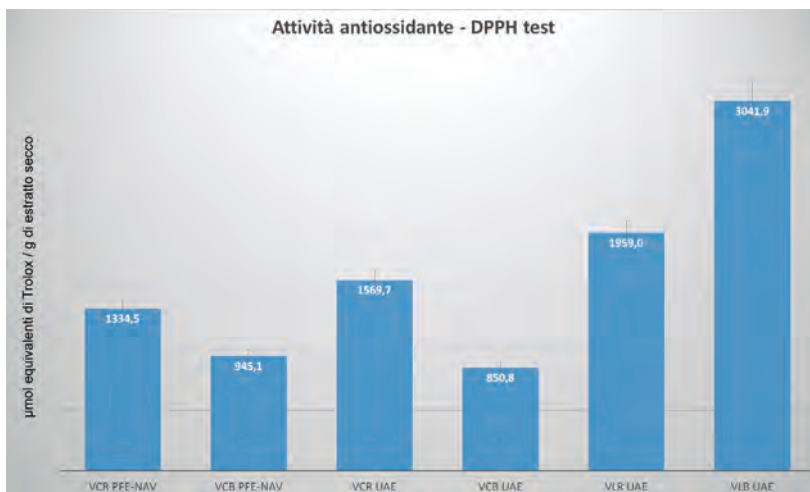


Figura 7. Attività antiossidante con metodo spettrofotometrico del DPPH. Nel grafico sono riportati gli estratti che hanno evidenziato le attività più rilevanti. I valori sono riportati come mmol equivalenti di Trolox / g di estratto secco.

derazione gli estratti idroalcolici ottenuti con metodo PFE-NAV e UAE in quanto caratterizzati dalla componente polifenolica più abbondante e normalmente presa a riferimento per esprimere attività antiossidante (Figura 7). Non si è osservata una corrispondenza diretta tra il contenuto di polifenoli, proantocianidine e flavonoidi con l'attività antiossidante espressa nel saggio spettrofotometrico, se non che i campioni vinaccioli da uve bianche (VCB) hanno espresso i risultati di maggior rilievo. In questo caso, l'attività rilevante degli estratti VCB UAE era certamente attesa ma non risulta direttamente correlabile per esempio con il dato dei polifenoli delle proantociani-

dine totali rapportato al metodo estrattivo, in quanto i campioni maggiormente ricchi di polifenoli erano quelli ottenuti con il metodo PFE-NAV. Questo aspetto è evincibile anche per gli altri estratti, per esempio VCR UAE e VLR UAE. In ogni caso e come premesso, il dato è del tutto preliminare e necessita di ulteriori approfondimenti non solo dal punto di vista della bioattività, ma anche dal punto di vista fitochimico per poter meglio correlare i dati di caratterizzazione chimica e di attività biologica, ponendo in luce eventuali aspetti sinergici che al momento sembrano essere alla base delle apparenti discrepanze. Per quanto riguarda invece l'attivi-

| | Antibatterica (MIC µg/ml) | | Antifungina (EC ₅₀ µg/ml) | |
|--------------------|---|--------------------------|--------------------------------------|--|
| | <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> | <i>Sclerotinia minor</i> | <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> | |
| VCR UAE | > 1000 | n. d. | n. d. | |
| VCB UAE | > 1000 | n. d. | n. d. | |
| VCR PFE-NAV | > 1000 | n. d. | n. d. | |
| VCB PFE-NAV | > 1000 | n. d. | n. d. | |
| VLR UAE | > 1000 | > 15 | > 15 | |
| VLB UAE | > 1000 | > 15 | > 15 | |
| VLR PFE-NAV | > 1000 | > 15 | > 15 | |
| VLB PFE-NAV | > 1000 | > 15 | > 15 | |
| Controllo positivo | 125 | < 0.5 | < 0.5 | |

Tabella 3. Attività antimicrobica di estratti idroalcolici di vinacce da uve rosse e bianche (VCR, VCB) e da vinaccioli da uve rosse e bianche (VLR, VLB). I risultati sono espressi come Minima concentrazione inibente la crescita (MIC µg/ml) per l'attività antibatterica e come concentrazione efficace in grado di dare il 50% di effetto massimale (EC₅₀) per quanto riguarda l'attività antifungina.

n.d.: non definite. In questi casi il ceppo ha evidenziato invece un forte incremento di crescita anziché un'inibizione, probabilmente dovuta alla componente zuccherina degli estratti. Controlli positivi: Delan 70 WG, per *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*; Helicouivre S, per *Sclerotinia* sp.)

tà antimicrobica, sono stati allestiti saggi preliminari *in vitro* con il preciso scopo di individuare estratti eventualmente promettenti per ulteriori approfondimenti rispetto all'attività fitoiatrica, ovvero per la difesa sostenibile delle coltivazioni come ulteriore ricaduta applicativa prevista dal progetto (Tabella 3). Sono stati saggiati, anche in questo caso in via del tutto preliminare, gli estratti idroalcolici da matrici VCR, VCB, VLR, VLB. Come evincibile, non sono state registrate attività degne di nota. Anzi, con particolare riferimento all'attività antifungina, si è osservato un incremento di crescita dovuto con ogni probabilità alla componente zuccherina presente negli estratti. In relazione a queste evidenze, le prospettive di progetto riguarderanno la valutazione degli stessi estratti privati della frazione zuccherina, nonché delle frazioni o eventuali molecole isolate putative di un'attività degna di una proiezione applicativa su scala industriale.

Conclusioni

La valorizzazione delle materie prime secondarie delle filiere agro-alimentari vede innanzitutto nella scelta e ottimizzazione del proces-

so estrattivo un fattore chiave e determinante nel miglioramento sostenibile dei processi e nella loro conversione rispetto a un profilo industriale *bio-based* e di economia circolare. La scelta del metodo estrattivo dipende innanzitutto dal tipo di matrice vegetale (coriacea o meno), dalla sua condizione (umida o secca), dalla sua pezzatura (frantumata, triturata, polverata), e dal tipo di biomolecole target che si intendono ottenere per nuovi prodotti finiti. Nell'ambito del progetto Valsovit, trattandosi di un contesto di valorizzazione legato anche alla sostenibilità ambientale, è stato necessario selezionare, tra i processi individuati in relazione alle già elencate variabili, quelle strategie estrattive ispirate alla *green chemistry* che perseguono l'ottenimento di estratti minimizzando l'impiego di solventi organici, il cui smaltimento rappresenterebbe a livello industriale un costo sia economico sia ambientale ingente, per di più vincolato da strette regolamentazioni normative (Baiano, 2014).

Gli estratti ottenuti, caratterizzati da un punto di vista chimico in via preliminare, hanno dimostrato che gli scarti della filiera vitivinicola

possono risultare un'ottima fonte di biomolecole utili a contesti applicativi, ma hanno altresì messo in evidenza l'importanza della conoscenza del grado di sfruttamento delle risorse primarie, ovvero del grado di lavorazione che hanno subito le uve prima di essere considerate come materie prime secondarie. Questo aspetto è sottovalutato dalla letteratura scientifica specializzata e riduce l'impatto applicativo delle evidenze riportate. In questo contesto, il merito del progetto Valsovit e dell'attività di ricerca applicata che lo caratterizza è senz'altro quello di porre in evidenza questo parametro per poter concretizzare realisticamente lo sfruttamento delle risorse in un'ottica di economia circolare.

In aggiunta a queste considerazioni, le valutazioni di bioattività preliminari correlate alle evidenze chimiche, impongono la necessità di approfondire la caratterizzazione chimica degli estratti, per poter meglio individuare eventuali molecole o frazioni chimiche degli estratti stessi responsabili delle bioattività, benché deboli, con proiezioni nutraceutiche, cosmetiche e/o fitoiatriche. Questo porterebbe, in un'ottica di processo bio-



La valorizzazione delle materie prime secondarie – non più scarti – è invece oggi per l'industria un'occasione per incrementare la propria competitività

guidato, a modificare le condizioni estrattive individuando quei parametri che determinano l'ottenimento di estratti arricchiti in principi attivi con le attività biologiche desiderate rendendo il processo di sfruttamento delle materie prime secondarie realisticamente e concretamente operativo anche per uno *scale up* industriale.

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI FERRARA
***Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie**
****Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche**

Valorizzazione sostenibile degli scarti della filiera vitivinicola per l'industria chimica e salustistica (VALSOVIT): il progetto Valsovit è finanziato dalla Regione Emilia Romagna (POR-FESR) ed ha come finalità lo sfruttamento di seconda generazione dei sottoprodotti della filiera vitivinicola attraverso processi sostenibili per ottenere biomolecole ad alto valore aggiunto.

Bibliografia

- Baiano, A. 2014. Recovery of Biomolecules from Food Wastes — A Review. *Molecules*, 19, 14821-14842.
- Caliceti, C., Calabria, D., Porru, E., Franco, P., Fiori, J., Zangheri, M., Guardigli, M., Mirasoli, M. 2018. Valorizzazione sostenibile degli scarti della filiera vitivinicola come fonte di nutraceutici per l'industria salustistica - focus sulla disfunzione endoteliale (Sustainable recovery of wine by-products as a source of nutraceuticals for the healthcare industry - focus on endothelial dysfunction). *Pharmanutrition & Functional Foods*, (in stampa).
- Cavaleiro, C; Pinto, E; Gonçalves, M J; and Salgueiro, L. Antifungal activity of Juniperus essential oils against dermatophyte, Aspergillus and Candida strains. *Journal of Applied Microbiology* (2006), Vol. 100 pp 1333-38
- Da Porto, C., Porretto, E., Decorti D. 2013. Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20 (2013) 1076–1080.
- Favretto, D., Flamini, R. 2000. Application of Electrospray Ionization Mass Spectrometry to the Study of Grape Anthocyanins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51, 55-64.
- Guerrini, A., Sacchetti, G., Rossi, D., Paganetto, G., Muzzoli, M., Andreotti, E., Tognolini, M., Maldonado, M.E., Bruni, R. 2009. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 27, 39–48.
- Kammerer, D., Claus, A., Carle, R., Schieber, A. 2004. Polyphenol Screening of Pomace from Red and White Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4360–4367.
- Lin, C.S.K., Pfaltzgraff, L.A., Herrero-Davila, L., Mubofu, E.B., Abderrahim, S., Clark, J.H., Koutinas, A.A., Kopsahelis, N., Stamatelatos, K., Dickson, F., Thankappan, S., Mohamed, Z., Brocklesby, R., Luque, R. 2013. Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels. Current situation and global perspective. *Energy & Environmental Science*, 6, 426–464.
- Maietti, S., Rossi, D., Guerrini, A., Useli, C., Romagnoli, C., Poli, F., Bruni R., Sacchetti, G. 2013. A multivariate analysis approach to the study of chemical and functional properties of chemodiverse plant derivatives: lavender essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 28(3), 144-154
- Massi, A., Sacchetti, G., Galletti, P., Bertin, L., Mazzoni, R., Viganò, F., Righi, S., Passarini, F., Soldano, M., Labartino, N. 2018. Dagli scarti delle uve una risorsa per l'industria chimica: il progetto Valsovit. *La Chimica e l'Industria - Newsletter*, 5(4), 16-24.
- Naviglio, D. 2003. Naviglio's Principle and Presentation of an Innovative Solid-Liquid Extraction Technology: Extractor Naviglio®. *Analytical Letters*, 36(8), 1647–1659.
- Nostro, A., Guerrini, A., Marino, A., Tacchini, M., Di Giulio, M., Grandini, A., ... Saraçoğlu, H. T. 2016. In vitro activity of plant extracts against biofilm-producing food-related bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 238, 33–39.
- Passos, C.P., Silva, R.M., Da Silva, F.A., Coimbra, M.A., Silva, C.M. 2010. Supercritical fluid extraction of grape seed (*Vitis vinifera* L.) oil. Effect of the operating conditions upon oil composition and antioxidant capacity. *Chemical Engineering Journal*, 160, 634–640.
- Rossi, D., Guerrini, A., Bruni, R., Brognara, E., Borgatti, M., Gambari, R., Sacchetti, G. 2012. Trans-resveratrol in nutraceuticals: Issues in retail quality and effectiveness. *Molecules*, 17(10), 12393–12405.
- Scalvenzi, L., Grandini, A., Spagnoletti, A., Tacchini, M., Neill, D., Ballesteros Lara, J.L., Sacchetti, G., Guerrini, A. 2017. *Myrcia fallax* (Rich.) DC. (Myrtaceae) essential oil from Amazonian Ecuador: a chemical characterization and bioactivity profile. *Molecules*, 22(7), art. no. 1163.
- Tacchini, M., Spagnoletti, A., Marieschi, M., Caligiani, A., Bruni, R., Efferth, T., ... Guerrini, A. 2015. Phytochemical profile and bioactivity of traditional ayurvedic decoctions and hydro-alcoholic macerations of *Boerhaavia diffusa* L. and *Curculigo orchoides* Gaertn. *Natural Product Research*, 29(22), 2071–2079.
- Tarduño, R., Spagnoletti, A., Grandini, A., Maresca, I., Sacchetti, G., Pellati, F., Benvenuti, S. 2018. Chemical profile and biological activities of *Cedrelopsis grevei* H. Baillon bark essential oil. *Plant Biosystems*, 152(1, 2), 120-129.
- Wagner, H., Blatt S., 2009. Plant drug analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas, second Edition, Springer Verlag, Berlin.

