

Università degli Studi di Napoli  
“Federico II”

**Dipartimento di Scienze Chimico-Agrarie**

*Dottorato di Ricerca in Chimica Agraria*

**RECUPERO DELLA FRAZIONE POLIMERICA  
DELLE ACQUE DI VEGETAZIONE:  
CARATTERIZZAZIONE CHIMICA, BIOLOGICA E  
APPLICAZIONI BIOTECNOLOGICHE**

Docente guida:  
Ch.mo Prof. Renato Capasso

Candidato:  
Antonio De Martino

Il Coordinatore:  
Ch.mo Prof. Antonio Violante

Anni accademici 1997-2000

## **INTRODUZIONE**

1. L'industria frantoiana	1
2. Composizione delle AV	2
3. Effetti nocivi e richiami normativi	5
4. Acque di vegetazione e prodotti utili	6

## **SCOPO DELLA TESI** 13

## **MATERIALI E METODI**

1. Generalità	14
2. Filtrazione dei campioni	14
3. Precipitazione metanolica delle acque di vegetazione	14
4. Dialisi	14
5. Liofilizzazione	15
6. Dosaggio dei carboidrati	15
7. Dosaggio delle proteine	16
8. Dosaggio dei polifenoli	16
9. Dosaggio degli acidi uronici	17
10. Determinazione della composizione in fenoli mediante ossidazione con CuO e cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC)	17
10.1. Ossidazione del campione	17
10.2. Analisi HPLC	17
11. Determinazione della composizione amminoacidica	19
12. Determinazione della composizione monosaccaridica	20
12.1. Neutralizzazione su amberlite	20
12.2. Analisi per HPAEC-PAD	20
13. Spettroscopia ad assorbimento atomico (AAS)	22
14. Titolazione	22
15. Analisi UV	22
16. Analisi DRIFTS	22
17. Reazione con diazometano	22

18. Cromatografia analitica su strato sottile (TLC)	23
19. Cromatografia a fase inversa a bassa pressione	23
20. Determinazione del peso molecolare relativo mediante cromatografia su setacci molecolari	23
21. Ultrafiltrazione	24
22. Saggi di attività fitotossica	25
23. Saggi di attività antiossidante	25

## **PARTE SPERIMENTALE**

1. RECUPERO DELLA FRAZIONE POLIMERICA ORGANICA DENOMINATA POLIMERINAK (PLMK) E SUA CARATTERIZZAZIONE CHIMICA	27
1.1.1. Precipitazione metanolica delle acque di vegetazione	27
1.1.2. Dialisi del precipitato	27
1.2. Caratterizzazione chimica della plmK	27
1.2.1. Dosaggio degli zuccheri con l'antrone	27
1.2.2. Dosaggio delle proteine con metodo Bradford	28
1.2.3. Dosaggio dei polifenoli con il reattivo di Folin-Ciocalteu	28
1.3. Determinazione della composizione monosaccaridica della plmK	28
1.3.1. Idrolisi e purificazione degli zuccheri neutri	28
1.3.2. Analisi per HPAEC-PAD degli zuccheri neutri	29
1.3.3. Idrolisi e purificazione degli zuccheri acidi	29
1.3.4. Analisi per HPAEC-PAD degli zuccheri acidi	30
1.4. Determinazione della composizione amminoacidica della plmK	30
1.5. Determinazione qualitativa della composizione in fenoli della plmK	30
1.5.1. Reazione di ossidazione con CuO e purificazione della componente fenolica	30
1.5.2. Analisi qualitativa per HPLC	31
1.6. Analisi della componente metallica della plmK mediante spettroscopia ad assorbimento atomico (AAS)	31
1.7. Titolazione potenziometrica della plmK	31
1.8. Analisi spettroscopiche della plmK	32
1.8.1. Spettro di assorbimento UV-Vis della plmK	32

<b>1.8.2.</b> Spettro DRIFT della plmK	32
<b>1.9.</b> Determinazione del peso molecolare relativo della plmK su Biogel A	32
<b>1.9.1.</b> Preparazione della retta di calibrazione	32
<b>1.9.2.</b> Determinazione del peso molecolare relativo della plmK	32
<b>1.10.</b> Determinazione della distribuzione della componente organica della plmK in funzione del peso molecolare relativo su Biogel A	33
<b>1.11.</b> Determinazione della distribuzione della componente organica della plmK su fase inversa RP-18	34
<b>2. PREPARAZIONE DELLA POLIMERINASDK (PLMSDK) E SUA CARATTERIZZAZIONE CHIMICA</b>	35
<b>2.1.</b> Idrolisi della plmK	35
<b>2.2.</b> Caratterizzazione chimica della plmSDK	35
<b>2.2.1.</b> Dosaggio delle proteine con il metodo Bradford	35
<b>2.2.2.</b> Dosaggio degli zuccheri con l'antrone	35
<b>2.2.3.</b> Dosaggio dei polifenoli con il reattivo di Folin-Ciocalteu	36
<b>2.3.</b> Determinazione della composizione in monosaccaridi della plmSDK	36
<b>2.3.1.</b> Idrolisi e purificazione degli zuccheri neutri	36
<b>2.3.2.</b> Analisi per HPAEC-PAD degli zuccheri neutri	36
<b>2.3.3.</b> Idrolisi e purificazione degli zuccheri acidi	37
<b>2.3.4.</b> Analisi per HPAEC-PAD degli zuccheri acidi	37
<b>2.4.</b> Determinazione della composizione amminoacidica della plmSDK	37
<b>2.5.</b> Determinazione qualitativa della composizione in fenoli della plmSDK	37
<b>2.6.</b> Analisi della composizione metallica della plmSDK per AAS	37
<b>2.7.</b> Titolazione potenziometrica della plmSDK	38
<b>2.8.</b> Analisi spettroscopiche della plmSDK	38
<b>2.8.1.</b> Spettro di assorbimento UV-Vis della plmSDK	38
<b>2.8.2.</b> Spettro DRIFT della plmSDK	38
<b>2.8.3.</b> Reazione con diazometano della plmSDK e analisi DRIFTS	38
<b>2.9.</b> Determinazione del peso molecolare relativo della plmSDK su Biogel A	39
<b>2.10.</b> Determinazione della distribuzione della componente organica in funzione del peso molecolare relativo della plmDK su Biogel A	39
<b>2.11.</b> Determinazione della distribuzione della componente organica	

della plmSDK su colonna a fase inversa C-18	40
<b>3. PREPARAZIONE DELLA POLIGMENTINA<math>\beta</math>K (PLG<math>\beta</math>K) E SUA CARATTERIZZAZIONE CHIMICA</b>	41
3.1. Preparazione della plg $\beta$ K	41
3.2. Determinazione della distribuzione delle componenti organiche della plg $\beta$ K in funzione del peso molecolare relativo	41
<b>4. REAZIONI DI SCAMBIO DELLA PLMK E DELLA PLMSDK E VALUTAZIONE DEL POTENZIALE IMPIEGO COME DECONTAMINANTI E BIOFILTRO</b>	42
4.1. Reazioni di scambio della plmK	42
4.2. Spettri DRIFT della plmK e delle plmMe derivate	42
4.3. Reazioni di scambio della plmSDK	43
4.4. Spettri DRIFT della plmSDK e delle plmSDMe derivate	43
4.5. Esperimenti per valutare l'attività di biofiltro della plmK	43
4.6. Esperimenti per valutare l'attività decontaminante simulata della plmK	44
<b>5. CARATTERIZZAZIONE BIOLOGICA E BIOCHIMICA DELLA PLMK, DELLE PLMME, DELLA PLMSDK, DELLE PLMSDME, DELLA PLMSEA, DELLA PLMMIX E DELLA PLG<math>\beta</math>K</b>	45
5.1. Saggi di attività fitotossica della plmK, della plmSDK e della plg $\beta$ K	45
5.1.1. Saggi di attività fitotossica della plmK e delle plmMe	45
5.1.2. Saggi di attività fitotossica della plmSDK e delle plmSDMe	45
5.1.3. Saggi di attività fitotossica della plmMix e della plmSea	45
5.2. Saggi di attività antiossidante	45
<b>RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	
<b>1. RECUPERO E CARATTERIZZAZIONE DELLA POLIMERINA<math>\bar{K}</math> (PLMK)</b>	47
1.1. Recupero della plmK	47
1.2. Caratterizzazione chimica della plmK	47
1.2.1. Analisi della natura chimica	47
1.2.2. Determinazione della composizione dei monosi della componente polisaccaridica	48
1.2.3. Determinazione della composizione amminoacidica della componente proteica	48

1.2.4. Determinazione della composizione qualitativa dei fenoli della componente catecolmelaninica della plmK e formulazione di un modello strutturale ipotetico del polimero catecolmelaninico	48
1.2.5. Determinazione della componente metallica della plmK	51
1.3. Titolazione dei gruppi -COOH e -OH fenolici presenti nella plmK	51
1.4. Caratterizzazione spettroscopica della plmK	51
1.4.1. Spettro di assorbimento UV-Vis	52
1.4.2. Spettro di assorbimento DRIFT della plmK	52
1.5. Dimostrazione del legame tra gli ioni metallici e i gruppi carbossilato e gli altri gruppi funzionali (chelazione) della plmK	53
1.6. Dimostrazione dello status di aggregato delle componenti organiche della plmK e della presenza di una porzione libera (non aggregata) della componente polisaccaridica	54
1.6.1. Analisi del comportamento della plmK nella cromatografia per gel filtrazione su Biogel A	54
1.6.2. Analisi del comportamento della plmK nella cromatografia su fase inversa C-18	55
2. PREPARAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DELLA POLIMERINASDK (PLMSDK)	59
2.1. Preparazione della polimerinaSDK (plmSDK) coincidente con la poligmentinaSDK (plgSDK)	59
2.2. Caratterizzazione chimica della plmSDK	59
2.2.1. Caratterizzazione della componente proteica	59
2.2.2. Caratterizzazione della componente catecolmelaninica	60
2.2.3. Caratterizzazione della componente polisaccaridica	60
2.2.4. Caratterizzazione della componente metallica	61
2.3. Titolazione dei gruppi -COOH e -OH fenolici presenti nella plmSDK	61
2.4. Caratterizzazione spettroscopica della plmSDK e del suo derivato trattato con diazometano (plmDCH <sub>3</sub> )	62
2.4.1. Spettro di assorbimento UV-Vis	62
2.4.2. Spettro di assorbimento DRIFT della plmSDK e del suo derivato trattato con diazometano (plmDCH <sub>3</sub> )	62
2.5. Dimostrazione dello status di aggregato delle componenti organiche	

della plmSDK	63
<b>2.5.1.</b> Analisi del comportamento della plmSDK nella cromatografia per gel filtrazione su Biogel A	64
<b>2.5.2.</b> Analisi del comportamento della plmSDK nella cromatografia a fase inversa C-18	64
<b>2.5.3.</b> Analisi del comportamento all'idrolisi della plmSDK	65
<b>2.6.</b> Discussione sulla natura chimica delle forze leganti le componenti organiche dell'aggregato plmSDK	65
<b>2.7.</b> Discussione sul legame della componente metallica con l'aggregato plmSDK	66
<b>2.8.</b> Dimostrazione che la plg $\alpha$ K e la plg $\beta$ K contengono in comune lo stesso aggregato organico base, corrispondente alla plmSDK	67
<b>2.9.</b> Formulazione degli ipotetici modelli strutturali supramolecolari della plgsdk e delle plg $\alpha$ K e plg $\beta$ K	68
<b>2.9.1.</b> Determinazione del modello strutturale ipotetico del polimero catecolmelaninico della plgSDK	68
<b>2.9.2.</b> Determinazione del modello strutturale ipotetico della componente polisaccaridica della plgSDK	69
<b>2.9.3.</b> Determinazione della formula generale strutturale ipotetica della componente proteica della plgSDK	70
<b>2.9.4.</b> Determinazione del modello ipotetico di distribuzione della della componente metallica della plgSDK	70
<b>2.9.5.</b> Formulazione del modello strutturale ipotetico della plgSDK	70
<b>2.10.</b> Recupero e caratterizzazione della plm $\beta$ K	71
<b>3.</b> ASPETTI APPLICATIVI DELLA POLIMERINAK (PLMK), DI UN SUO DERIVATO PURIFICATO SU FASE INVERSA (PLG $\beta$ K) E DEL SUO SALE DI POTASSIO DEGLICOSILATO (PLMSDK $\equiv$ PLGSDK)	72
<b>3.1.A.</b> Produzione e caratterizzazione delle plmMe derivate dalla plmK	73
<b>3.1.B.</b> Produzione e caratterizzazione delle plmsdme derivate dalle plmSDK	77
<b>3.1.C.</b> Potenziali applicazioni delle polimerine esaminate	80
<b>3.1.D.</b> Saggi di fitotossicità su piantine di pomodoro della plmk delle plmMe e plmSDMe	81

<b>3.1.D.1.</b> Effetto della plmK e delle plmeMe su piantine di pomodoro recise	81
<b>3.1.D.2.</b> Effetto della plmSDK e delle plmSDMe su piantine di pomodoro recise	83
<b>3.2.</b> Applicazioni della plmMix e della plmSea	84
<b>3.2.A.</b> Biofiltro di soluzioni di metalli pesanti (soluzione simulata di metalli tossici)	85
<b>3.2.B.</b> Biofiltro di acque marine	86
<b>3.2.C.</b> Saggi di fitotossicità su piantine di pomodoro della plmMix e della plmSea	86
<b>3.2.C.1.</b> Effetto della plmMix su piantine di pomodoro recise	86
<b>3.2.C.2.</b> Effetto della plmSea su piantine di pomodoro recise	86
<b>3.3</b> Attività antiossidante delle polimerine di origine naturale plmK, plgβK e plgSDK	87
<b>CONCLUSIONI</b>	89
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	91
<b>APPENDICE: ABSTRACT DELLA TESI</b>	100

## 1. L'INDUSTRIA FRANTOIANA

La coltivazione dell'olivo ha sempre avuto una notevole importanza economica e sociale nei Paesi del Bacino del Mediterraneo. E', infatti, in Spagna, Italia e Grecia che si ottiene la maggior parte della produzione mondiale di olive, stimata intorno ai 10 milioni di tonnellate, di cui 9 milioni utilizzati per l'estrazione dell'olio di oliva. In Italia circa 2.500.000 t di olive sono destinate all'industria di estrazione da cui si ottengono 450-500.000 t di olio, pari a circa il 25 % dell'intera produzione mondiale. L'industria frantoiana è caratterizzata dalla stagionalità e dall'estrema dispersione delle aziende frantoiane. La lavorazione è eseguita in 13.000 frantoi sparsi in tutto il territorio con capacità di trattamento medio-piccola che varia da 5 a 50 t olive/d (Pacifico, 1989; Di Giovacchino, 1996).

Il principale sottoprodotto della lavorazione delle olive è dato dalle acque di vegetazione (AV), che derivano dall'acqua di costituzione della drupa e dall'acqua impiegata per la diluizione della pasta delle olive e per il lavaggio delle macchine. I frantoi più moderni basati su tecniche estrattive continue per centrifugazione producono fino a 1,5 mc AV/t olive, quelli tradizionali basati su metodi discontinui per pressione intorno a 0,4 mc/t di olive. Le tecnologie estrattive stanno evolvendo rapidamente e tale evoluzione risponde all'obiettivo principale di ottenere acque col più basso contenuto di olio, che negli impianti per pressione è di circa 2-8 g/l, corrispondente a circa 0,1-0,4 Kg /100 Kg di olive.

L'inconveniente legato alle ragguardevoli quantità di acqua di scarico è stato affrontato di recente con l'introduzione di sistemi di centrifugazione cosiddetti "a due fasi" o "a tre fasi", ma non mancano le controindicazioni (perdita di olio, eccessiva umidità della sansa inutilizzabile come combustibile).

Complessivamente in Italia in ogni campagna olearia, compresa nell'arco di 90-150 giorni a partire dal mese di novembre, si producono

circa 2.000.000 mc di AV, di cui oltre 800.000 mc nella sola Puglia (Pacifico, 1989; Di Giovacchino, 1996).

La composizione delle AV cambia notevolmente a seconda del processo di estrazione dell'olio (per pressatura o per centrifugazione), delle caratteristiche e qualità delle olive di partenza e della pratica adottata per la loro raccolta (pelatura meccanica o per scuotimento; Pacifico, 1989).

## **2. COMPOSIZIONE DELLE AV**

Le AV contengono, in soluzione ed in sospensione, sostanze organiche e minerali che costituiscono dopo l'evaporazione dell'acqua il residuo secco. Tale residuo, variabile dal 5% al 25%, è rappresentato per l'80-90% da sostanza organica e per il 10-20% da materiale inorganico (principalmente potassio). La composizione media di un'acqua di vegetazione è riportata in Tabella A (Pacifico, 1989).

Le AV hanno un colore che va dal rosso al nero, secondo lo stato di degradazione dei componenti fenolici delle olive. L'aspetto è torbido, l'odore è di olio di oliva ma può essere anche molesto se si sono avuti fenomeni di irrancidimento o peggio di fermentazioni anaerobiche (Hamdi, 1993).

Le AV hanno un pH compreso tra 4,9 e 5,3 dovuto alla presenza di acidi organici quali acetico, malico, fumarico, glicerico, lattico, malonico, citrico, ossalico, tartarico e succinico.

Il pH in seguito può diminuire a causa delle fermentazioni che avvengono naturalmente nelle acque stesse.

Le sostanze organiche, essenzialmente in soluzione e in quantità minore in sospensione (165 g/l) o in emulsione (olio), determinano l'elevato potere inquinante. Tale effetto si esprime come COD. (domanda chimica di ossigeno) e BOD (domanda biologica di ossigeno) i cui valori massimi raggiungono i 200 e 100 mg/l, rispettivamente (Balice, 1982).

Tra i solidi sospesi, la cui concentrazione assoluta è comunque anch'essa molto alta, prevale la frazione non sedimentabile ricca di materiale vegetale colloidale.

Le ceneri dopo riscaldamento in muffola a 500 °C si aggirano intorno a 6-20 g/l, corrispondente al 5-20 % del residuo secco.

La frazione organica contiene zuccheri, tannini, polifenoli, polialcoli, pectine, lipidi e proteine (Fiestas Ros de Ursinos, 1981; Salvemini, 1985).

Gli zuccheri sono le sostanze organiche che prevalgono nettamente nel refluo. I contenuti totali oscillano tra 15 e 40 g/l a seconda del sistema di estrazione impiegato, della varietà e dello stato sanitario delle olive, con una prevalenza di zuccheri direttamente fermentescibili: glucosio (70%), fruttosio (10%) saccarosio (5%), mannitolo (14%), galattosio (1%) oltre a cellulosa e a pectine della polpa di olive che costituiscono i solidi totali in sospensione (Fernandez Diaz, 1983; Salvemini, 1985). Gli stessi autori riportano l'esistenza di un complesso saccaridico non ancora identificato simile alle mucillagini, dal quale per idrolisi si liberano galattosio (14-15 %) glucosio (4-4.5 %), arabinosio (10.5-11%) xilosio (1-1.2 %), ramnosio e acido galatturonico (4.7-5.1%).

Accanto agli zuccheri, in quantità anche ad essi superiore, è presente il pigmento bruno o catecolmelaninico che si forma durante la molitura dei frutti dagli orto-difenoli, di cui è ricca la polpa, per opera delle fenolossidasi che ne determinano prima la chinonizzazione e poi la polimerizzazione (Ranalli, 1990).

Tra i prodotti di idrolisi del pigmento sono stati identificati pirocatechina, acido protocatechico, acido salicilico e zuccheri quali glucosio, ramnosio, arabinosio e galattosio, apparsi presenti nel rapporto molecolare 18:10:2.5:5:2 (Ragazzi et al., 1967; Ranalli, 1990). Il pigmento contiene inoltre azoto (2,5 %) sottoforma di proteine (Fiestas Ros de Ursinos, 1981; Salvemini, 1985).

Trattando con ossido di rame il pigmento, ottenuto secondo la procedura di Ragazzi (Perez et al., 1987), si è visto che lo spettro di sostanze fenoliche che da esso derivano è ancora più ampio; infatti sono stati identificati: tirosolo, 3,4 diidrossibenzaldeide, p-idrossibenzaldeide, p-vanillina, aldeide siringica, ac. ferulico, ac. p-cumarico, ac. p-idrossibenzoico, ac. 3-idrossibenzoico, ac. siringico e ac. p-idrossifenilpropionico. Un fungo, il ceppo SC 26 di *Phanerochete crisosporium*, provoca la decolorazione del terreno di coltura addizionato del pigmento catecolmelaninico, e nello stesso tempo l'accumulo, nel mezzo, di fenoli a basso peso molecolare (Perez et al., 1987).

Minore incidenza sul carico inquinante del refluo hanno gli acidi organici (acetico, fumarico, glicerico, lattico, malico, malonico, tartarico, tricarballylico, ossalico, etc.) e le sostanze azotate, 0.3-0.8 %. In queste ultime sono state identificate tutti gli amminoacidi, fra cui i più rappresentativi sono risultati l'acido glutammico (6.05 g/kg s.s.) e la prolina (4.84 g/kg s.s.) (Fiestas Ros de Ursinos, 1981; Salvemini, 1985).

I fenoli sono presenti in quantità variabili dai 2 ai 10 g/l in dipendenza degli stessi parametri che influenzano la concentrazione di zuccheri (Balice et al., 1988). Tra i fenoli liberi sono stati ritrovati quantità significative di ac. caffeico, idrossitirosolo (derivato dall'idrolisi dell'oleuropeina) e tirosolo, quest'ultimo proveniente principalmente dalla mandorla del frutto. Accanto ad essi si ritrovano ac. paracumarico, vanillico, protocatechico, diidrocaffeico, diidrossicinnamico e siringico, nonché oleuropeina, 1-caffeil-glucosio, 4-monoglucoside e diglucoside del 3,4 diidrossifeniletanolo, apigenina, luteolina, quercetina, flavonolo, etc.

Nel refluo sono contenute altresì piccolissime quantità di sostanze cerose e resinose nonché di vitamine e ormoni, ed è verosimile anche la presenza di residui di pesticidi (Modica, 1987).

Le AV contengono sali inorganici, 0.4-1.5 %, di cui la frazione preponderante è solubile (fosfati, solfati, cloruri) e l'altra (20%) insolubile (carbonati e silicati). Tra i cationi l'elemento più abbondante è il potassio a

cui seguono sodio, calcio, magnesio; tra gli anioni sono presenti cloruri, fosfati e solfati (Ranalli, 1990; Arienzo e Capasso, 2000).

Le AV contengono anche antocianine (Tanchev et al., 1980).

### **3. EFFETTI NOCIVI E RICHIAMI NORMATIVI**

A causa dell'elevato contenuto di sostanze organiche (fino a 600 volte maggiore di quello dei liquami urbani) difficilmente biodegradabili e di inibitori enzimatici, quali composti fenolici, le AV sono state a lungo considerate una sorgente di inquinamento (Ielmini et al., 1976; Saviozzi et al., 1993). Secondo tali autori il potenziale inquinante dell'effluente derivante dalla lavorazione di un quintale di olive è equivalente a quello di 45 abitanti; due litri di AV provocano un inquinamento pari a quello di tre persone in un giorno.

La composizione e i valori degli indici di inquinamento del refluo sono molto influenzati dalle tecniche e dai sistemi adottati per l'estrazione dell'olio dalla materia prima. Rispetto ai liquami urbani, le AV hanno una minore pericolosità igienico-sanitaria, perché prive di carica microbica patogena e di composti clororganici.

Il loro smaltimento incontrollato può provocare gravi danni all'ambiente e precisamente ai corpi idrici superficiali e sotterranei, dove si può avere la scomparsa della fauna e della flora batterica aerobica e la sostituzione con flora anaerobica la cui attività metabolica produce sostanze tossiche.

Lo smaltimento in depuratori di reflui urbani operanti per ossidazione biologica con fanghi attivi causa arresto dell'attività degradativa, rigonfiamento dei fanghi che alleggeriti e disgregati galleggiano sull'acqua e fuoriescono dall'impianto con i reflui trattati. Inoltre i sali e i polifenoli rallentano l'attività batterica, eliminano dai fanghi i protozoi ciliati che hanno il compito di rendere limpido l'effluente, e di conseguenza il BOD e il COD passano dai normali 40 e

300 mg/l a 300 e 2000 mg/l, rispettivamente, di gran lunga superiori ai valori consentiti per lo scarico.

Nel terreno l'immissione massiccia delle AV svolge azione fitotossica ed erbicida sia per l'elevato contenuto di sali, che possono causare la morte delle piante per plasmosi, che di polifenoli. L'elevato carico organico richiede, per essere metabolizzato dalla microflora presente nel terreno, una grande quantità di ossigeno. Se il terreno è argilloso si può avere la sua compattazione, impedendo il reintegro con altro ossigeno atmosferico.

Solo recentemente le AV non sono più regolamentate dalla legge Merli 319/76 sulla disciplina degli scarichi idrici e dalla legge 915/82 sullo smaltimento di rifiuti speciali. Infatti, in base alla legge Merli 319/76 gli scarichi di AV, dovendo rispondere ai limiti di qualità assai restrittivi della Tabella A allegata alla stessa legge, dovevano essere sottoposti a trattamento in idonei impianti di depurazione. La nuova legge, 574/96, prevede che tali reflui possano essere sparsi in pieno campo in quantità di 50 e 80 metri cubi per ettaro per le AV di pressa e di centrifuga, rispettivamente. La legge 574/96 stabilisce che lo spargimento controllato delle AV non è nocivo né per il suolo, né per le acque, né per la vegetazione.

In ogni caso è vietato lo spargimento sui seguenti terreni:

- quelli situati a distanza inferiore ai 300 metri dalle aree di captazione di acque potabili;
- in quelli situati a meno di 200 metri dai centri abitati;
- in terreni i quali all'atto dello spargimento sono coltivati;
- in terreni in cui sono localizzate falde che hanno una profondità inferiore a 10 metri in quelle che possono venire a contatto con acque di percolazione del suolo;
- terreni gelati, innevati, saturi di acqua e inondati.

#### **4. ACQUE DI VEGETAZIONE E PRODOTTI UTILI**

La quantità complessiva di biomassa prodotta dall'industria europea dell'olio di oliva raggiunge approssimativamente 6,8 milioni di t/anno.

Le AV possono essere considerate, data l'origine naturale delle loro componenti non acquose, una potenziale fonte di energia da recuperare integralmente e riciclare opportunamente.

Con l'obiettivo di massimizzare il valore aggiunto delle acque, alcuni ricercatori propongono un completo recupero delle AV, utilizzando la frazione polimerica deglicosilata come fertilizzante organico, gli zuccheri e gli altri composti per l'industria alimentare e dei pesticidi (Iniotakis et al., 1990; Hamdi, 1993). L'utilizzazione come fertirrigante rappresenta l'approccio più ovvio ed immediato al riciclo delle risorse energetiche in esse presenti. Considerando di spargere sul terreno agrario una quantità di AV pari a 100 mc/ha il quantitativo di N, P e K è il seguente:

- ossido di potassio      240-360 Kg/ha
- nitrato di ammonio    100-180 Kg/ha
- anidride fosforica    50-90 Kg/ha

Tuttavia l'utilizzo delle AV tal quali non ne sfrutta tutte le potenziali proprietà fertilizzanti in quanto la componente organica è allo stato fresco, non maturo e non umificato.

Alcuni processi come il compostaggio, favorendo i processi di mineralizzazione e polimerizzazione ossidativa (umificazione), permettono il totale recupero della risorsa, senza causare gli inconvenienti legati allo spandimento diretto.

Altre tecnologie sono indirizzate al pretrattamento delle AV con catalizzatori biologici e/o minerali, simili a quelli che agiscono naturalmente nel suolo (Ranalli, 1990). Tali autori suggeriscono l'aggiunta di una miscela enzimatica (polienzym) in ragione del 2-3 per mille rispetto ai solidi totali presenti nel refluo. Dopo due ore di arieggiamento, il processo di umificazione dei solidi in sospensione risulta avviato e dopo otto ore l'acqua di vegetazione risulta trasformata in ammendante vegetale liquido. Il refluo dopo questo trattamento presenta un pH neutro ed è ricco

di microflora selezionata e acidi umici. Un altro procedimento, simile al precedente, si basa sull'aggiunta alle AV di acidi umici e fulvici in soluzione acquosa e nella sua trasformazione per catalisi naturale in estratto umico da utilizzare come ammendante agricolo (Ranalli, 1990).

Le AV disidratate somministrate ai ruminanti provocano diarree a causa dell'alta concentrazione di sodio e di componenti fenolici (Salvemini, 1985). Tali inconvenienti sono superati col processo "Dalmolive" (Martilotti, 1983) basato sulla fermentazione delle AV con sottoprodotti solidi dell'estrazione dell'olio di oliva e di altri residui agricoli.

Numerosi sono gli studi volti ad identificare e isolare prodotti utili dalle AV. Alcune di queste ricerche sono in corso come quelle volte ad ottenere composti impiegabili come eccipienti, dolcificanti nell'industria alimentare, di enzimi pectinolitici e di mannitolo da impiegare nei settori farmaceutico e agronomico.

Una compagnia spagnola ha valutato le proprietà terapeutiche di 50 nuovi composti isolati dalle AV per mezzo di tecniche di distillazione molecolare, due dei quali hanno già dato incoraggianti risultati come composti antitumorali (Amat et al., 1984).

Interessante appare inoltre l'ottenimento dalle AV, per processi di estrazione supercritica, di squalene (Bondioli, 1993), che è un idrocarburo terpenoide che si rinviene negli oli di fegato di pesce ed è utilizzato nella preparazione di cosmetici come agente emolliente o nell'industria farmaceutica, in quanto è un precursore della sintesi del colesterolo.

Data la presenza anche delle proteine nelle AV, è stata provata la produzione di proteine da organismi unicellulari (POU) per l'alimentazione animale, utilizzando lieviti del genere *Saccharomyces* e *Candida* (Giulietti et al., 1984). L'impiego di queste proteine per l'alimentazione animale è stato limitato dai componenti fenolici fissati nei lieviti. Per eliminarli Amat et al., (1984) hanno trattato le AV della centrifugazione con una soluzione al 40 % di idroperossidi e di NaOH e inoculate poi con *Saccharomices cerevisiae*. I lieviti impiegati in questi processi hanno

degradato soltanto gli zuccheri e i lipidi; i componenti inquinanti, pectine, tannini e polifenoli non sono stati eliminati.

Con l'impiego di funghi come *Aspergillus* sp. e *Geotricum candidum* si può ottenere una biomassa molto digeribile con un contenuto di proteine grezze che può raggiungere il 30%, potenzialmente adatto all'alimentazione dei ruminanti (Vaccharino et al., 1986).

Altri studi riportano sull'uso delle AV nelle razioni alimentari animali arrivando ad incorporare fino al 20 % di AV nella razione di ingrasso (Omar, 1995).

Le proprietà organolettiche e quindi alimentari della frazione fibrosa delle AV possono essere notevolmente migliorate per via enzimatica (Valiente, 1995). Prodotti da forno ottenuti da farine in cui quella di frumento è stata sostituita col 10 % di fibra da AV modificata enzimaticamente hanno mostrato un sensibile miglioramento della tessitura.

La produzione di enzimi pectinolitici può raggiungere i 29,5 UV/cm<sup>3</sup> dopo eliminazione dei polifenoli per flocculazione-sedimentazione (Ross et al., 1993; Bautista et al., 1996).

La crescita di *Gryptococcus albidus* insieme alle AV in un reattore per agitazione dopo 48 ore di incubazione elimina il 75% di BOD con produzione di pectinasi (13 UV/cm<sup>3</sup>) (Federici et al., 1988; Petruccioli et al., 1988; Hamdi, 1993; Montedoro et al., 1993). Il concentrato enzimatico è stato poi utilizzato nel processo di estrazione dell'olio di oliva facendo aumentare la concentrazione di olio estratto dall'84,3% al 90,7% (Faliagas, 1995).

Le AV rappresentano una importante sorgente economica per l'ottenimento di antiossidanti naturali come i fenoli (Servilli e Montedoro, 1989; Visioli e Galli, 1994; Visioli e Galli, 1995; Visioli et al., 1995). Tali composti, pur manifestando spiccata attività antiossidante in sistemi acquosi che lipidici, non hanno ancora avuto una larga diffusione commerciale, sia per problemi connessi alla loro estrazione dalle matrici vegetali che per presunta mutagenicità di alcune molecole (Fantozzi, 1996). Esse sono in grado di agire da antiossidanti grazie alla capacità di agire da

donatori di idrogeno del gruppo ossidrilico legato all'anello aromatico, caratteristica che consente loro di agire da scavengers di radicali liberi, oppure per le proprietà ox-redox, che consentono loro di agire da agenti riducenti e da quencers dell'ossigeno singoletto o, infine, grazie alla loro capacità di agire da chelanti di metalli pesanti, offrendo così protezione alle molecole target nei confronti di reazioni radicaliche indotte da ferro o rame (Rice-Evans e Miller, 1996). Nel valutare l'attività antiossidante di una sostanza fenolica è necessario considerare diversi aspetti: qual'è la molecola target che deve essere protetta dal danno ossidativo; ii) con quale meccanismo agisce la molecola antiossidante (scavenger di radicali, previene la formazione dei radicali o ne ripara il danno), iii) qual è la stabilità del radicale derivante dall'antiossidante; infine va considerata la possibilità che un antiossidante possa provocare un danno biologico in un sistema diverso da quello nel quale esercita la sua azione protettiva. E' possibile infatti che una sostanza fenolica possa agire sia da antiossidante che da pro-ossidante, a seconda delle condizioni di reazione (pH, concentrazione fenolica, composizione del mezzo, etc; Halliwell, 1990).

Studi condotti da Capasso et al., (1992a; 1992b; 1994a;1995a) riportano l'isolamento da AV di idrossitirosolo, tirosolo, catecolo, e 4-metilcatecolo. Tali composti hanno mostrato attività biologiche selettive e non selettive sia saggiati in vitro su piantine e su funghi e batteri fitopatogeni sia *in vivo* su piante di olivo (Bartolini et. al., 1994; Capasso et al., 1995b, 1996a)

L'idrossitirosolo, presente in maggiori quantità nelle AV, è il polifenolo più interessante sia dal punto di vista produttivo perché non disponibile in commercio, sia per le sue notevoli proprietà farmacologiche e antiossidanti (Capasso et al., 1994a, 1999; Chimi et al., 1988). L'idrossitirosolo conferisce inoltre stabilità all'olio vergine di oliva (Chimi et al., 1988), *in vitro* inibisce l'ossidazione di lipoproteine a bassa densità (Salami et al., 1995) e conferisce proprietà dietetiche all'olio vergine di oliva (Visioli e Galli, 1995).

Il tirosolo invece è ottenibile commercialmente, è quasi sempre presente in AV e si ottiene facilmente da AV in forma cristallina (Capasso et al., 1992a).

L'idrossitirosolo, il catecolo e il 4-metilcatecolo sono stati testati nei confronti di *Pseudomonas syringae* subsp. *Savastanoi*, agente della rogna dell'olivo (Capasso et al., 1995b). Il 4-metilcatecolo è risultato il più attivo, esibendo attività battericida a  $10^{-4}$  M mentre alle stesse concentrazioni catecolo ed idrossitirosolo inibiscono la crescita del 68 e 73 %. Catecolo e 4-metilcatecolo sono attivi direttamente su *Bactrocera Oleae*, (Capasso et al., 1994b) agente della mosca delle olive. L'idrossitirosolo si è inoltre mostrato efficace come regolatore di crescita, inducendo la cascola delle olive (Bartolini et al., 1994).

Gli autori propongono che le AV, anche se non possono essere utilizzate direttamente, devono essere sottoposte a frazionamento al fine di isolare il catecolo. Quest'ultimo composto una volta acetilato permette di ottenere l'acetilcatecolo che è molto più stabile e dotato di tossicità ambivalente, nei confronti sia di *Pseudomonas savastanoi* che di *Bactrocera oleae*.

Molti di questi composti di rilevante interesse industriale possono essere ottenuti dalle AV per mezzo di fasi stazionarie cromatografiche a basso costo reperibili da sorgenti naturali come la cristobalite o il tufo (Capasso et al., 1998).

In altri studi Panizzi et al., (1960), Schlösser (1983), Capasso et al., (1996b) e Lo Scalzo e Scarpati (1993) hanno isolato dalle foglie e dai frutti l'oleuropeina, un glucoside fenolico. Tale glucoside è stato sottoposto ad idrolisi chimica ed enzimatica, utilizzando una  $\beta$ -glucosidasi, e trasformato in aglicone, identificato spettroscopicamente, e glucosio, dosato enzimaticamente. Mentre del glucosio sono note le proprietà alimentari e disintossicanti, l'aglicone è stato idrolizzato chimicamente in acido elenolico e idrossitirosolo, composti mostranti notevole attività antibatterica (Fleming et al., 1973) e antibiotica contro *Pseudomonas*

*Savastanoi* (Iacobellis et al., 1985). L'oleuropeina è risultata tossica contro *Pseudomonas savastanoi* a concentrazioni minori di  $10^{-1}$  e  $10^{-4}$  M.

Alcune ricerche (Capasso et al., 1996a) riportano l'isolamento, per estrazione diretta delle AV, di composti non fenolici con attività fungistatica da impiegare come pesticidi naturali in programmi di lotta integrata per la protezione di piante di olive così come di altre colture. Il composto isolato denominato CAV, ha mostrato alla concentrazione di  $10^{-4}$  M un effetto di inibizione della crescita di *Phytophthora capsici*, un fungo patogeno del peperone (*Capsicum annuum*)

Arienzo e Capasso (2000) riportano che le AV sono ricche di composti minerali, come potassio, magnesio e calcio insieme ad apprezzabili quantità di altri microelementi e che risultano per la massima parte legati alla frazione polimerica (78 % per K e > 90 % per i rimanenti ioni) composta da polisaccaridi, polimeri fenolici e proteine, composti ricchi di gruppi funzionali attivi nel processo di adsorbimento dei metalli.

Le AV rappresentano pertanto anche un bio-materiale con notevole potenziale di impiego industriale per la rimozione di metalli tossici da acque di scarico e da effluenti minerari.

## **SCOPO DELLA TESI**

In una precedente ricerca condotta sulle AV da Arienzo e Capasso (2000) questi autori hanno trovato che i cationi metallici, presenti naturalmente in queste acque di scarto, sono essenzialmente adsorbiti sulla sua frazione polimerica, costituita peraltro da zuccheri, proteine e polifenoli. Inoltre essi hanno identificato come metallo principale il potassio, che è risultato l'unico legato non completamente (78%) a tale frazione.

Considerando la copiosità di tale frazione organica (vedi lavoro Arienzo e Capasso, 2000) abbiamo intrapreso una ricerca mirante a due obiettivi principali:

1. recupero e caratterizzazione chimica e chimico-fisica della frazione polimerica delle AV;
2. sperimentazione di tale frazione in applicazioni di interesse agrario, biotecnologico-ambientale e biotecnologico-industriale.

## **1. GENERALITÀ**

I solventi di tipo ACS ed i reattivi utilizzati sono della Carlo Erba, Lab-Scan e della Merck.

L'acqua ultrapura è stata ottenuta da un apparato Milli-Q Plus della Millipore

Le AV impiegate provengono dai frantoi di Monteroduni (Is) ottenuti con il metodo della pressa.

Le acque marine per le prove di scambio sono state prelevate ad Ercolano.

## **2. FILTRAZIONE DEI CAMPIONI**

Per la filtrazione delle acque di vegetazione è stato utilizzato un sistema Millipore corredato di membrane Millipore da 1,2 e 0,2  $\mu\text{m}$ .

La filtrazione dei campione da analizzare mediante HPLC e HPAEC-PAD è avvenuta utilizzando filtri Acrodisc da 0,45  $\mu\text{m}$  della Gelman.

## **3. PRECIPITAZIONE METANOLICA DELLE ACQUE DI VEGETAZIONE**

E' stata eseguita predisponendo un bagno di ghiaccio e sale ad una temperatura di  $-8-10^{\circ}\text{C}$  nel quale è stato posto il pallone contenente il campione. A questo è stato aggiunto, in continua agitazione, metanolo raffreddato a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino alla comparsa del precipitato. La separazione del precipitato dal surnatante è stata ottenuta per centrifugazione a 10.000 g per 30 min. impiegando una centrifuga modello Sorvall RC-5B della Dupont.

## **4. DIALISI**

E' stata eseguita con membrane di taglio di 3500 Da (Spectra/Por, Specrum Medical Industries, Inc., Houston Texas USA) contro acqua

ultrapura in rapporto di 1:5 rispetto al volume del campione, effettuando cambi di acqua ogni 3-4 ore per un totale di 5 cambi.

## **5. LIOFILIZZAZIONE**

E' stata eseguita utilizzando l'apparecchio Freezee Dryer Modulyo della Edwards.

Il congelamento dei campioni è stato effettuato mediante un bagno di MeOH a  $-30^{\circ}\text{C}$  della Heto-High Technology of Scandinavia.

## **6. DOSAGGIO DEI CARBOIDRATI**

E' stato effettuato secondo il metodo di Fung et al., (1953) con i seguenti reagenti:

- soluzione di antrone (fornito dalla Aldrich Chemie) 0,2 % w/v in  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 96%, preparata fresca ogni volta almeno 4 ore prima dell'uso;
- soluzione standard di carboidrati al 50% w/v di D-galattosio e al 50% w/v di D-mannosio, da cui si sono preparate soluzioni da 10 a 40  $\mu\text{g}$  di zuccheri in 400  $\mu\text{l}$  di volume finale, per la costruzione di rette di calibrazione.

Porzioni di 800  $\mu\text{l}$  di soluzione di antrone sono state aggiunte ad aliquote di campione, tenuto precedentemente a  $-4^{\circ}\text{C}$  in un bagno di ghiaccio per 45 min. Dopo aver mescolato il contenuto, i campioni sono stati posti a  $92^{\circ}\text{C}$  a bagnomaria per 8 min. Successivamente la reazione è stata bloccata ponendo nuovamente i campioni in un bagno di ghiaccio.

Sia per gli standard sia per i campioni le analisi sono state effettuate in triplo mediando i valori ottenuti.

Il valore dell'assorbanza è stato letto nel visibile a 585 nm.

## **7. DOSAGGIO DELLE PROTEINE**

E' stato effettuato con il metodo di Bradford (1976) impiegando i seguenti reagenti:

- Coomassie Brilliant Blue G-250 fornito dalla Biorad;
- Soluzione di BSA 0,2 mg/ml

Il dosaggio prevede l'elaborazione di una retta di calibrazione ottenuta analizzando campioni standard di 800 µl con contenuto di BSA variabile da 1 a 10 µg. Si aggiungono 200 µl di colorante, che si lega alla proteina nel giro di 2 min. garantendo una buona stabilità di colore per 1 ora.

Il valore dell'assorbanza è stato letto a 590 nm.

## **8. DOSAGGIO DEI POLIFENOLI**

E' stato effettuato con il reattivo di Folin-Ciocalteu (Jenning, 1981) impiegando i seguenti reagenti:

- Reattivo di Folin-Ciocalteu
- Soluzione di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20% in H<sub>2</sub>O
- Soluzione di acido gallico in H<sub>2</sub>O (1 mg/ml)

I campioni da saggiare (1ml) sono stati portati a 35 ml con H<sub>2</sub>O; a questi sono stati aggiunti 2,5 ml di reattivo di Folin-Ciocalteu e, dopo 3 min., 5 ml di soluzione di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20%. Dopo 30 min. la miscela è stata portata a 50 ml con H<sub>2</sub>O. La retta di taratura è stata ottenuta utilizzando una soluzione di acido gallico diluita 10 volte, prelevando volumi variabili da 0,5 a 5 ml corrispondenti a 50-500 µg di composto.

Sia per gli standard sia per i campioni le analisi sono state effettuate in triplo mediando i valori ottenuti.

Il valore dell'assorbanza è stato letto a 750 nm.

## **9. DOSAGGIO DEGLI ACIDI URONICI**

E' stato effettuato con il metodo di Blumenkrantz (1973) impiegando i seguenti reagenti:

- m-idrossidifenile allo 0,15% in NaOH 0,5%
- tetraborato sodico 0,0125 M in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrato
- acido glucuronico

Il dosaggio prevede l'elaborazione di una retta di calibrazione ottenuta analizzando campioni standard di 200 µl con contenuto di acido glucuronico variabile da 2 a 20 µg. A questi si aggiungono in un bagno di ghiaccio 1,2 ml di tetraborato sodico. Il campione dopo agitazione è riscaldato a 100°C per 5 min. Successivamente, raffreddati i campioni nel bagno di ghiaccio, si aggiungono 20 µl di m-idrossidifenile.

Il valore dell'assorbanza è stato letto a 520 nm.

## **10. DETERMINAZIONE DELLA COMPOSIZIONE IN FENOLI MEDIANTE OSSIDAZIONE CON CUO E CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA RISOLUZIONE (HPLC)**

### **10.1. Ossidazione del campione**

Per tale analisi sono state utilizzate fiale di vetro da 100 ml della Microglass nelle quali è stata posta la miscela di reazione composta dal campione da ossidare, Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, CuO e NaOH 2N.

Le fiale sono state chiuse mediante un tappo di gomma recante due fori: nel primo foro mediante un ago è insufflato azoto mentre nel secondo foro mediante un secondo ago, collegato ad un tubo di gomma a sua volta collegato ad una pompa da vuoto, viene aspirata l'aria presente nella fiala. Successivamente la fiala è chiusa alla fiamma e posta in stufa a 170°C per 2 ore.

### **10.2. Analisi HPLC**

Per tale analisi è stato utilizzato un apparecchio Perkin Elmer serie 410, munito di rivelatore UV a lunghezza d'onda variabile Perkin Elmer LC90 e di integratore Perkin Elmer LCI 100.

L'analisi HPLC è stata effettuata utilizzando una colonna Nucleosil C-18, 3  $\mu\text{m}$  (Machery and Nagel) di 250x4 mm della Delchimica. La miscela eluente aveva la seguente composizione:

A- 50 mM di tampone fosfato a pH 2 contenente il 10% di  $\text{CH}_3\text{CN}$

B-  $\text{CH}_3\text{CN}$  contenente il 30% di tampone fosfato a pH 2

Il programma di eluizione è mostrato nella B.

**Tabella B:** Programma di eluizione per la determinazione dei fenoli mediante HPLC

Step	Tempo (min.)	Eluente A%	Eluente B%	Flusso	Gradiente
1	0-20	100	0	0.9 ml/min.	Isocratico
2	20,1-30	85	15	0.9 ml/min.	Concavo (2)
3	30,1-40	85	15	0.9 ml/min.	Isocratico
4	40,1-42	70	30	0.9 ml/min.	Concavo (2)
5	42,1-50	70	30	0.9 ml/min.	Isocratico

La colonna, dopo la corsa, è stata lavata con l'eluente B per 10 min. e riequilibrata con l'eluente A per altri 15 min.

La rivelazione è stata effettuata impostando la lampada del rivelatore ad una lunghezza d'onda di 280 nm.

Per tale analisi sono stati utilizzati i seguenti standard con accanto in parentesi indicati i tempi di eluizione: idrossitirosolo (5.19), acido 3,5-OH

benzoico (5.29), acido 3,4 fenossiacetico (6.01), catecolo (7.84), p-tirosolo (8.64), acido 4-OH benzoico (9.68), acido vanillico (11.39), 4-OH benzaldeide (12.41), acido sirigico (14.40), acido 2,3-OH benzoico (14.55), vanillina (16.83), acido p-idrossifenilpropionico (17.24), metilcatecolo (17.91), siringaldeide (21.46), acido p-cumarico (31.59), acido ferulico (35.77) e acido salicilico (40.26).

## **11. DETERMINAZIONE DELLA COMPOSIZIONE AMMINOACIDICA**

E' stata effettuata presso il Dipartimento di Chimica Organica e Biologica della Facoltà di Scienze M.F.N. dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" utilizzando un analizzatore di amminoacidi System Gold della Beckman con colonna a scambio ionico in polivinilsolfonato della Pharmacia.

Per la determinazione quali-quantitativa sono stati utilizzati i seguenti aminoacidi a concentrazioni di 5 nmoli: acido aspartico (Asp), acido glutammico (Glu), cisteina (Cys) treonina (Thr), serina (Ser), prolina (Pro), glicina (Gly), alanina (Ala), valina (Val), metionina (Met), isoleucina (Ile), leucina (Leu), tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe), lisina (Lys), istidina (Hys) e arginina (Arg).

I campioni sono stati idrolizzati con HCl 6N per 20 ore. Dopo idrolisi i campioni sono stati seccati e ridisciolti in Na-citrato a pH 2,2.

La colonna, equilibrata con tampone Na-citrato 0,2 M a pH 3,2, prevede eluizione a step di pH in un tempo di 60 min. come illustrato nella Tabella C. La colonna dopo la corsa è lavata con tampone Na-citrato 1,2 M a pH 6,45 per 10 min. e nuovamente riequilibrata con Na-citrato 0,2 M a pH 3,2 per 10 min.

Tutti gli amminoacidi sono evidenziati con reazione postcolonna con la ninidrina con massimo di assorbimento a 570 nm mentre per la prolina a 440 nm. La camera di reazione è tenuta a una temperatura di 135°C.

Per treonina e tirosina durante l'idrolisi si hanno perdite del 5 % mentre per la serina del 10%, quindi i valori ottenuti sono stati maggiorati di queste perdite.

**Tabella C:** Programma di eluizione per la determinazione degli amminoacidi mediante analizzatore di amminoacidi

<b>Step</b>	<b>Tempo (min.)</b>	<b>Concentrazione tampone Na-citrato</b>	<b>pH</b>	<b>Flusso</b>
<b>1</b>	0-25	0,2 M	3.2	1 ml/min.
<b>2</b>	25,1-31	0,2 M	4.25	1 ml/min.
<b>3</b>	31,1-60	1,2M	6.45	1 ml/min.

## **12. DETERMINAZIONE DELLA COMPOSIZIONE MONOSACCARIDICA**

### **12.1. Purificazione su fase inversa RP-18 e su amberlite**

Gli zuccheri, neutri ed acidi, dopo idrolisi con HCl 2N per 4 ore o per un'intera notte sono stati purificati mediante eluizione con acqua sotto vuoto su colonna da 50 ml impaccata con fase inversa RP-18 della Merck. La colonna è stata lavata con acetonitrile ed equilibrata con acqua ultrapura.

Successivamente i campioni sono stati purificati mediante eluizione su colonna da 50 ml impaccata con amberlite IRA 410-D della Supelco. L'amberlite è stata lavata con acqua ultrapura, equilibrata con una soluzione di NaOH 2N e nuovamente lavata con acqua per allontanare l'eccesso di soda dopodiché è stato caricato il campione. Gli zuccheri neutri sono stati eluiti con acqua ultrapura, mentre quelli acidi con una soluzione di NaOH 1 M.

### **12.2. Analisi per HPAEC-PAD**

La determinazione degli zuccheri neutri e acidi è stata effettuata mediante cromatografia a scambio anionico ad alta efficienza (HPAEC)

utilizzando un apparecchio Dionex modello 4500 I, corredato di una colonna analitica Carbopac PA10 (Dionex) 4x250 mm, diametro 10  $\mu\text{m}$ , precolonna Carbopac PA10 (Dionex) e di un rivelatore ad impulso amperometrico (PAD).

Per la determinazione della composizione monosaccaridica sono stati impiegati i seguenti standard della Sigma Aldrich: arabinosio, xilosio, mannosio, galattosio, glucosio e ramnosio per la determinazione degli zuccheri neutri e acido glucuronico e galatturonico per quelli acidi.

Le curve di calibrazione per il dosaggio quantitativo dei carboidrati sono state ottenute riportando l'area del picco in funzione della concentrazione degli standard utilizzati, effettuando almeno 3 iniezioni da 20  $\mu\text{l}$  per ogni standard.

Il gradiente di eluizione degli zuccheri neutri è mostrato nella Tabella D.

Al termine dell'eluizione, per ottimizzare la stabilità della linea di base e la sensibilità del detector, prima della rivelazione si è avuta una addizione di post-colonna di NaOH 300 mM ad un flusso di 0,6  $\text{ml min}^{-1}$ .

Per gli zuccheri acidi l'eluizione in isocratica è avvenuta ad un flusso di 1  $\text{ml/min}$ . utilizzando una miscela composta da NaOH 100 mM e acetato di sodio 150 mM.

La colonna, dopo la corsa, è stata lavata con NaOH 150 mM per 10 min. e riequilibrata con NaOH 2 mM per altri 15 min.

**Tabella D:** Programma di eluizione per la determinazione degli zuccheri neutri mediante HPAEC-PAD

<b>STEP</b>	<b>TEMPO (min.)</b>	<b>ELUENTE</b>	<b>GRADIENTE</b>	<b>FLUSSO</b>
<b>1</b>	0-25	NaOH 2 mM	Isocratico	1 $\text{ml/min}$ .
<b>2</b>	25,1-30	NaOH 150 mM	Concavo	1 $\text{ml/min}$ .
<b>3</b>	30,1-40	NaOH 150 mM	Isocratico	1 $\text{ml/min}$ .

### **13. SPETTROSCOPIA AD ASSORBIMENTO ATOMICO (AAS)**

E' stata effettuata con uno spettrofotometro Perkin Elmer modello 3030 B.

I campioni da analizzare sono stati digeriti con una miscela di HNO<sub>3</sub>-HClO<sub>4</sub> in rapporto di 4:1 riscaldandoli su bagno di sabbia a 80°C; una volta seccati sono stati addizionati di una soluzione al 5% di HCl, filtrati su filtri Whatman n.40, Ø 12,5 cm e portati a 50 ml con acqua ultrapura.

### **14. TITOLAZIONE**

E' stata effettuata con un apparecchio Radiometer Copenhagen VIT 90 Video Tritator.

### **15. ANALISI UV-VIS**

Gli spettri UV-Vis delle varie sostanze in acqua ultrapura e tutte le letture spettrofotometriche sono state effettuate utilizzando uno spettrofotometro Perkin Elmer 550S.

### **16. ANALISI DRIFTS**

Le analisi DRIFTS (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy) sono state effettuate su uno spettrofotometro Perkin Elmer FT-IR 1720X.

La preparazione del campione richiede l'omogeneizzazione di 200 mg di KBr con 0,2 mg di campione da analizzare in un mortaio di agata.

### **17. REAZIONE CON DIAZOMETANO**

È stata effettuata con una soluzione eterea di diazometano (CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>) che dà una classica colorazione gialla. Il diazometano è stato aggiunto al

campione fino a persistenza della colorazione gialla di tutta la soluzione. La reazione in continua agitazione magnetica si lascia decorrere per il tempo desiderato interrompendola per evaporazione del solvente sotto corrente di azoto.

#### **18. CROMATOGRAFIA ANALITICA SU STRATO SOTTILE (TLC)**

E' stata eseguita in fase diretta su lastre di gel di silice (Merck, DC Fertigplatten Kieselgel F<sub>254</sub>, 0,25 mm) utilizzando come miscela eluente isopropanolo-acqua 8-2 (v:v). I cromatogrammi dopo eluizione sono stati osservati alla luce ultravioletta selezionata a 254 nm; successivamente essi sono stati rivelati spruzzandoli con una soluzione di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% in MeOH e poi con acido fosfomolibdico al 3% in EtOH, oppure con misto cromatico, a cui è seguito il riscaldamento in stufa a 100°C per 5 min.

#### **19. CROMATOGRAFIA A FASE INVERSA A BASSA PRESSIONE**

E' stata effettuata sotto vuoto su colonne da 150 ml impaccate con polvere a fase inversa C-18, 15-40 µm della Merck utilizzando una pompa a membrana della Edwards e a bassa pressione (3 bar) su colonne preimpaccate Lobar Lichroprep RP-18, 25-40 µm della Merck, da 150 ml utilizzando una pompa Duramat CFG della Prominent Electronic.

I campioni sono stati eluiti utilizzando un gradiente discontinuo H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN (0%, 50% e 100% di CH<sub>3</sub>CN).

#### **20. DETERMINAZIONE DEL PESO MOLECOLARE RELATIVO MEDIANTE CROMATOGRAFIA SU SETACCI MOLECOLARI**

E' stata effettuata utilizzando una colonna di dimensioni 60x1,5 cm impaccata con Biogel A, della Pharmacia.

Per tale analisi sono stati utilizzati standard di polistirene sulfonato, forniti dalla Chemtek, aventi peso molecolare medio rispettivamente di 990.000, 130.000, 48.600 e 8.600 Da.

I campioni e gli standard sono stati eluiti con NaCl 0,5 M. Tutte le frazioni ottenute sono state analizzate mediante assorbimento UV a 270 nm, utilizzando uno spettrofotometro UV Perkin Elmer 550S o Lambda 3B UV/VIS.

Per la costruzione della retta di calibrazione sono state raccolte e sommate le frazioni fino al massimo di assorbimento. In base ai volumi di eluizione di ognuna di esse è stata costruita una retta di calibrazione ponendo sull'asse delle ascisse il rapporto  $V_e/V_o$  e su quello delle ordinate il logaritmo del peso molecolare. L'equazione della retta che si è ottenuta è la seguente

$$\log pmr = 1,356V_e/V_o - 6,68.$$

$V_e$ =volume di eluizione

$V_o$ = volume morto

## **21. ULTRAFILTRAZIONE**

Il sistema di ultrafiltrazione della Amicon è composto di un serbatoio da 5 litri tenuto sotto pressione di azoto e una cella di ultrafiltrazione da 200 ml corredata di una membrana della Amicon con cut-off da 3.000 Da e di una ancoretta magnetica. La cella di ultrafiltrazione è stata tenuta ad una pressione di 3-4 atm. mediante azoto. L'eluizione di tutti i campioni è avvenuta utilizzando acqua ultrapura. Il processo è stato fermato quando non erano più rivelati metalli nel permeato per AAS. Quindi è stato recuperato il non permeato.

## **22. SAGGI DI ATTIVITÀ FITOTOSSICA**

Tutti i saggi sono stati effettuati su piantine cotiledonari di pomodoro con apparato radicale reciso della varietà Marmande allo stadio di seconda foglia vera per una durata totale di 4 giorni al termine del quale è stato verificato rispetto al controllo l'appassimento, l'avvizzimento o l'integrità delle piantine.

### **23. SAGGI DI ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE**

Sono stati svolti presso il laboratorio del Prof. V. Lattanzio dell'Istituto di Orticoltura e Colture Industriali-CNR, Area di Ricerca di Potenza effettuando 3 tipi di test:  $\beta$ -carotene/linoleato, deossiribosio e della metamioglobina.

Il test del  $\beta$ -carotene/linoleato (Lee et al., 1995) si basa sull'ossidazione accoppiata del  $\beta$ -carotene e dell'acido linoleico. 0,3 mg di  $\beta$ -carotene in 1 ml di cloroformio sono posti in un pallone a cui vengono aggiunti 40 mg di acido linoleico e 400 mg di Tween 40. Allontanato il cloroformio, sotto pressione ridotta in evaporatore rotante a 40°C, vengono aggiunti 100 ml di acqua distillata arricchita di O<sub>2</sub>. 1,5 ml di tale emulsione è aggiunta al campione da saggiare. La miscela è incubata a 50°C per 50 min. L'ossidazione del  $\beta$ -carotene è stata monitorata spettrofotometricamente misurando l'assorbanza a 470 nm ad intervalli di 1,5 min.

Nel test del deossiribosio (Hagerman et al., 1998) le reazioni sono condotte in tampone fosfato 10 mM a pH 7,4 a cui vengono aggiunti deossiribosio 2,8 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 28 mM, FeCl<sub>3</sub> 25  $\mu$ M, EDTA 100  $\mu$ M ed il composto da saggiare. La reazione di ossidazione è innescata con acido ascorbico 100  $\mu$ M. Dopo incubazione a 37°C per 1 h è aggiunto acido tiobarbiturico e successivamente acido tricloroacetico. La miscela di reazione è nuovamente incubata a 100°C per 20 min. sviluppa un cromoforo rosa che è estratto con n-butanolo. L'assorbanza è misurata a 532 nm confrontandola con un controllo privo di sostanza antiossidante.

Il test della metamioglobina è stata effettuato con il metodo di Hagerman et al. (1998) miscelando 2 mg/ml di mioglobina con 2 ml ferrocianuro di potassio 0,73 mM per la preparazione della metamioglobina. Il miscuglio è caricato su una colonna Sephadex G-10 (20x1 cm) equilibrata con tampone fosfato 0,05 M a pH 7,4 contenente NaCl 0,145 M. La concentrazione e la purezza della metamioglobina, nel primo picco di eluizione, sono misurati spettrofotometricamente (Whitburn et. al., 1982). Il miscuglio di reazione in un volume finale di 1,2 ml, contiene 1,67  $\mu\text{M}$  di metamioglobina, 100  $\mu\text{M}$  di ABTS ed il composto da saggiare. La reazione di ossidazione è innescata aggiungendo 50  $\mu\text{M}$  di  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Dopo 3 min. si misurano i valori di assorbanza a 734 nm i quali vengono confrontati con quelli relativi al trolox quale antiossidante standard.

## **1. RECUPERO DELLA FRAZIONE POLIMERICA ORGANICA DENOMINATA POLIMERINA $\mathbf{K}$ (PLM $\mathbf{K}$ ) E SUA CARATTERIZZAZIONE CHIMICA**



Aliquote di plmK da 5 e 10  $\mu\text{g}$ , in tre repliche, sono state utilizzate per il dosaggio delle proteine con il metodo Bradford.

I campioni da saggiare sono stati preparati alle seguenti concentrazioni:

PlmK	5 $\mu\text{g}$ in 5 $\mu\text{l}$ di $\text{H}_2\text{O}$
PlmK	10 $\mu\text{g}$ in 10 $\mu\text{l}$ di $\text{H}_2\text{O}$

I risultati sono mostrati in Tabella I.

### **1.2.3. Dosaggio dei polifenoli con il reattivo di Folin-Ciocalteu**

Aliquote di plmK di 100 e 200  $\mu\text{g}$ , in tre repliche, sono state utilizzate per il dosaggio dei polifenoli utilizzando il reattivo di Folin-Ciocalteu.

I campioni da saggiare sono stati preparati alle seguenti concentrazioni:

PlmK	100 $\mu\text{g}$ in 100 $\mu\text{l}$ di $\text{H}_2\text{O}$
PlmK	200 $\mu\text{g}$ in 200 $\mu\text{l}$ di $\text{H}_2\text{O}$

I risultati sono mostrati in Tabella I.

## **1.3. DETERMINAZIONE DELLA COMPOSIZIONE MONOSACCARIDICA DELLA PLMK**

### **1.3.1. Idrolisi e purificazione degli zuccheri neutri**

100 mg di plmK sono stati idrolizzati con 10 ml di HCl 2N per 4 ore a ricadere.

La soluzione dopo raffreddamento è stata purificata sotto vuoto su colonna da 50 ml impaccata con fase inversa RP-18 usando come eluente 200 ml di acqua ultrapura. Questi sono stati concentrati a pressione ridotta fino a 10 ml e caricati su colonna di amberlite (50 ml) usando come eluente 200 ml di acqua ultrapura. Anche questi sono stati concentrati a pressione ridotta fino a 10 ml.

L'eluizione degli zuccheri su RP-18 e su amberlite è stata monitorata effettuando controlli cromatografici per TLC utilizzando come miscela

eluente una soluzione di isopropanolo-acqua 8-2 e come rivelatore sia  $H_2SO_4$  seguito da acido fosfomolibdico e sia con misto cromatico.

### **1.3.2. Analisi per HPAEC-PAD degli zuccheri neutri**

Gli standard utilizzati e le condizioni analitiche per tale analisi sono riportate nella sezione Materiali e Metodi (par.12.2. e Tabella D)

Sia il campione proveniente da purificazione su amberlite (par.1.3.1.) che gli standard ad una concentrazione di 1 mg/ml sono stati previamente filtrati su filtri da 0,45  $\mu m$  e successivamente analizzati mediante HPAEC-PAD effettuando iniezioni da 20  $\mu l$ .

La composizione in monosaccaridi neutri della componente polisaccaridica della plmK è mostrata nella Tabella II.

### **1.3.3. Idrolisi e purificazione degli zuccheri acidi**

100 mg di plmK sono stati idrolizzati con 10 ml di HCl 2N per 4 ore a ricadere.

La soluzione dopo raffreddamento è stata purificata sotto vuoto su colonna da 50 ml impaccata con fase inversa RP-18 usando come eluente 200 ml di acqua ultrapura. Questi sono stati concentrati a pressione ridotta fino a 10 ml e successivamente caricati su colonna di amberlite (50 ml) usando come eluente 200 ml di acqua ultrapura per allontanare gli zuccheri neutri e successivamente con 200 ml di NaOH 1N per recuperare gli zuccheri acidi. Questi sono stati concentrati sotto pressione ridotta a 10 ml.

### **1.3.4. Analisi per HPAEC-PAD degli zuccheri acidi**

Gli standard utilizzati e le condizioni analitiche per tale analisi sono riportate nella sezione Materiali e Metodi (par. 12.2)

20  $\mu l$  di campione proveniente da eluizione su amberlite (1.3.4) e di standard sono stati analizzati per HPAEC-PAD effettuando almeno 3 iniezioni.

La composizione in monosaccaridi acidi della componente polisaccaridica della plmK è mostrata nella Tabella II.

#### **1.4. DETERMINAZIONE DELLA COMPOSIZIONE AMMINOACIDICA DELLA PLMK**

1 mg di plmK è stato idrolizzato con 400 µl di HCl 6N a 110°C per 20 ore.

Il campione dopo idrolisi è stato seccato e ripreso in 1 ml di tampone Na-citrato 0,2 M a pH 2,2. Per la determinazione della composizione amminoacidica 100 µl di campione sono stati analizzati mediante un analizzatore di amminioacidi corredato di colonna a scambio ionico.

Le condizioni analitiche per la separazione degli amminoacidi sono riportate nella sezione Materiali e Metodi (Par.11 e Tabella C).

La composizione amminoacidica della componente proteica della plmK è mostrata nella Tabella III.

#### **1.5. DETERMINAZIONE QUALITATIVA DELLA COMPOSIZIONE IN FENOLI DELLA PLMK**

##### **1.5.1. Reazione di ossidazione con CuO e purificazione della componente fenolica**

E' stata eseguita in accordo da quanto descritto da Perez J. et al. (1987) miscelando 50 mg di plmK con 50 mg di  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 250 di CuO e 15 ml di NaOH 2N.

La miscela di reazione è stata tenuta in stufa a 170°C per 2 ore. Dopo raffreddamento la sospensione è centrifugata a 10.000 g per 30 min. Il surnatante è stato allontanato mentre il precipitato è stato ripreso nuovamente con acqua (10 ml) e ricentrifugato. I due surnatanti riuniti sono stati acidificati a pH 2 con HCl 6N, tenuti a temperatura ambiente sotto agitazione per 1 ora e ricentrifugati. Si recupera il surnatante che è

stato estratto con etere etilico (4x30 ml) per recuperare i fenoli. La fase organica è stata anidrificata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ed evaporata a pressione ridotta fornendo un residuo di 3,2 mg.

### **1.5.2. Analisi qualitativa per HPLC**

Gli standard utilizzati e le condizioni analitiche per tale analisi sono riportate nella sezione Materiali e Metodi (par. 10.2 e Tabella B)

Sia il campione che la miscela di standard ad una concentrazione di 1 mg/ml sono stati previamente filtrati su filtri da 0,45 µm e successivamente caricati su colonna HPLC effettuando iniezioni da 20 µl.

La composizione qualitativa della componente fenolica della plmK è mostrata in Tabella IV e Figura 1.

## **1.6. ANALISI DELLA COMPONENTE METALLICA DELLA PLMK MEDIANTE SPETTROSCOPIA AD ASSORBIMENTO ATOMICO (AAS)**

100 mg di plmK, digeriti come mostrato nella sezione Materiali e Metodi (Par.13.), sono stati analizzati per AAS.

I risultati sono mostrati in Tabella V

## **1.7. TITOLAZIONE POTENZIOMETRICA DELLA PLMK**

50 mg di plmK sciolti in 20 ml di acqua ultrapura sono stati portati a pH 12 con una soluzione di NaOH 2M e successivamente retrotitolati con una soluzione di HCl 0,05 M.

I risultati sono mostrati in Tabella VI.

## **1.8. ANALISI SPETTROSCOPICHE DELLA PLMK**

### **1.8.1. Spettro di assorbimento UV della plmK**

Lo spettro di assorbimento UV della plmK registrato in H<sub>2</sub>O presentava un massimo di assorbimento a 470 nm e un assorbimento in forma di spalla a 270 nm (Tabella VI).

### **1.8.2. Spettro DRIFT della plmK**

Lo spettro DRIFT della plmK effettuato come riportato nella sezione Materiali e Metodi (Par. 16) è mostrato in Figura 5 ed in Tabella VI.

## **1.9. DETERMINAZIONE DEL PESO MOLECOLARE RELATIVO DELLA PLMK SU BIOGEL A**

### **1.9.1. Preparazione della retta di calibrazione**

Per tale analisi 5 mg di standard di polistirene sulfonato a diverso peso molecolare (vedi Sezione Materiali e Metodi par. 20) sciolti in 1 ml di una soluzione di NaCl 0,5 M sono stati caricati su colonna impaccata con Biogel A raccogliendo frazioni da circa 1,5 ml, eluite ad un flusso di 1,5 ml/4 min. con NaCl 0,5 M; tutti gli standard sono stati analizzati allo spettrofotometro UV a 270 nm presentando il massimo di assorbimento con i seguenti volumi di eluizione:

Standard 990.000 Da	Vo= 32 ml
Standard 130.000 Da	Ve= 36 ml
Standard 48.600 Da	Ve= 49 ml
Standard 8.600 Da	Ve= 64 ml

In base a tali valori è stata costruita la retta di calibrazione:

$$\log p_{mr} = 1,356V_e/V_o - 6,68$$

### **1.9.2. Determinazione del peso molecolare relativo della plmK**

5 mg di plmK sciolti in 1 ml di una soluzione di NaCl 0,5M sono stati caricati su colonna impaccata con Biogel A. Sono state raccolte 80 frazioni da 1,5 ml eluite ad un flusso di 1,5 ml/4 min. con NaCl 0,5 M; tutte le frazioni sono state analizzate allo spettrofotometro UV a 270 nm.

Si ottenevano 2 massimi di assorbimento con i seguenti volumi di eluizione:

1° massimo                       $V_e = 28$  ml

2° massimo                       $V_e = 62$  ml

Il cromatogramma è illustrato in Figura 6.

#### **1.10. DETERMINAZIONE DELLA DISTRIBUZIONE DELLA COMPONENTE ORGANICA DELLA PLMK IN FUNZIONE DEL PESO MOLECOLARE RELATIVO SU BIOGEL A.**

5 mg di plmK sciolti in 1 ml di una soluzione di NaCl 0,5M sono stati caricati su Biogel A ed eluiti con NaCl 0,5 M. Sono state raccolte 80 frazioni da 1,5 ml eluite ad un flusso di 1,5 ml/4 min.. Tutte le frazioni sono state analizzate mediante spettrofotometria UV a 270 nm e mediante analisi chimiche, effettuando il saggio dell'antrone per la determinazione della distribuzione della componente polisaccaridica, il dosaggio delle proteine con il metodo Bradford per la determinazione della distribuzione della componente proteica, il dosaggio degli acidi uronici con il m-idrossidifenile per la determinazione degli zuccheri acidi e il dosaggio dei polifenoli con il reattivo di Folin-Ciocalteu per la determinazione della distribuzione della componente polifenolica.

I picchi ottenuti dall'analisi chimica e spettroscopica hanno mostrato i seguenti volumi di eluizione.

1° massimo                       $V_e = 28$  ml

2° massimo                       $V_e = 39$  ml

3° massimo                       $V_e = 62$  ml

4° massimo                       $V_e = 75$  ml

Inserendo i valori ottenuti nell'equazione  $\log y = 1,356V_e/V_o - 6,68$  si sono ottenuti i seguenti pesi molecolari relativi:

1° massimo                       $V_e \geq 500$  kDa

2° massimo                       $V_e = 100$  kDa

3° massimo                       $V_e = 11,3$  kDa

4° massimo

$V_e=2$  kDa

La distribuzione di tutte le componenti è stata riportata sullo stesso grafico come mostrato in Figura 6.

### **1.11. DETERMINAZIONE DELLA DISTRIBUZIONE DELLA COMPONENTE ORGANICA DELLA PLMK SU FASE INVERSA RP-18**

10 mg di plmK sciolti in 1 ml di acqua ultrapura sono stati caricati su colonna Lichroprep RP-18 di dimensione 31x2,5 cm eluendola, a bassa pressione, con un gradiente discontinuo H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN (0%, 50% e 100% di CH<sub>3</sub>CN) per un totale di 3 step da 150 ml ciascuno. Sono state raccolte 90 frazioni 5 ml che sono state analizzate allo spettrofotometro UV a 270 nm e mediante analisi chimiche effettuando il saggio dell'antrone per la determinazione della distribuzione della componente polisaccaridica, il dosaggio degli acidi uronici con il m-idrossidifenile per la determinazione degli zuccheri acidi, il dosaggio delle proteine con il metodo Bradford per la determinazione della distribuzione della componente proteica e il dosaggio dei polifenoli con il reattivo di Folin-Ciocalteu per quella polifenolica.

La distribuzione di tutte le componenti è stata riportata sullo stesso grafico come mostrato in Figura 7.

## **2. PREPARAZIONE DELLA POLIMERINASDK (PLMSDK) E SUA CARATTERIZZAZIONE CHIMICA**

## **2.1. IDROLISI DELLA PLMK**

100 mg di plmK (Par. 1.1.2) sono stati idrolizzati con 10 ml di una soluzione di HCl 2N a ricadere per 4 ore. Dopo raffreddamento la soluzione contenente un prodotto rosso-bruno precipitato nel corso dell'idrolisi è stata centrifugata a 10.000 g per 30 min. Il precipitato insolubile in acqua è stato successivamente ridisciolti con una soluzione di KOH 2N e dializzato contro acqua ultrapura in membrane con cut-off di 3500 Da per allontanare l'eccesso di base effettuando cambi di acqua fino a neutralità del permeato.

Tale prodotto denominato polimerinaSDK (plmSDK=sale di potassio della polimerina deglicosilata) è stato liofilizzato dando un residuo di 43 mg (Schema 2).

Per accumulare prodotto tale operazione è stata eseguita diverse volte.

## **2.2. CARATTERIZZAZIONE CHIMICA DELLA PLMSDK**

### **2.2.1. Dosaggio delle proteine con il metodo Bradford**

Aliquote di campione da 5-10 µg di plmSDK, in tre repliche, sono state utilizzate per il dosaggio delle proteine con il metodo Bradford.

I campioni da saggiare sono stati preparati alle seguenti concentrazioni:

PlmSDK	5 µg in 5 µl di H <sub>2</sub> O
PlmSDK	10 µg in 10 µl di H <sub>2</sub> O

I risultati sono mostrati in Tabella VII.

### **2.2.2. Dosaggio degli zuccheri con l'antrone**

Aliquote di campione da 10-20 µg di plmSDK, in tre repliche, sono state utilizzate per il dosaggio dei carboidrati con l'antrone.

I campioni da saggiare sono stati preparati alle seguenti concentrazioni:

PlmSDK 10 µg in 10 µl di H<sub>2</sub>O

PlmSDK 20 µg in 50 µl di H<sub>2</sub>O

I risultati sono mostrati in Tabella VII.

### **2.2.3. Dosaggio dei polifenoli con il reattivo di Folin-Ciocalteu**

Aliquote di campione da 100 e 200 µg di plmSDK, in tre replicazioni, sono state utilizzate per il dosaggio dei polifenoli utilizzando il reattivo di Folin-Ciocalteu.

I campioni da saggiare sono stati preparati alle seguenti concentrazioni:

PlmSDK 100 µg in 100 µl di H<sub>2</sub>O

PlmSDK 200 µg in 200 µl di H<sub>2</sub>O

I risultati sono mostrati in Tabella VII.

## **2.3. DETERMINAZIONE DELLA COMPOSIZIONE IN MONOSACCARIDI DELLA PLMSDK**

### **2.3.1. Idrolisi e purificazione degli zuccheri neutri**

100 mg di plmSDK sono stati idrolizzati con 10 ml di HCl 2N a ricadere per tutta la notte.

La purificazione degli zuccheri neutri è stata effettuata come riportato per la plmK nel par. 1.3.1

### **2.3.2. Analisi per HPAEC-PAD degli zuccheri neutri**

E' stata eseguita come riportato per la plmK nel par. 1.3.2.

La composizione in monosaccaridi neutri è mostrata in Tabella IX.

### **2.3.3. Idrolisi e purificazione degli zuccheri acidi**

100 mg di plmSDK sono stati idrolizzati con 10 ml di HCl 2N a ricadere per tutta la notte.

La purificazione degli zuccheri acidi è stata effettuata come riportato per la plmK nel par. 1.3.3

#### **2.3.4. Analisi per HPAEC-PAD degli zuccheri acidi**

E' stata eseguita come riportato per la plmK nel par. 1.3.4.

La composizione in monosaccaridi acidi è mostrata in Tabella IX.

#### **2.4. DETERMINAZIONE DELLA COMPOSIZIONE AMMINOACIDICA DELLA PLMSDK**

1 mg di plmSDK è stata trattato come precedentemente riportato per la plmK nel par. 1.4

Le condizioni analitiche per la separazione degli amminoacidi sono riportate nella sezione Materiali e Metodi (Par. 11 e Tabella C).

La composizione amminoacidica della componente proteica della plmSDK è mostrata in Tabella VIII.

#### **2.5. DETERMINAZIONE QUALITATIVA DELLA COMPOSIZIONE IN FENOLI DELLA PLMSDK**

E' stata eseguita come riportato per la plmK nei paragrafi 1.5.1 e 1.5.2.

I risultati sono mostrati in Tabella IV e Figura 1.

#### **2.6. ANALISI DELLA COMPOSIZIONE METALLICA DELLA PLMSDK PER AAS**

100 mg di plmSDK, digeriti come illustrato nella sezione Materiali e Metodi (Par. 13), sono stati analizzati per AAS.

I risultati sono mostrati in Tabella X.

#### **2.7. TITOLAZIONE POTENZIOMETRICA DELLA PLMSDK**

50 mg di plmSDK sciolti in 20 ml di acqua ultrapura sono stati portati a pH 12 con una soluzione di NaOH 2M e successivamente retrotitolati con una soluzione di HCl 0,05 M.

I risultati sono mostrati in Tabella XI

## **2.8. ANALISI SPETTROSCOPICHE DELLA PLMSDK**

### **2.8.1. Spettro di assorbimento UV della plmSDK**

Lo spettro di assorbimento UV della plmSDK, registrato in H<sub>2</sub>O ha presentato un massimo di assorbimento a 470 nm e un assorbimento in forma di spalla a 270 nm.

I risultati sono mostrati in Tabella XI

### **2.8.2. Spettro DRIFT della plmSDK**

Lo spettro DRIFT della plmSDK, effettuato come riportato nella sezione Materiali e Metodi (Par. 16), è riportato in Figura 8a ed in Tabella XI.

### **2.8.3. Reazione con diazometano della plmSDK e analisi DRIFTS**

5 mg di plmSDK in 1 ml di MeOH vengono fatti reagire con una soluzione eterea di CH<sub>2</sub>CN<sub>2</sub> (sezione Materiali e Metodi Par. 17). Il prodotto della reazione denominato plmDCH<sub>3</sub> è stato successivamente analizzato mediante spettroscopia DRIFT.

I risultati sono mostrati in Tabella XII ed in Figura 9a.

## **2.9. DETERMINAZIONE DEL PESO MOLECOLARE RELATIVO DELLA PLMSDK SU BIOGEL A.**

La retta di calibrazione è stata ottenuta come riportato per la plmK nel par. 1.9.1

5 mg di plmSDK sciolti in 1 ml di una soluzione di NaCl 0,5M sono stati caricati su colonna impaccata con Biogel A. Sono state raccolte 70

frazioni da 1,5 ml eluite con NaCl 0,5 M ad un flusso di 1,5 ml/4 min.; tutte le frazioni sono state analizzate allo spettrofotometro UV a 270 nm. Si è ottenuto un singolo picco con un volume di eluizione di 68 ml. Sostituendo tale valore nell'equazione  $\log p_{mr} = 1,356V_e/V_o - 6,68$  si è ottenuto un peso molecolare relativo di 6300 Da.

Il cromatogramma è mostrato in Figura 10.

#### **2.10. DETERMINAZIONE DELLA DISTRIBUZIONE DELLA COMPONENTE ORGANICA IN FUNZIONE DEL PESO MOLECOLARE RELATIVO DELLA PLMDK SU BIOGEL A.**

5 mg di plmSDK, sciolti in 1 ml di una soluzione di NaCl 0,5 M, sono stati caricati su Biogel A ed eluiti con NaCl 0,5 M. Sono state raccolte 70 frazioni da 1,5 ml eluite ad un flusso di 1,5 ml/4 min.; tutte le frazioni sono state analizzate mediante spettrofotometria UV a 270 nm e mediante analisi chimiche, effettuando il saggio dell'antrone per la determinazione della distribuzione della componente polisaccaridica, il dosaggio delle proteine con il metodo Bradford per la determinazione della distribuzione della componente proteica, il dosaggio degli acidi uronici con il m-idrossidifenile per la determinazione degli zuccheri acidi e il dosaggio dei polifenoli con il reattivo di Folin-Ciocalteu per la determinazione della distribuzione della componente polifenolica.

Si è ottenuto un singolo picco con un volume di eluizione di 68 ml corrispondente ad un peso molecolare di 6300 Da.

La distribuzione di tutte le componenti è stata riportata sullo stesso grafico come mostrato in Figura 10.

#### **2.11. DETERMINAZIONE DELLA DISTRIBUZIONE DELLA COMPONENTE ORGANICA DELLA PLMSDK SU COLONNA A FASE INVERSA C-18.**

10 mg di plmSDK sciolti in 1 ml di acqua ultrapura sono stati caricati su colonna Lichroprep RP-18 di dimensione 31x2,5 cm eluendola, a

bassa pressione, con un gradiente discontinuo H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN (0%, 50% e 100% di CH<sub>3</sub>CN) per un totale di 3 step da 150 ml ciascuno. Sono state raccolte 90 frazioni 5 ml che sono state analizzate allo spettrofotometro UV a 270 nm e mediante analisi chimiche effettuando il saggio dell'antrone per la determinazione della distribuzione della componente polisaccaridica, il dosaggio degli acidi uronici con il m-idrossidifenile per la determinazione degli zuccheri acidi, il dosaggio delle proteine con il metodo Bradford per la determinazione della distribuzione della componente proteica e il dosaggio dei polifenoli con il reattivo di Folin-Ciocalteu per quella polifenolica.

La distribuzione di tutte le componenti organiche è stata riportata sullo stesso grafico come mostrato in Figura 11a.

### **3. PREPARAZIONE DELLA POLIGMENTINA $\beta$ K (PLG $\beta$ K) E SUA CARATTERIZZAZIONE CHIMICA**

### **3.1. Preparazione della plg $\beta$ K**

1 g di plmK (Par. 1.1.2) sono stati eluiti su colonna da 150 ml impaccata con 10 g di polvere a fase inversa C-18, eluendo prima con acqua ultrapura fino a quando nell'eluato non si è osservato più alcun prodotto (colore bianco della soluzione e successiva concentrazione sotto vuoto mediante pompa da vuoto) e successivamente con una soluzione di acqua:acetonitrile 50:50. Si sono ottenuti 100 mg di un prodotto bruno denominato poligmentina $\beta$ K (plg $\beta$ K).

### **3.2. DETERMINAZIONE DELLA DISTRIBUZIONE DELLE COMPONENTI ORGANICHE DELLA PLG $\beta$ K IN FUNZIONE DEL PESO MOLECOLARE RELATIVO**

5 mg di plg $\beta$ K sono stati caricati su Biogel A ed eluiti con NaCl 0,5 M. Sono state raccolte 60 frazioni da 1,5 ml eluite ad un flusso di 1,5 ml/4 min.. Tutte le frazioni sono state analizzate mediante spettrofotometria UV a 270 nm e mediante analisi chimiche, effettuando il saggio dell'antrone per la determinazione della distribuzione della componente polisaccaridica, il dosaggio delle proteine con il metodo Bradford per la determinazione della distribuzione della componente proteica, il dosaggio degli acidi uronici con il m-idrossidifenile per la determinazione degli zuccheri acidi e il dosaggio dei polifenoli con il reattivo di Folin-Ciocalteu per la determinazione della distribuzione della componente polifenolica.

Si è ottenuto 1 massimo di assorbimento con 62 ml corrispondente ad un peso molecolare di 11300 Da.

La distribuzione di tutte le componenti è stata riportata sullo stesso grafico come mostrato in Figura 17.

## **4. REAZIONI DI SCAMBIO DELLA PLMK E DELLA PLMSDK E VALUTAZIONE DEL POTENZIALE IMPIEGO COME DECONTAMINANTI E BIOFILTRO**

### **4.1. REAZIONI DI SCAMBIO DELLA PLMK**

Per questa analisi sono stati utilizzati i cloruri di sodio, rame, ferro, zinco, manganese, alluminio preparando singolarmente per ogni metallo soluzioni sature miscelate con il campione da analizzare.

100 mg di plmK (Par. 1.1.2) sono stati trattati separatamente con 10 ml di una soluzione satura di NaCl, CuCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, AlCl<sub>3</sub> e FeCl<sub>3</sub>. Tutte le soluzioni a pH 1, tranne per il sodio a pH 6,5, sono state tenute in agitazione continua a temperatura ambiente per 24 ore. Successivamente sono state sottoposte a ultrafiltrazione con H<sub>2</sub>O ultrapura, utilizzando una cella da 200 ml e membrane con limite di esclusione di 3000 Da.

L'andamento dell'ultrafiltrazione è stato monitorato mediante AAS fermando il processo quando nel permeato non si è evidenziato più alcun metallo. Al termine del processo il non permeato è stato rimosso e liofilizzato. I pesi sono illustrati in Tabella XIII.

Le polimerine derivate dallo scambio (polimerineMe o plmMe) sono state denominate polimerinaNa (plmNa=saturata con il sodio), polimerinaFe (plmFe=saturata con il ferro), polimerinaCu (plmCu =saturata con il rame), polimerinaZn (plmZn=saturata con lo zinco), polimerinaMn (plmMn=saturata con il manganese) e polimerinaAl (plmAl=saturata con l'alluminio).

Una aliquota di tutti i campioni corrispondente a 20 mg è stata mineralizzata ed analizzata per AAS.

I dati sono riportati in Tabella XIV.

#### **4.2. SPETTRI DRIFT DELLA PLMK E DELLE PLMME DERIVATE**

I dati e gli spettri DRIFT delle plmMe (Me=Na<sup>+</sup>, Fe<sup>+3</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Zn<sup>+2</sup>, Mn<sup>+2</sup> e Al<sup>+3</sup>) ottenute dallo scambio sono mostrati in Figura 18 ed in Tabella XV

#### **4.3. REAZIONI DI SCAMBIO DELLA PLMSDK**

Sono stati utilizzati i cloruri di rame, ferro, zinco, manganese, alluminio preparando singolarmente per ogni metallo soluzioni sature miscelate con il campione da analizzare.

100 mg di plmSDK (Par. 2.1) sono stati trattati separatamente con 10 ml di una soluzione satura di  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{AlCl}_3$  e  $\text{FeCl}_3$  seguendo la stessa procedura descritta per le plmMe (par. 4.1.)

Al termine del processo il non permeato era rimosso, liofilizzato e seccato. I pesi sono mostrati in Tabella XIII.

Le polimerine derivate dallo scambio plmSDMe sono state denominate polimerinSDFe (plmSDFe= saturata con il ferro), polimerinaSDCu (plmSDCu=saturata con il rame), polimerinaSDZn (plmSDZn=saturata con lo zinco), polimerinaSDMn (plmSDMn=saturata con il manganese) e polimerinaSDAl (plmSDAl=saturata con l'alluminio).

Una aliquota di tutti i campioni corrispondente a 20 mg è stata mineralizzata ed analizzata per AAS. I dati relativi sono riportati in Tabella XVI.

#### **4.4. SPETTRI DRIFT DELLA PLMSDK E DELLE PLMSDME DERIVATE**

I dati DRIFTS della plmSDMe (Me= $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  e  $\text{Al}^{+3}$ ) sono mostrati in Figura 19 ed in Tabella XV.

#### **4.5. ESPERIMENTI PER VALUTARE L'ATTIVITÀ DI BIOFILTRO DELLA PLMK**

100 mg di plmK (Par. 1.1.2) sono stati trattati con 10 ml di acque marine in agitazione continua a temperatura ambiente per 24 ore. La soluzione è stata successivamente sottoposta a ultrafiltrazione in una cella da 200 ml con membrane con limite di esclusione di 3000 Da. L'eluizione è avvenuta con  $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura.

L'andamento dell'ultrafiltrazione è stato monitorato mediante AAS fermando il processo quando nel permeato non si evidenziava più alcun metallo.

Al termine del processo il non permeato era rimosso e liofilizzato ottenendone 98 mg.

20 mg di tale prodotto, denominato polimerinaSea (plmSea), sono stati mineralizzati ed analizzati per AAS. I dati relativi sono riportati in Tabella XX.

#### **4.6. ESPERIMENTI PER VALUTARE L'ATTIVITÀ DECONTAMINANTE SIMULATA DELLA PLMK**

100 mg di plmK (Par. 1.1.2) sono stati trattati con 10 ml di una soluzione contenente 2.2 mg di CuCl<sub>2</sub>, 2.2 mg di ZnCl<sub>2</sub>, 2.2 mg di MnCl<sub>2</sub>, 2.2 mg di AlCl<sub>3</sub> e 2.2 mg di FeCl<sub>3</sub> per un totale di 11 mg in modo da avere la stessa quantità di metalli avuta dalla plmK tal quale. La soluzione è tenuta in agitazione continua a temperatura ambiente per 24 ore. La soluzione è stata successivamente sottoposta a ultrafiltrazione in una cella da 200 ml con membrane con limite di esclusione di 3000 Da. L'eluizione è avvenuta con H<sub>2</sub>O ultrapura.

L'andamento dell'ultrafiltrazione è stato monitorato mediante AAS fermando il processo quando nel permeato non si evidenziava più alcun metallo.

Al termine del processo il non permeato era rimosso e liofilizzato ottenendone 96 mg.

20 mg di tale prodotto, denominato polimerinaMix (plmMix), sono stati mineralizzati ed analizzati per AAS. I dati relativi sono riportati in Tabella XIX.

### **5. CARATTERIZZAZIONE BIOLOGICA E BIOCHIMICA DELLA PLMK, DELLE PLMME, DELLA PLMSDK, DELLE PLMSDME, DELLA PLMSEA, DELLA PLMMIX E DELLA PLGβK**

#### **5.1. SAGGI DI ATTIVITÀ FITOTOSSICA**

### **5.1.1. Saggi di attività fitotossica della plmK e delle plmMe**

I saggi di attività fitotossica sono stati effettuati presso il laboratorio del Prof. G. Cristinzio del Dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II".

5 mg ed 1 mg di plmK e delle plmMe in 1 ml di acqua ultrapura sono stati sottoposti a saggi di attività fitotossica su piantine cotiledonari di pomodoro della varietà Marmande allo stadio di seconda foglia vera con apparato radicale reciso a temperatura di 24°C.

I risultati sono mostrati in Tabella XVII

### **5.1.2. Saggi di attività fitotossica della plmSDK e delle plmSDMe**

1 mg e 0,2 mg di plmSDK e delle plmSDMe in 1 ml di acqua ultrapura sono stati sottoposti a saggi di attività fitotossica su piantine cotiledonari di pomodoro della varietà Marmande allo stadio di seconda foglia vera con apparato radicale reciso a temperatura di 24°C.

I risultati sono mostrati in Tabella XVIII.

### **5.1.3. Saggi di attività fitotossica della plmMix e della plmSea**

5 mg ed 1 mg di plmMix e di plmSea in 1 ml di acqua ultrapura sono stati sottoposti a saggi di attività fitotossica su piantine cotiledonari di pomodoro della varietà Marmande allo stadio di seconda foglia vera con apparato radicale reciso a temperatura di 24°C.

I risultati sono mostrati in Tabella XXI

## **5.2. SAGGI DI ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DELLA PLMK, DELLA PLMSDK E DELLA PLGβK**

Tutti i saggi di attività antiossidante sono stati svolti presso il laboratorio del Prof. V. Lattanzio dell'Istituto di Orticoltura e Colture Industriali-CNR, Area di Ricerca di Potenza.

11,3 mg/ml di plmK, 6 mg di plmSDK e 11,3 mg di plg $\beta$ K sono stati impiegati in saggi di attività antiossidante utilizzando il test del B-carotene/linoleato, test del deossiribosio e test della metamioglobina (vedi sezione Materiali e Metodi par. 18). I risultati sono illustrati in Tabella XXII.

## **1. RECUPERO E CARATTERIZZAZIONE DELLA POLIMERINA $\mathbf{K}$ (PLMK)**

### **1.1. Recupero della plmK**

Dalle acque di vegetazione di pressa (AV) si è recuperata la frazione polimerica, denominata polimerina $\mathbf{K}$  (plmK), mediante un processo di purificazione consistente essenzialmente in tre stadi (vedi Schema 1).

Nel primo stadio le AV (1L) molto scure e torbide sono state centrifugate e filtrate, ottenendo una soluzione ancora molto scura, ma limpida che è stata concentrata fino a 500 ml.

Nel secondo stadio tale soluzione è stata trattata con metanolo freddo e centrifugata recuperando il precipitato.

Nel terzo stadio il precipitato, ridisciolto nel minimo volume di acqua ultrapura, è stato dializzato utilizzando membrane con limite di esclusione di 3500 Da. Il non permeato è stato liofilizzato producendo un residuo secco di 11,3g di polimerinaK (plmK).

## **1.2. CARATTERIZZAZIONE CHIMICA DELLA PLMK**

### **1.2.1. Analisi della natura chimica**

L'analisi chimica della plmK ha evidenziato una composizione chimica molto complessa. Infatti essa ha mostrato mediante il saggio dell'antrone una componente zuccherina del 52,4 % in peso, con il saggio di Bradford una componente proteica del 13,3 % e mediante il saggio di Folin-Ciocalteu una componente polifenolica del 10,4 %.

Tali risultati sono mostrati in Tabella I.

La mancata complementarità a 100 del contenuto delle sostanze determinate può essere attribuita alla complessità della miscela polimerica considerata. In particolare i valori determinati per zuccheri, proteine e fenoli sono sottostimati poiché i metodi colorimetrici utilizzati dosano solo i gruppi esposti e non quelli interni.

### **1.2.2. Determinazione della composizione dei monosi della componente polisaccaridica**

L'analisi condotta mediante cromatografia ionica (HPAEC-PAD) degli zuccheri, ottenuti per idrolisi della plmK con HCl 2N, ha mostrato che la frazione polisaccaridica è composta dai seguenti monosi: arabinosio (20,9%), galattosio (10,45%), glucosio (9,9%), acidi uronici (galatturonico e glucuronico, 3,85% e 4,4%, rispettivamente) e ramnosio (5,5%) per un

totale del 55% in peso secondo quanto riportato in Tabella I (3<sup>a</sup> colonna) e Tabella II (2<sup>a</sup> colonna)

Dei monosi indicati sopra è stata anche calcolata la composizione percentuale come riportato in Tabella II (3<sup>a</sup> colonna).

### **1.2.3. Determinazione della composizione amminoacidica della componente proteica**

La determinazione della composizione amminoacidica della componente proteica, effettuata mediante un analizzatore di amminoacidi su campioni ottenuti per idrolisi della plmK (vedi parte sperimentale), ha evidenziato la presenza di tutti gli amminoacidi naturali con una netta prevalenza degli amminoacidi acidi (aspartico e glutammico) sugli altri tipi di amminoacidi, per un totale del 16,6% in peso come mostrato in Tabella I (3<sup>a</sup> colonna) e Tabella III (2<sup>a</sup> colonna). In particolare secondo Dayoff (1978), gli amminoacidi acidi determinati sono ugualmente ripartiti in acidi propriamente detti e derivati ammidici.

Degli amminoacidi indicati sopra è stata anche calcolata la composizione percentuale come riportato in Tabella III (3<sup>a</sup> colonna).

### **1.2.4. Determinazione della composizione qualitativa dei fenoli della componente catecolmelaninica della plmK e formulazione di un modello strutturale ipotetico del polimero catecolmelaninico.**

La componente polimerica di natura fenolica é stata analizzata qualitativamente mediante HPLC della miscela ottenuta per trattamento della plmK con CuO, secondo la procedura descritta in letteratura da Perez et al. (1987) che l'ha applicata a una miscela polimerica scura, proveniente dalle AV. L'unica variazione apportata nella nostra analisi HPLC ha riguardato il gradiente di eluizione della colonna (vedi parte sperimentale) che ci ha condotto all'identificazione di polifenoli non identificati dagli autori spagnoli (Figura 1 e cfr. 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> colonna della Tabella IV).

La determinazione quantitativa della componente catecolmelaninica della plmK è stata effettuata mediante complementarità con le altre componenti della miscela ed è risultata essere del 17,34% (3<sup>a</sup> colonna di Tabella I). Infatti considerando che quella proteica è presente per il 16,6%, quella zuccherina per il 55% e quella inorganica per 11,06% il complemento a 100 è di 17,34%.

La componente polimerica scura delle AV é stata analizzata anche da altri autori (Ragazzi et al., 1967), mediante cromatografia su carta delle miscele ottenute per pirolisi e fusione alcalina del pigmento scuro delle AV. Tali autori hanno formulato l'ipotesi che il pigmento fosse di natura catecolmelaninica sulla base dell'identità dei polifenoli identificati nelle loro analisi con i polifenoli ottenuti dall'analisi della catecolmelanina condotta da Piattelli et al. (1965)

Nella Tabella IV sono stati riportati in confronto i polifenoli identificati da Perez et al. (1987) (1<sup>a</sup> colonna) i polifenoli analizzati da noi (2<sup>a</sup> colonna), i polifenoli identificati da Ragazzi et al., 1967 (3<sup>a</sup> colonna) ed i polifenoli riportati nel lavoro di Piattelli et al., 1965 (4<sup>a</sup> colonna).

Come mostrato nella prima e 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> colonna della Tabella IV, i polifenoli relativi alla frazione polimerica scura (e quindi alla nostra plmK) posseggono inaspettatamente gruppi metossilici, che non sono stati identificati dagli altri autori sopra menzionati nel loro materiale polimerico indagato. Molto probabilmente tali gruppi possono derivare da un processo di metilazione da parte della catena laterale della metionina della componente proteica saldamente legata al nostro polimero catecolmelaninico nella plmK, processo in atto durante la degradazione ossidativa della stessa.

Inoltre, nella nostra analisi abbiamo identificato il catecolo e l'acido salicilico, non rivelati nell'analisi di Perez et al. (1987) (confronto 1<sup>a</sup> con 2<sup>a</sup> colonna della Tabella IV).

Tali fenoli sono stati identificati anche nel loro pigmento polimerico scuro da Ragazzi et al. (1967) e Piattelli et al. (1965), così come l'acido

protocatechico è stato identificato da tutti gli autori meno noi e Perez et al., (1987) (vedi colonne 1-4 della Tabella IV).

Piattelli et al. (1965) hanno identificato nella catecolmelanina anche altri polifenoli come il 3,3',4,4'-tetraidrossidifenile, il 3,4,2',3'-tetraidrossidifenile, il 2,2',3,3'-tetraidrossidifenile ed un sistema chinonico complesso (Tabella IV).

Sulla base dei loro dati Piattelli et al. hanno formulato un modello strutturale per la catecolmelanina riportato in Figura 2.

In letteratura sono riportate anche altre strutture di catecolmalanine naturali (Rodriquez-Lopez, 1992; Beel e Wheeler, 1986).

In letteratura Lotti (1985) ha riportato un ulteriore modello strutturale del polimero catecolmelaninico isolato da semi di *Heliantus* (vedi Figura 3), che è congruente con i tutti i dati riferiti precedentemente. In particolare, nella struttura sono mostrati i gruppi ossidrilici, catecolici e un gruppo idrossi-chinonico, che sono pienamente congruenti con i valori pK acido (intorno a 10 e 5 rispettivamente) titolati nella catecolmelanina (Piattelli et al. 1965) e nella nostra plmK e plmSDK (componente povera di zuccheri). Più precisamente, il gruppo idrossichinonico avendo il medesimo pKa del gruppo carbossilico potrebbe essere scambiato con quest'ultimo; infatti i dati di spettroscopia DRIFT sono più coerenti con quest'ultima interpretazione (vedi più avanti).

Nel sistema catecolmelaninico il rapporto tra i gruppi fenolici e carbossilici (o idrossichinonici) è stato calcolato in 20 a 3 (Piattelli et al., 1965) circa sette ossidrili ogni carbossile (o idrossichinone), ovvero tre gruppi ortocatecolici e un gruppo fenolico ogni gruppo acido.

In conclusione, componendo tutti i dati chimici e chimico-fisici sopra esposti, possiamo formulare un modello strutturale del polimero catecolmelaninico presente nella plmK secondo come riportato in Figura 4.

### **1.2.5. Determinazione della componente metallica della plmK**

L'analisi dei metalli presenti nella plmK condotta mediante spettroscopia ad assorbimento atomico (AAS) su campioni mineralizzati, ha fornito la composizione dei metalli dell'11,06% come riportato nella Tabella I e V.

In particolare, lo ione potassio è risultato predominante (8,26%) nettamente sugli altri (calcio 0,85%, sodio 0,82%, ferro 0,54%, magnesio 0,46%, zinco 0,11% e rame, 0,020%).

### **1.3. TITOLAZIONE DEI GRUPPI -COOH E -OH FENOLICI PRESENTI NELLA PLMK**

L'analisi delle componenti organiche della plmK ha messo in evidenza sia gruppi carbossilici derivanti dagli amminoacidi acidi, dagli acidi uronici e dalla componente catecolmelaninica (vedi Tabelle II, III, IV e Figura 1 e 4) che gruppi fenolici derivanti dalla tirosina e dalla componente catecolmelaninica (vedi Tabella III e IV e Figura 1 e 4).

Tali gruppi sono stati anche identificati mediante titolazione potenziometrica automatica e la curva di titolazione ha mostrato il flesso caratteristico intorno pH 10, corrispondente al pKa dei fenoli, e il flesso caratteristico a pH 5, corrispondente appunto al pKa degli acidi carbossilici.

I risultati sono mostrati in Tabella VI.

### **1.4. CARATTERIZZAZIONE SPETTROSCOPICA DELLA PLMK**

La plmK è stata caratterizzata anche spettroscopicamente, mediante assorbimento UV e infrarosso, in quest'ultimo caso utilizzando la tecnica DRIFT.

#### **1.4.1. Spettro di assorbimento UV-Vis**

Riguardo all'assorbimento UV la plmK ha mostrato un assorbimento a 270nm (spalla) additiva dell'assorbimento del polimero catecolmelaninico e

peptidico e un assorbimento massimo a 470 nm derivante dal polimero catecolmelaninico (vedi Tabella VI)

#### **1.4.2. Spettro di assorbimento DRIFT della plmK**

Lo spettro DRIFT presenta bande caratteristiche della natura chimica e dei gruppi funzionali identificati precedentemente nella plmK.

Infatti, esso (Figura 5 e Tabella VI) ha presentato una banda larga e molto intensa centrata ad una frequenza di  $3386,6\text{cm}^{-1}$ , caratteristica dell'assorbimento sia dei gruppi -OH alcolici di zuccheri e fenoli e sia dei gruppi -NH di natura peptidica; una banda sottile e di media intensità derivante dall'assorbimento dei gruppi -CH degli zuccheri e delle catene laterali dei peptidi cade a  $2922,15\text{ cm}^{-1}$ . Lo spettro mostra correlato all'assorbimento degli -OH alcolici degli zuccheri un assorbimento molto intenso e caratteristico dello stiramento del legame C-OH degli stessi a  $1096,28\text{ cm}^{-1}$ . Tale valore può essere attribuito anche ai gruppi alcolici delle treonine e serine e dei C-NH<sub>2</sub> degli amminoacidi basici. In correlazione con l'assorbimento degli -OH fenolici tale spettro mostra un debole assorbimento a  $1239,8\text{ cm}^{-1}$ , che si sovrappone all'assorbimento del legame etero C-O-C degli anelli aromatici del polimero catecolmelaninico. Tale sistema possiede, molto verosimilmente, in correlazione un assorbimento compreso nella banda a  $1626\text{ cm}^{-1}$  e un assorbimento caratteristico a  $678,06\text{ cm}^{-1}$ . All'assorbimento dei gruppi -NH di natura peptidica che cade a  $3386,6\text{ cm}^{-1}$ , corrisponde un intenso assorbimento del gruppo CO peptidico a  $1626\text{ cm}^{-1}$ . Un altro assorbimento caratteristico, anche se debole, cade a  $1735\text{ cm}^{-1}$  e corrisponde allo stiramento di CO esterei la cui banda di correlazione cade a  $1239,9\text{ cm}^{-1}$ . Non è chiara l'origine di tali gruppi esterei, che molto probabilmente potrebbero essere attribuiti a quelli metilici naturalmente presenti nella plmK, così come è riportato precedentemente (Drake et al., 1996) in biomasse naturali. D'altra parte la reazione con diazometano condotta sulla plmSDK, di cui si riferirà più avanti, ha portato ad un incremento della banda caratteristica degli esteri (vedi Figura 9a). Infine, lo spettro mostra una banda debole a 1400

$\text{cm}^{-1}$ , che si può attribuire allo stiramento asimmetrico del gruppo  $\text{COO}^-$ , il cui stiramento simmetrico molto verosimilmente è compreso nell'assorbimento che cade a  $1626 \text{ cm}^{-1}$ . Tali gruppi, d'altra parte, sono stati rivelati per titolazione potenziometrica e per analisi della composizione chimica della plmK

### **1.5. DIMOSTRAZIONE DEL LEGAME TRA GLI IONI METALLICI E I GRUPPI CARBOSSILATO E GLI ALTRI GRUPPI FUNZIONALI (CHELAZIONE) DELLA PLM $\bar{K}$**

I dati chimici, chimico-fisici e spettroscopici finora descritti indicano chiaramente che gli ioni metallici della plmK sono legati ai gruppi carbossilato, quali controioni negativi, dei residui di acido aspartico e glutammico (almeno in parte) della componente peptidica e dei residui di acido glucuronico e galatturonico della componente polisaccaridica della plmK e, probabilmente, anche del polimero catecolmelaninico.

Inoltre, gli ioni bivalenti come il calcio, il magnesio, lo zinco e il ferro con molta probabilità, sono anche coordinati dai gruppi funzionali presenti nei residui amminoacidici (per esempio, -OH della serina e della treonina, -SH della cisteina, -NH<sub>2</sub> della lisina e dell'arginina) e dei gruppi -OH dei monosi residui della componente polisaccaridica).

D'altra parte, in un precedente studio condotto sul contenuto dei metalli presenti nelle AV (Arienzo e Capasso, 2000) è risultato che, degli ioni determinati, soltanto il potassio è risultato libero in soluzione per il 30% (il 70% era legato alla frazione polimerica delle AV), mentre tutti gli altri, compreso il sodio, sono risultati legati alla frazione polimerica per oltre il 90%.

### **1.6. DIMOSTRAZIONE DELLO STATUS DI AGGREGATO DELLE COMPONENTI ORGANICHE DELLA PLM $\bar{K}$ E DELLA PRESENZA DI UNA PORZIONE LIBERA (NON AGGREGATA) DELLA COMPONENTE POLISACCARIDICA**

### **1.6.1. Analisi del comportamento della plmK nella cromatografia per gel filtrazione su Biogel A.**

La plmK è stata eluita attraverso una colonna di Biogel A tarata con standard di polistirene sulfonati di peso molecolare vario (vedi parte sperimentale Par. 1.9); tutte le frazioni raccolte sono state analizzate oltre che per assorbimento UV a 270 nm anche per il contenuto di zuccheri, proteine e fenoli, ottenendo così il cromatogramma mostrato in Figura 6.

L'esame del cromatogramma ha evidenziato che il peso molecolare è distribuito in un range compreso tra valori leggermente superiori a 500 kDa e leggermente inferiori a 2 kDa

In particolare la curva relativa alla componente catecolmelaninica (curva marrone), la curva relativa alla componente proteica (curva rossa) e la curva di assorbimento a 270 nm (curva verde), dovuta alle due componenti sopra indicate, sono distribuite in un intervallo di dimensioni molecolari compreso tra 500 e 2 kDa con 2 massimi a 500 e 11,3 kDa.

Tali curve sono tutte coeluite con il medesimo profilo, indicando che la componente proteica e catecolmelaninica sono molto probabilmente fortemente aggregate.

La curva relativa alla componente polisaccaridica (curva azzurra), che include la porzione degli acidi uronici come parte integrante (curva blu), è distribuita in un intervallo di dimensioni molecolari più ampio delle altre due, compreso tra valori intorno e oltre 500 KDa e valori intorno e sotto 2 kDa, con tre massimi corrispondenti a 500, 100 e 2 KDa. Il comportamento cromatografico descritto per tale componente suggerisce che essa, almeno in parte, e precisamente quella con peso molecolare compreso tra 100 e 2 kDa non sia aggregata alle altre due, in quanto mostra un profilo cromatografico indipendente dalle altre due.

Tale analisi ha evidenziato che le componenti della plmK sono distribuite in un intervallo di dimensioni molecolari relative, comprese tra 500 e 2 kDa con complessivamente 4 massimi a 500, 100, 11,300 e 2 kDa (Tabella VI e Figura 6).

Pertanto i dati esaminati relativamente al cromatogramma di Figura 6 suggeriscono che le componenti chimiche della plmK siano aggregate tra di loro, in particolare quella proteica e catecolmelaninica completamente, mentre quella polisaccaridica in parte è aggregata ed in parte è libera

Allo scopo di confermare tale ipotesi, si è studiato il comportamento della plmK nella cromatografia su fase inversa C-18

### **1.6.2. Analisi del comportamento della plmK nella cromatografia su fase inversa C-18.**

La plmK è stata eluita inizialmente con 150 ml di acqua ultrapura e successivamente con 150 ml di una miscela di acqua-acetonitrile 50:50. Tutte le frazioni eluite sono state analizzate mediante spettroscopia UV a 270 nm e per il contenuto di zuccheri, proteine, fenoli ed acidi uronici dando origine al cromatogramma riportato in Figura 7a in cui sono presenti 2 gruppi di picchi nella zona eluita con acqua (1 e 2) e un gruppo (3) nella zona eluita con la miscela acqua-acetonitrile 50-50.

Dei due gruppi eluiti con acqua il gruppo 1 mostra il picco corrispondente alla componente catecolmelaninica (curva marrone) e il picco corrispondente componente proteica (curva rossa), il picco di assorbimento a 270 nm (curva verde) additivo della componente proteica e catecolmelaninica e il picco corrispondente alla componente polisaccaridica (curva azzurra) che include la porzione degli acidi uronici mostrata dalla curva blu con lo stesso profilo.

Il gruppo 2 è costituito in prevalenza dal picco azzurro degli zuccheri che possiede un andamento indipendente dalle curve delle altre componenti eccetto che per la curva blu degli acidi uronici che sono parte integrante della componente polisaccaridica.

Il gruppo 3 eluito con la miscela acqua-acetonitrile 50:50 è costituito da quattro picchi co-eluiti caratterizzati dal seguente comportamento: i picchi corrispondenti alla componente proteica e catecolmelaninica (curva rossa e marrone) presentano lo stesso profilo così come il picco verde, che corrisponde all'assorbimento additivo della componente proteica e

catecolmelaninica insieme. Infine il picco corrispondente alla componente polisaccaridica (picco azzurro) che comprende come parte integrante gli acidi uronici (picco blu) possiede lo stesso andamento degli altri picchi considerati.

Il comportamento cromatografico esaminato della plmK conferma che le componenti organiche di tale miscela polimerica complessa sono organizzate in due frazioni aggregate ed in una frazione libera.

In particolare, il primo aggregato corrispondente al gruppo 1 dei picchi eluiti con acqua, è caratterizzato da un peso molecolare medio intorno a 500 kDa in quanto correlabile al primo gruppo di picchi del cromatogramma di Figura 6 determinato su Biogel A (vedi par. 1.6.1 e Figura 7b).

Tale correlazione discende dal fatto che il rapporto tra la quantità della componente zuccherina e proteica fortemente polari e la componente catecolmelaninica meno polare (in quanto avente un sistema aromatico) è molto più elevato del rapporto tra le stesse componenti dell'aggregato corrispondente al gruppo di picchi eluiti con la miscela acetonitrile-acqua. Infatti quest'ultimo gruppo è eluito con maggiore ritardo e il suo peso molecolare medio è intorno a 11,300 kDa in quanto correlabile al gruppo di picchi di Figura 6, caratterizzato da questo peso molecolare medio. Questo aggregato rappresenterebbe il secondo aggregato della miscela.

I due gruppi di picchi considerati sono intensamente scuri per la presenza del sistema catecolmelaninico, per cui potrebbero essere considerati due sub-unità di dimensioni estremamente differenti del pigmento polimerico delle acque di vegetazione che potremmo denominare poligmentina (plg).

Pertanto, i due aggregati eluiti con acqua e acqua-acetonitrile su RP-18 e con acqua su Biogel A costituiscono due sub-aggregati della poligmentina denominati poligmentina $\alpha$  (plg $\alpha$ ) corrispondente a dimensioni molecolari medie di 500 KDa e poligmentina $\beta$  (plg $\beta$ ), corrispondenti a dimensioni molecolari medie di 11,3 kDa.

Infine la plmK è costituita da una frazione polisaccaridica libera, definita (polisa), indipendente dai due sub-aggregati considerati, il cui peso molecolare relativo è compreso sostanzialmente tra 100 e 2 kDa. Tale frazione è compresa fra i picchi 1 e 2 del cromatogramma di Figura 7a e può essere correlata ai picchi del tratto di cromatogramma di Figura 6 di peso molecolare compreso tra 100 kDa e 2 kDa.

In conclusione, la frazione polimerica delle acque di vegetazione (plmK), separata dalle acque mediante una membrana di dialisi con un limite di esclusione di 3500 Da, è costituita dalla miscela di un polisaccaride, definito polisa, e di un pigmento catecolmelaninico definito poligmentina (plg) costituito, a sua volta, di due frazioni catecolmelaniniche complesse, definite poligmentina $\alpha$  (plg $\alpha$ ) e poligmentina  $\beta$  (plg $\beta$ ).

Il polisa ha le dimensioni molecolari comprese tra 100 e 2 kDa, mentre la plg è organizzata in due subaggregati cioè plg $\alpha$  e la plg $\beta$  che hanno dimensioni molecolari medie rispettivamente di 500 e 11,3 kDa.

Il polisa, presentando come parte integrante gli acidi uronici (curva blu di Figura 7a), lega molto probabilmente il potassio in prevalenza sugli altri metalli e pertanto possiamo definirlo polisaK.

Inoltre i subaggregati della plg sono organizzati in quattro componenti chimiche, di cui tre organiche (proteica, catecolmelaninica e polisaccaridica) ed una metallica distribuita sui sub-aggregati. Infatti la curva relativa alla determinazione degli acidi uronici, che copre tutto l'intervallo cromatografico considerato, indica che i metalli determinati sono distribuiti sia sulla componente proteica che su quella zuccherina, e pertanto tali frazioni si potrebbero denominare plgK, plg $\alpha$ K, plg $\beta$ K, assumendo che il potassio sia distribuito su tutte le frazioni.

## **2. PREPARAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DELLA POLIMERINA SDK (PLMSDK)**

### **2.1. Preparazione della polimerina SDK (plmSDK) coincidente con la polimentina SDK (plgSDK)**

I risultati ottenuti dall'analisi della plmK, con particolare riferimento all'analisi per cromatografia su setacci molecolari e su fase inversa RP-18 a

bassa pressione (vedi Figg. 6, 7a e 7b), indicano che le componenti organiche e metallica della plgK sono fortemente legate tra di loro.

Con l'obiettivo di stabilire la natura chimica dei legami tra tali componenti e approfondire le indagini sulla loro organizzazione strutturale, la plmK è stata sottoposta ad una energica reazione di idrolisi acida (vedi Parte Sperimentale par. 2.1.) ed è stata salificata con potassio (vedi parte sperimentale par. 2.1), ottenendo così il sale di potassio deglicosilato della plmK, definito polimerinaSDK (plmSDK).

Da 100mg di plmK si sono ottenuti 43 mg di plmSDK (vedi Schema 2).

## **2.2. CARATTERIZZAZIONE CHIMICA DELLA PLMSDK**

L'analisi chimica della plmSDK condotta mediante saggi colorimetrici, comparata con quella della plmK (Tabella VII) ha mostrato una sostanziale perdita della porzione polisaccaridica (dal 52,4 al 6%) e un incremento delle porzioni proteica (dal 10,4% al 35,4 %) e catecolmelaninica (dal 13,3 % al 20%); si è osservato inoltre una netta diminuzione della componente metallica (da 11,06 a 6,11%).

### **2.2.1. Caratterizzazione della componente proteica**

La composizione amminoacidica della plmSDK, determinata su un campione ottenuto dall' idrolisi acida della stessa plmSDK (vedi parte sperimentale par. 2.4) appare simile a quella della plmK (Tabella VIII); dopo idrolisi si sono ottenuti partendo da 100 mg di campione di plmSDK 45,4 mg di amminoacidi cioè il 45,4%.

Anche nel caso della plmSDK si osserva una netta predominanza degli amminoacidi acidi sugli altri amminoacidi naturali. Per treonina, serina, alanina, metionina, tirosina, fenilalanina, lisina, istidina e arginina si è osservata una minima diminuzione mentre questa è più consistente per la valina. Tale perdita può essere attribuita al fatto che essa possa essere un amminoacido terminale e pertanto facilmente rimovibile. Per gli altri

amminoacidi si è osservato invece un leggero aumento. L'incremento di cisteina potrebbe essere dovuto alla rottura dei ponti disolfuro all'interno della catena proteica dopo l'idrolisi.

### **2.2.2. Caratterizzazione della componente catecolmelaninica**

La componente catecolmelaninica della plmSDK presenta un contenuto di polifenoli determinato mediante complementarità con gli altri componenti organici e inorganici del 40% (vedi 4<sup>a</sup> colonna di Tabella VII). Questo incremento dall'altra parte è congruente con il fatto che il saggio dei fenoli rivela solo le funzioni catecoliche e non quelle degli altri anelli benzenici della catecolmelanina (Fig. 2, 3 e 4). La composizione qualitativa dei polifenoli è stata determinata su un campione della plmSDK trattato con lo stesso metodo ossidativo utilizzato per la plmK evidenziando la medesima composizione (Tabella 4 e Figura 1).

### **2.2.3. Caratterizzazione della componente polisaccaridica**

La porzione polisaccaridica residua della plmSDK essendo più resistente all'idrolisi è stata trattata con HCl 2N a ricadere per una notte e analizzata successivamente mediante HPAEC-PAD.

La composizione dei monosi è riportata in Tabella IX, in confronto con quella della plmK, ed è risultata essere partendo da 100 mg di 8,6 mg cioè 8,6 %.

Come è mostrato in Tabella IX, gli zuccheri presenti nella plmSDK sono ridotti a tre unità monosaccaridiche, l'acido glucuronico, il galatturonico e l'arabinosio, rispettivamente contenuti per il 3,1%, 3,1% e 2,4 %.

### **2.2.4. Caratterizzazione della componente metallica**

Riguardo a quest'ultima, come si vede in Tabella X, dove sono riportate in confronto le percentuali dei metalli della plmK e plmSDK, il potassio diminuisce dallo 8,26 al 2,88%, il magnesio dallo 0,46 allo 0,1%, il ferro dallo 0,54 allo 0,15%, lo zinco dallo 0,11 allo 0,08%, il rame

scompare (dallo 0,020 allo 0%), il sodio ed il calcio invece aumentano dallo 0,82 allo 1,21 % e dallo 0,85 allo 1,69% , rispettivamente.

Questi dati indicano chiaramente che il potassio, il magnesio, lo zinco, il ferro ed il rame sono legati prevalentemente alle componenti polisaccaridiche della plmK (quella libera e quella aggregata), mentre il calcio ed il sodio sono legati prevalentemente alle componenti della plmSDK, ovvero alla porzione proteica, catecolmelaninica e la polisaccaridica residua.

In generale, i dati ottenuti sulla composizione chimica delle componenti della plmSDK, evidenziano, per una parte, che la porzione metallica e quella polisaccaridica sono notevolmente ridotte rispetto a quelle presenti nella plmK, mentre, d'altra parte, la porzione proteica è molto simile a quella proteica della plmK e quella catecolmelaninica coincidente con quella della plmK.

Questo risultato indica che il sistema catecolmelaninico-proteico è lo stesso nei due aggregati considerati. La mancata identità totale delle componenti proteiche potrebbe derivare da una piccola perdita di amminoacidi, nel processo di idrolisi della plmK per formare la plmSDK.

### **2.3. TITOLAZIONE DEI GRUPPI -COOH E -OH FENOLICI PRESENTI NELLA PLMSDK**

L'analisi delle componenti organiche della plmSDK ha messo in evidenza, come nella plmK, sia gruppi carbossilici che gruppi fenolici (Tabella IV, VIII e IX e Figura 1).

Tali gruppi sono stati anche identificati mediante titolazione potenziometrica automatica e la curva di titolazione ha mostrato il flesso caratteristico intorno pH 10, corrispondente al pKa dei fenoli, e il flesso intorno a pH 5, corrispondente al pKa degli acidi carbossilici (Tabella XI).

### **2.4. CARATTERIZZAZIONE SPETTROSCOPICA DELLA PLMSDK E DEL DERIVATO TRATTATO CON DIAZOMETANO (PLMDCH<sub>3</sub>)**

#### **2.4.1. Spettro di assorbimento UV-Vis**

Riguardo all'assorbimento UV la plmSDK ha mostrato come la plmK un assorbimento a 270 nm (spalla) additiva dell'assorbimento del polimero catecolmelaninico e peptidico e un assorbimento massimo a 470 nm, derivante dal polimero catecolmelaninico (Tabella XI)

#### **2.4.2. Spettro di assorbimento DRIFT della plmSDK e del suo derivato trattato con diazometano (plmDCH<sub>3</sub>)**

Lo spettro DRIFT della plmSDK (Figura 8a e Tabella XI), confrontato con quello della plmK (Figura 8b) mostra di significativo la banda dello stiramento asimmetrico del COO<sup>-</sup>, shiftata a 1394,56 cm<sup>-1</sup>, più intensa e risolta della banda corrispondente nello spettro DRIFT della plmK, mentre l'assorbimento asimmetrico cade sempre associato alle bande degli altri gruppi funzionali a 1601,33 cm<sup>-1</sup>. La maggiore intensità e risoluzione della banda a 1394,56 cm<sup>-1</sup> nella plmSDK può derivare dalla idrolisi dei gruppi esterei a 1735,15 cm<sup>-1</sup> trasformati in COO<sup>-</sup>. Inoltre la perdita della porzione zuccherina della plmK dopo l'idrolisi (nella plmK cade a 1096,28 cm<sup>-1</sup>) che si riflette sulla drastica diminuzione della banda dei C-OH che si osserva a 1071,41 cm<sup>-1</sup> nella plmSDK. Si osserva inoltre anche un incremento e una maggiore risoluzione e uno shift della banda dovuta allo stiramento C-OH dei fenoli a 1278,98 cm<sup>-1</sup> nello spettro della plmSDK rispetto al segnale a 1239 cm<sup>-1</sup> nello spettro della plmK.

Lo spettro DRIFT della plmDCH<sub>3</sub> (Tabella XII e Figura 9a e b) ottenuta per trattamento della plmSDK con diazometano in metanolo, mette in evidenza la comparsa di due intense bande a 1724,96 e 1272,91 cm<sup>-1</sup> caratteristiche dello stiramento CO e OC-O-C, rispettivamente, degli esteri (in questo caso metilici) derivanti appunto dalla reazione dei gruppi carbossilici con CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>. Queste sono incrementate e risolte fortemente rispetto alle stesse della plmSDK, evidentemente sia per la trasformazione dei gruppi carbossilato (impegnati nel legame con i metalli nella plmSDK)

nei corrispondenti metilesteri e sia per l'acquisizione di una maggiore libertà vibrazionale, rispettivamente.

Riguardo ai gruppi chelanti in generale, lo spettro DRIFT della plmDCH<sub>3</sub>, confrontato con lo spettro DRIFT della plmSDK (Fig. 9b), mostra che anche le altre bande diventano più risolte e incrementano il loro splitting; in particolar modo quella dello stiramento C-OH a 1073,08 cm<sup>-1</sup> dei gruppi -OH degli zuccheri e degli amminoacidi.

Infine, è interessante notare che in seguito alla reazione con diazometano compare nello spettro una banda a 1441,76 cm<sup>-1</sup> che può essere attribuita alle vibrazioni di stiramento dei gruppi CONH<sub>2</sub> dell'asparagina e della glutammina. La comparsa di tale banda deriva, molto probabilmente, dalla relativa diminuzione del picco dello ione carbossilato a 1386 cm<sup>-1</sup> dovuta alla conversione in estere e alla ridotta chelazione con i metalli che ne incrementa la vibrazione (Silverstein, 1981).

In conclusione, la risoluzione delle bande esaminate deriva dall'acquisizione di una libertà vibrazionale molto più elevata dei gruppi funzionali liberati dalla chelazione per effetto della metilazione dei gruppi carbossilato.

## **2.5. DIMOSTRAZIONE DELLO STATUS DI AGGREGATO DELLE COMPONENTI ORGANICHE DELLA PLMSDK**

### **2.5.1. Analisi del comportamento della plmSDK nella cromatografia per gel filtrazione su Biogel A.**

La plmSDK é stata anch'essa eluita attraverso la colonna di Biogel A calibrata per la determinazione dei pesi molecolari. Le frazioni sono state analizzate mediante i metodi colorimetrici tipici per la determinazione del contenuto di zuccheri, acidi uronici, proteine e fenoli e mediante assorbimento nell'ultravioletto a 270 nm ottenendo il cromatogramma mostrato in Figura 10a.

Tale cromatogramma é caratterizzato da un singolo gruppo di cinque picchi co-eluiti, caratterizzati da un profilo di eluizione molto simile,

corrispondente a un peso molecolare medio di 6,3 kDa ricavato dall'equazione  $\log p_{mr} = 1,356V_e/V_o - 6.68$  ottenuta dalla retta di calibrazione dei polistirensulfonati (Parte Sperimentale par. 1.9.1).

Il picco a 270 nm (curva verde) è dovuto all'assorbimento delle componenti proteica e catecolmelaninica. Gli altri quattro picchi, esaminati in ordine decrescente, corrispondono alla componente proteica (curva rossa), alla componente catecolmelaninica (curva marrone), alla componente polisaccaridica (curva azzurra) di cui fanno parte integrante gli acidi uronici rappresentati dalla curva blu.

La configurazione del cromatogramma considerato indica di rilevante che, in seguito al processo di idrolisi della plmK, il contenuto di zuccheri del derivato plmSDK è molto più piccolo rispetto alle altre due componenti (Figura 10b) e indica che tutte le componenti sono aggregate tra di loro.

### **2.5.2. Analisi del comportamento della plmSDK nella cromatografia a fase inversa C-18.**

Con l'obiettivo di confermare tale stato aggregativo, la plmSDK è stata cromatografata su colonna a fase inversa C-18 eluita con un gradiente discontinuo di acqua e di acqua-acetonitrile 50:50 ottenendo così il cromatogramma mostrato in Figura 11a.

In Figura 11b sono posti a confronto i cromatogrammi dell'eluizione della plmSDK su Biogel A e su RP-18 mentre in Figura 11c sono posti a confronto i cromatogrammi dell'eluizione della plmSDK e della plmK su RP-18.

Anche in questo sistema cromatografico il cromatogramma presenta un singolo gruppo di picchi, co-eluiti solo con la seconda miscela eluente (acqua-acetonitrile 50:50) e caratterizzato da una configurazione molto simile a quella del cromatogramma di Figura 10a.

Inoltre il saggio degli acidi uronici ha confermato che gli zuccheri ancora legati alla plmSDK sono prevalentemente di natura acida; infatti questi ultimi sarebbero più resistenti all'idrolisi dei neutri.

Questo comportamento cromatografico conferma evidentemente che le componenti della plmSDK sono fortemente aggregate tra di loro.

### **2.5.3. Analisi del comportamento all'idrolisi della plmSDK**

Un'ulteriore conferma dell'aggregazione e della notevole stabilità di tale status derivano dal comportamento chimico della plmSDK.

Infatti, per energico trattamento idrolitico con HCl 2N per 4 ore della plmSDK, quest'ultima ha conservato la componente proteica e, seppure molto ridotta, la componente carboidratica.

Soltanto condizioni di idrolisi più drastiche, come il trattamento di tale miscela polimerica con HCl 6 N a 110 °C, ha permesso di rimuovere e analizzare gli amminoacidi della componente proteica (Tabella VIII e Schema 3), mentre il trattamento con HCl 2N a 100°C per una notte ha permesso di rimuovere e determinare i monosi costituenti la componente polisaccaridica (Tabella IX e Schema 3).

## **2.6. DISCUSSIONE SULLA NATURA CHIMICA DELLE FORZE LEGANTI LE COMPONENTI ORGANICHE DELL'AGGREGATO PLMSDK**

Riguardo alla natura chimica delle forze leganti le componenti della plmSDK, molto verosimilmente esse sono costituite da una combinazione di legami d'idrogeno e da interazioni CH- $\pi$  (Motohiro, 1998) mentre non sono stati evidenziati legami covalenti. La combinazione dei legami d'idrogeno e delle interazioni CH- $\pi$  dovrebbe contribuire fortemente alla stabilità dell'aggregato. Infatti, i legami d'idrogeno possono essersi formati numerosamente tra i gruppi NH peptidici della porzione proteica e i ponti di ossigeno del polimero catecolmelaninico, così come con i gruppi OH della porzione polisaccaridica.

I legami CH- $\pi$ , invece, possono essersi formati tra i CH appartenenti alla catena peptidica e alle catene laterali degli amminoacidi (per esempio i residui di alanina, leucina e valina) e degli zuccheri con gli anelli

aromatici del sistema catecolmelaninico, in accordo a quanto riportato in letteratura su questi tipo di legame debole (Motohiro, 1998).

## **2.7. DISCUSSIONE SUL LEGAME DELLA COMPONENTE METALLICA CON L'AGGREGATO PLMSDK**

I dati sin qui riportati indicano chiaramente che i metalli determinati sono legati alle funzioni carbossilato provenienti sicuramente dagli amminoacidi acidi (solo una parte poiché la restante si trova sotto forma di ammidi) della porzione proteica e dagli acidi uronici della porzione polisaccaridica e, probabilmente, dal polimero catecolmelaninico.

Inoltre gli ioni bivalenti costituenti la componente metallica (vedi Tabella X) sono sicuramente chelati anche da altri gruppi funzionali come i gruppi SH e NH<sub>2</sub> derivanti dagli amminoacidi e gli OH alcolici derivanti dagli zuccheri e dagli amminoacidi, tutti costituenti le porzioni dell'aggregato in esame.

Infatti, quale conferma di tale condizione, gli anioni carbossilato sono stati determinati mediante titolazione potenziometrica (Tabella XI).

Riguardo ai gruppi chelanti, la precedente interpretazione dei dati dello spettro DRIFT della plmDCH<sub>3</sub>, ottenuta per trattamento con diazometano della plmSDK, confrontati con i dati DRIFT di quest'ultima (vedi Figura 9a e 9b) sono indicative di tale chelazione.

## **2.8. DIMOSTRAZIONE CHE LA PLG $\alpha$ K E LA PLG $\beta$ K CONTENGONO IN COMUNE LO STESSO AGGREGATO ORGANICO BASE, CORRISPONDENTE ALLA PLMSDK**

La plmSDK é costituita da un singolo aggregato medio con un peso molecolare di 6300 Da che é derivato da un processo di idrolisi della plmK, che è una miscela di tre componenti: due sub-aggregati definiti plg $\alpha$ K e plg $\beta$ K (costituenti della plgK), aventi un peso molecolare relativo di 50000 e 11300 Da, rispettivamente e un polisaccaride libero definito polisaK con dimensioni molecolari comprese tra 100 e circa 2 kDa.

Evidentemente, la convergenza di tali componenti nella plmSDK che possiede un contenuto polisaccaridico molto ridotto rispetto alla plmK (dal 55% a 8,6%) indica che il polisaK é stato completamente rimosso, mentre gli altri due componenti della plmK ovvero la plg $\alpha$ K e la plg $\beta$ K, hanno ridotto sostanzialmente il loro contenuto di carboidrati, convergendo in un singolo aggregato, appunto la plmSDK, costituito come noto da una porzione proteica, una catecolmelaninica ed una oligosaccaridica di contenuto decisamente minore rispetto alle altre due (vedi Tabelle VII, VIII e IX e Figure 6, 7a e 7b, 10a e 10b, 11a e 11b).

Questo comportamento chimico suggerisce che la plg $\alpha$ K e la plg $\beta$ K hanno in comune lo stesso sistema aggregato organico costituito sostanzialmente dalla plmSDK e pertanto la plg $\alpha$ K e la plg $\beta$ K differiscono esclusivamente per la lunghezza della catena polisaccaridica che determina nei due sub-aggregati i valori di peso molecolare così fortemente differenti (500000 e 11300 Da). Tale catena per idrolisi è stata ridotta drasticamente producendo la componente oligosaccaridica presente nella plmSDK.

Quest'ultima quindi oltre ad essere considerata, relativamente all'aggregato organico, il derivato deglicosilato della plmSDK, può essere considerata anche il derivato deglicosilato (plgSDK) della poligmentina, cioè della miscela della plg $\alpha$ K e plg $\beta$ K; pertanto plgK, plmSDK e plgSDK coincidono.

In altri termini, la plgSDK rappresenta il sale di potassio del pigmento polimerico delle AV.

In conclusione per idrolisi della plmK, si forma un sale di potassio, definito plmSDK, che coincide con il sale di potassio della poligmentinaSDK, definito plgSDK, che possiede un peso molecolare medio di 6300 Da e differisce dalle altre due frazioni la plg $\alpha$ K e la plg $\beta$ K per un contenuto molto più ridotto di zuccheri e metalli, ma avente in comune il medesimo sistema aggregato catecolmelaninico-proteico.

## **2.9. FORMULAZIONE DEGLI IPOTETICI MODELLI STRUTTURALI SUPRAMOLECOLARI DELLA PLGSDK E DELLE PLG $\alpha$ K E PLG $\beta$ K.**

Sulla base dei risultati delle indagini condotte sulla plgK (plg $\alpha$ K +plg $\beta$ K) e sulla plgSDK, possiamo formulare un modello strutturale ipotetico dei tre aggregati, che rappresentano il pigmento polimerico delle acque di vegetazione ed il suo sale rispettivamente, e, considerando che tali aggregati sono costituiti da componenti organiche differenti e fortemente legate tra di loro, il pigmento ed il suo sale costituiscono degli aggregati supramolecolari.

### **2.9.1. Determinazione del modello strutturale ipotetico del polimero catecolmelaninico della plgSDK**

- Per la determinazione dei fenoli presenti nella plgSDK è stato adoperato come fenolo standard l'acido gallico il cui pmr =126 e contiene 3 gruppi fenolici.

-La porzione del sistema catecolmelaninico avente i gruppi catecolici ha il pmr= 0,20x6300=1260Da, dove 0,20 é il % di fenolo come acido gallico presente nella plgSDK e 6300 il suo p.m. relativo. Pertanto il numero di molecole di acido gallico è dato da 1260/126 =10 che moltiplicate per tre gruppi fenolici = a 30 gruppi fenolici cioè 15 unità di catecolo, ovvero 14 unità di catecolo e 2 unità fenoliche.

- Incrementando di un ulteriore 20% (4<sup>a</sup> colonna della Tabella VII) la percentuale delle catecolmelanine non rivelata dal saggio di Folin-Ciocalteu perché costituita da anelli benzenici non fenolici ovvero da anelli benzenici con gruppi carbossilato e anelli con gruppi chinonici e ponti eterei, possiamo attribuire a questo sistema un ulteriore contributo in peso di 1260 Da.

-Considerando che 20 -OH corrispondono a 3 -COOH come stabilito precedentemente (Piattelli et al. 1965; par.1.2.4) di conseguenza 14 unità catecoliche e 2 fenoliche corrispondono approssimativamente 4 COOH,

cioè 4 unità di acido benzoico ( $122 \times 4 = 488 \text{ Da}$ ) cioè 488 Da; i rimanenti  $1260 - 488 = 772 \text{ Da}$  vanno attribuiti agli anelli che hanno gruppi chinonici e quelli con ponte di ossigeno cioè a complessivi altri 8 anelli.

Quindi approssimativamente alla porzione di 2520 Da vanno attribuite 14 unità catecoliche, 2 unità fenoliche, 4 carbossiliche, 4 chinoniche e 4 con ponti di ossigeno.

In definitiva, il polimero catecolmelaninico può essere formulato come un multiplo secondo 2 (Figura 12) del sistema catecolmelaninico riportato precedentemente in Figura 3.

### **2.9.2. Determinazione del modello strutturale ipotetico della componente polisaccaridica della plgSDK**

Il peso molecolare relativo della componente polisaccaridica è  $8,6/6300 = 542 \text{ Da}$ , dove 8,6 è il % di acidi uronici e arabinosio determinata per HPAEC-PAD precedentemente.

Tale valore è maggiore di quello determinato con il metodo dell'antrone (6%) precedentemente (Tabella IX), ma è congruente con le curve ottenute nel cromatogramma di Figura 10a e 11a, relativo alla cromatografia su Biogel A e su fase inversa C-18, che mostra un 70 % di acidi uronici rispetto agli zuccheri totali.

Pertanto la componente oligosaccaridica è costituita da un acido galatturonico, un glucuronico e da una molecola di arabinosio (Figura 13).

### **2.9.3. Determinazione della formula generale strutturale ipotetica della componente proteica della plgSDK**

Il % della componente proteica determinato con il metodo di Bradford è 35,4 (Tabella VII), mentre quello effettivo determinato per cromatografia ionica utilizzando un analizzatore di aminoacidi è del 45,4 % (Tabella VIII) pertanto il peso molecolare relativo della componente proteica è  $6300 \times 0,454 = 2860 \text{ Da}$ .

Assumendo che il p.m. medio di un aminoacido nella proteina è 110, la porzione proteica è formata da circa 26 aminoacidi e si può

formulare la formula generale della componente proteica della plgSDK secondo come riportato in Figura 14

Considerando la composizione per cento degli amminoacidi acidi (vedi Tabella VIII) si può formulare che nella componente proteica sono presenti 4 molecole di acido glutammico e 3 di aspartico, in altri termini 4(3) gruppi carbossilato e 3(4)ammidici (Dayoff, 1978).

#### **2.9.4. Determinazione del modello ipotetico di distribuzione della della componente metallica della plgSDK**

La componente metallica possiede un p.m. medio di  $6,11 \times 6300 = 385$

Da

cioè

$0,0288 \times 6300 = 181$	equivalente a	5 ioni potassio
$0,0121 \times 6300 = 76$	„	3 ioni sodio
$0,0169 \times 6300 = 106$	„	3 ioni calcio
$0,001 \times 6300 = 6,3$	„	0,3 ioni magnesio
$0,0015 \times 6300 = 9,45$	„	0,2 ioni ferro
$0,0008 \times 6300 = 5$	“	0,08 ioni zinco

pertanto la componente metallica ha una distribuzione media di 5 K +3 Na +3 Ca + 0,3 Mg + 0,2 Fe + 0,08 Zn (Figura 15)

#### **2.9.5. Formulazione del modello strutturale ipotetico della plgSDK**

Sulla base delle precedenti formulazioni si può pertanto derivare il modello strutturale ipotetico della plgSDK mostrato in Figura 16.

In tale modello sono indicate i possibili legami di idrogeno e interazioni CH- $\pi$ .

Tale modello di aggregazione si può considerare un modello supramolecolare (Lehn, 1995; Dalcanale, 1996).

La plg $\alpha$ K e la plg $\beta$ K differiscono sostanzialmente tra di loro e rispetto alla plgSDK per il contenuto di zuccheri e di metalli la cui distribuzione non é stata da noi determinata.

## **2.10. RECUPERO E CARATTERIZZAZIONE DELLA PLM $\beta$ K**

La poligmentina $\beta$ K (plg $\beta$ K) è stata ottenuta mediante purificazione con una miscela acqua-acetonitrile (vedi Parte Sperimentale par. 3.1) su fase inversa RP-18, sotto vuoto, ottenendo 100 mg di prodotto.

Mediante eluizione su Biogel A essa ha mostrato un peso molecolare relativo di 11300 Da. Inoltre le analisi chimiche condotte sulle frazioni eluite da Biogel A hanno mostrato la presenza di proteine, polifenoli, zuccheri e acidi uronici. Come mostrato in Figura 17 la determinazione del peso molecolare relativo e la distribuzione delle componenti organiche di tale frazione sono coincidenti con il picco di Figura 6 corrispondente ad un peso molecolare relativo di 11300 Da determinato su Biogel A per la plmK e corrispondente al picco 3 della plmK su RP-18 di Figura 7a (plg $\beta$ K).

In definitiva tale prodotto ottenuto mediante purificazione su fase inversa RP-18 sotto vuoto rappresenta il secondo aggregato della plmK denominato plg $\beta$ K con un peso molecolare di 11300 Da.

## **3. ASPETTI APPLICATIVI DELLA POLIMERINA $\alpha$ K (PLM $\alpha$ K), DI UN SUO DERIVATO PURIFICATO SU FASE INVERSA (PLG $\beta$ K) E DEL SUO SALE DI POTASSIO DEGLICOSILATO (PLMSDK $\equiv$ PLGSDK).**

La complessa composizione chimica della polimerina $\alpha$ K (plm $\alpha$ K) e del suo potassio derivato deglicosilato (plmSDK), e della poligmentina $\beta$ K (plg $\beta$ K) composte di proteine, zuccheri, catecolmelanina e metalli, ci

hanno stimolato lo studio del loro possibile sfruttamento in agricoltura e in alcune applicazioni biotecnologiche in campo ambientale e industriale.

1) Riguardo alle applicazioni in agricoltura la plmK e la plmSDK possono essere utilizzate quali bioammendanti o biointegratori tal quali e come base per la produzione di loro derivati saturati con metalli specifici di interesse agrario.

L'interesse di utilizzarle tal quali deriva dal fatto che esse sono ricche di macronutritivi metalloidei inorganici (C,H,O,N) e di macro e micronutritivi metallici, come il potassio, il calcio, il magnesio, il ferro e lo zinco. Inoltre il sistema catecolmelaninico è una ricca fonte di carbonio ed ha una struttura molto simile agli acidi umici (Kang e Felbeck, 1965; Linhares e Martin, 1979).

La plmK e la plmSDK costituiscono anche una base di scambio per la preparazione di potenziali bioammendanti e biointegratori con metalli specifici aventi proprietà di micronutritivi.

Allo scopo di avere indicazioni preliminari sulle loro interazioni con l'ambiente e valutare il loro possibile uso in agricoltura, sono stati effettuati preliminarmente anche alcuni saggi di attività biologica su piantine di pomodoro.

2) Riguardo allo sfruttamento in processi di biotecnologia ambientale la plmK è stata sperimentata preliminarmente quale potenziale biofiltro in processi di risanamento e valorizzazione di acque saline o contaminate da metalli pesanti. Le polimerine ottenute da tali processi sono state anch'esse saggate in test di attività fitotossica al fine di valutarne preliminarmente l'interazione ambientale e la loro eventuale applicazione in agricoltura.

3) Infine, la plmK, plg $\beta$ K e plmSDK sono state utilizzate in esperimenti di attività antiossidante, considerando la massiva presenza in questi aggregati del sistema orto-catecolico di origine catecolmelaninica.

### **3.1.A. PRODUZIONE E CARATTERIZZAZIONE DELLE PLMME DERIVATE DALLA PLMK**

Riguardo a questo punto, sono state preparate nuove polimerine denominate plmMe derivate dalla plmK (100 mg) per scambio del potassio, principalmente, e degli altri metalli contenuti in quest'ultima con  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$  e  $\text{Al}^{+3}$ . Lo scambio è avvenuto in condizioni di saturazione del metallo utilizzato e di pH di circa 1 corrispondente al valore di tali soluzioni, tranne che per la soluzione con il sodio il cui pH è risultato di circa 6,5: si sono ottenute così le polimerine corrispondenti plmNa, plmCu, plmZn, plmMn, plmFe e plmAl. I pesi delle polimerineMe sono mostrati in Tabella XIII.

Nella Tabella XIV è riportata in confronto la composizione metallica, espressa in % in peso e in meq, delle varie plmMe con la plmK.

In particolare, nella plmCu il potassio decresce drasticamente a 0,027 meq (3<sup>a</sup> colonna) cioè di circa dieci volte rispetto a 0,21 meq nella plmK, per effetto della sostituzione da parte del rame, la cui concentrazione varia da 0,00063 meq a 0,20 meq (11<sup>a</sup> colonna). Il sodio (vedi 5<sup>a</sup> colonna) ha mantenuto invariata la sua concentrazione (0,036 meq) molto probabilmente per il fatto che è uno ione di piccole dimensioni che è inserito in siti, in cui è legato con gli ioni carbossilato, stericamente impediti e quindi non raggiungibili dal rame esogeno. Il calcio, il magnesio ed il ferro (vedi 7<sup>a</sup>, 9<sup>a</sup> e 15<sup>a</sup> colonna) hanno mostrato una lieve diminuzione (da 0,042 a 0,035 meq, da 0,038 a 0,014 meq e da 0,019 a 0,013 meq, rispettivamente, evidentemente per la maggiore forza chelante del rame con gli ioni carbossilato e gli altri leganti come i gruppi OH, i gruppi SH e  $\text{NH}_2$  originati dagli zuccheri e dalle catene laterali delle proteine presenti nella plmCu. Lo zinco ha mostrato un lieve aumento di concentrazione probabilmente per la presenza di impurezze nella soluzione satura di rame utilizzata. Infine, l'alluminio ed il manganese sono assenti in tale aggregato, ovviamente perché sono assenti nella plmK

Nella plmZn il potassio ha mostrato una diminuzione di concentrazione di 10 volte come nella plmCu, per effetto della sostituzione dello zinco, la cui concentrazione incrementa da 0,0030 a 0,19 meq. Il

sodio resta quasi invariato indicando che di seguire lo stesso comportamento che nella plmCu. Il calcio, il magnesio, il rame ed il ferro sono diminuiti leggermente rispetto alla plmK, e precisamente da 0,042 a 0,037 meq, da 0,038 a 0,025 meq, da 0,00063 a 0,00037 meq e da 0,030 a 0,0020 meq, rispettivamente (vedi colonne 7<sup>a</sup>, 9<sup>a</sup>, 11<sup>a</sup> e 15<sup>a</sup> rispettivamente). Tali variazioni possono essere attribuite alla maggiore forza chelante dello zinco rispetto agli altri metalli esaminati precedentemente, eccetto il rame, assumendo valide per queste condizioni le costanti di formazione con l' EDTA (Kolthoff, 1992).

Nella plmMn, il potassio ha mostrato la stessa tendenza che nelle altre precedenti polimerine, per effetto della sostituzione del manganese, la cui concentrazione varia da 0 nella plmK (in questa é naturalmente assente) a 0,23 meq. Anche tutti gli altri metalli rimanenti seguono la stessa tendenza che nelle altre precedenti polimerine esaminate.

Nella plmFe, il potassio ha mostrato una diminuzione più marcata rispetto alle altre precedenti polimerine e questo comportamento é abbastanza congruente con la sostituzione del ferro con carica trivalente, che varia da 0,019 a 0,27 meq. Il sodio, il calcio ed il magnesio hanno presentato la stessa tendenza che nelle altre polimerine precedentemente esaminate. Il rame ha conservato costante la sua concentrazione, mentre lo zinco, coerentemente con una minore forza chelante del rame (Kolthoff, 1992), viene completamente sostituito dal Fe<sup>+3</sup>.

Nella plmAl il potassio ha mostrato una diminuzione di ben trenta volte, quindi con una tendenza più spinta che nelle altre polimerine, per effetto della sostituzione dell'alluminio, che oltre ad essere uno ione trivalente, possiede dimensioni più piccole degli altri e quindi può raggiungere più facilmente i siti di legame. Il sodio ha conservato invariata la stessa tendenza che nelle altre polimerine. Invece, tutti gli altri ioni hanno mostrato una diminuzione più elevata che nelle altre polimerine per le proprietà peculiari dell'alluminio sopra menzionate.

Infine nella plmNa il potassio ha subito un decremento minore rispetto alle altre polimerine (da 0,21 a 0,046 meq). Il sodio al contrario,

ha subito un incremento maggiore rispetto agli altri metalli impiegati nella preparazione delle plmMe. Infatti il suo valore in meq (0,32) è uguale solamente a quello dell'alluminio nella plmAl (0,32). Anche il calcio ed il magnesio hanno subito un notevole decremento (il calcio per un valore in meq non molto dissimile da quello osservato nella plmAl). Il rame e lo zinco sono completamente rimossi, mentre il ferro subisce soltanto una piccola variazione.

E' interessante notare due comportamenti peculiari del sodio che si avvicinano a quello dell'alluminio nonostante l'estrema differenza di carica positiva dei due ioni.

In particolare per quanto riguarda il primo comportamento il sodio è in grado di rimuovere gli ioni bivalenti e il potassio eccetto il ferro più di quanto facciano gli altri, molto probabilmente per le sue piccole dimensioni e per il suo raggio ionico più piccolo del potassio per cui ha una densità di carica maggiore di quest'ultimo (Arienzo e Capasso, 2000).

Per quanto riguarda il secondo comportamento, dalla Tabella XIV si osserva che la sommatoria dei meq (0,41) è molto più alta che nelle altre polimerine e sorprendentemente anche della plmAl indicando che, molto probabilmente, la tendenza di tale ione è di liberare nuovi siti di carica negativa ovvero determinare la dissociazione di gruppi carbossilici in ioni carbossilato.

In conclusione, come mostrato nelle ultime 2 colonne della Tabella XIV il contenuto totale dei metalli espresso in % in peso, che nella plmK è dell' 11,06 %, decresce molto sensibilmente nelle altre plmMe e drasticamente in quella saturata con alluminio, mentre la sommatoria totale dei meq mostra valori molto vicini. Tali dati indicano che il numero di siti negativi che legano i metalli nelle polimerine considerate restano sostanzialmente costanti anche dopo il processo di scambio eccetto che per il sodio nella plmNa.

Le plmMe sono sostanzialmente dei precipitati estremamente insolubili, eccetto la plmNa, e possono essere considerati dei macroaggregati. Molto verosimilmente la formazione di questi potrebbe

essere attribuita alla forte chelazione dei metalli pesanti scelti e dell'alluminio con gli anioni carbossilato in seguito al processo di scambio, principalmente con il potassio, legato ad essi nella plmK.

Data la loro estrema insolubilità, eccetto la plmNa, la caratterizzazione chimica delle plmMe è stata effettuata mediante spettroscopia DRIFT, confrontando gli spettri dei macroaggregati considerati, fra di loro e con l'aggregato naturale plmK.

Come si osserva nella Figura 18 e nella Tabella XV, gli spettri delle plmMe hanno presentato i principali e caratteristici assorbimenti a valori di frequenza molto simili, in alcuni casi quasi coincidenti. Tale risultato ha indicato chiaramente che tutte le plmMe derivate dalla plmK hanno conservato immutati i loro gruppi funzionali e la natura chimica, rappresentata, come è stato precedentemente determinato, da proteine, polisaccaridi e catecolmelanine. L'unica variazione spettroscopica di rilievo delle plmMe, comparate con la plmK è l'allargamento della banda di caratteristico assorbimento nella regione delle vibrazioni di stiramento degli OH alcolici e fenolici e degli NH peptidici, che cade intorno a  $3250\text{-}3450\text{ cm}^{-1}$  (Figura 18). Tale variazione, più pronunciata appunto nelle plmFe e plmAl, può essere verosimilmente attribuita alla macroaggregazione derivante dalla chelazione. Anche la plmNa ha presentato uno spettro DRIFT molto simile a quello della plmK ma con una maggiore risoluzione delle bande di assorbimento dovuta molto verosimilmente ad una maggiore libertà vibrazionale avendo liberato dei siti di chelazione.

### **3.1.B. PRODUZIONE E CARATTERIZZAZIONE DELLE PLMSDME DERIVATE DALLE PLMSDK**

Dalla plmK per idrolisi è stata ottenuta la plmSDK (sale di potassio della polimerina deglicosilata). Da quest'ultima (100 mg) sono stati preparati per scambio, in condizioni di concentrazioni sature a pH di circa 1, con  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$  e  $\text{Al}^{+3}$ , dei derivati denominati plmSDMe

(polimerine deglicosilate caricate con metalli) per scambio del potassio principalmente, ma anche degli altri metalli, legati naturalmente a quest'ultima; tali derivati sono stati denominati plmSDCu, plmSDZn, plmSDMn, plmSDFe e plmSDAl. Le quantità ottenute dallo scambio sono mostrate in Tabella XIII.

Nella Tabella XVI è riportata in confronto la composizione metallica, espressa in % in peso e in meq, della plmSDK con quella delle plmSDMe.

In particolare, nella plmSDCu il potassio decresce drasticamente a 0,074 meq (vedi 3<sup>a</sup> colonna) cioè di 10 volte rispetto a 0,74 meq nella plmSDK, per effetto della sostituzione da parte del rame, la cui concentrazione varia da 0 a 0,087 meq (vedi 11<sup>a</sup> colonna). Il sodio (vedi 5<sup>a</sup> colonna) ha mantenuto quasi invariata la sua concentrazione (0,053 meq), manifestando cioè lo stesso comportamento osservato nelle plmMe. Il calcio ed il magnesio (vedi 7<sup>a</sup> e 9<sup>a</sup> colonna) hanno mostrato una lieve diminuzione (da 0,085 a 0,074 meq e da 0,0083 a 0,0066 meq, rispettivamente), evidentemente per la maggiore forza chelante del rame con gli ioni carbossilato e gli altri leganti come i gruppi OH, i gruppi SH e NH<sub>2</sub> originati dalle catene laterali degli zuccheri e delle proteine presenti ancora nella plmSDCu. Lo zinco ed il ferro hanno mostrato un lieve aumento di concentrazione probabilmente per delle impurezze presenti nella soluzione satura del rame utilizzata (vedi 13<sup>a</sup> e 15<sup>a</sup> colonna rispettivamente). Infine, l'alluminio ed il manganese sono assenti in tale aggregato, ovviamente perché sono assenti nella plmSDCu.

Nella plmSDZn il potassio ha mostrato una diminuzione di concentrazione di 10 volte, per effetto della sostituzione dello zinco, la cui concentrazione incrementa da 0,0024 a 0,085 meq. Il sodio resta invariato, indicando che esso segue lo stesso comportamento che nella plmSDCu. Il calcio ed il magnesio si comportano analogamente alla plmSDCu. Il rame il manganese e l'alluminio sono assenti in quanto assenti nella plmSDK. Infine il ferro mantiene invariata la sua concentrazione.

Nella plmSDMn, il potassio ha mostrato la stessa tendenza che nelle altre precedenti polimerine, per effetto della sostituzione del manganese, la

cui concentrazione varia da 0 nella plmSDK (in questa é naturalmente assente) a 0,09 meq. Anche tutti gli altri metalli rimanenti seguono la stessa tendenza che nelle altre precedenti polimerine esaminate, eccetto che per lo zinco che mostra un lieve aumento di concentrazione.

Nella plmSDFe, il potassio ha mostrato una diminuzione più marcata rispetto alle altre precedenti polimerine; questo comportamento é abbastanza congruente con la sostituzione del ferro con carica trivalente, che varia da 0,0081 a 0,15 meq. Il sodio, il calcio ed il magnesio hanno presentato la stessa tendenza che nelle altre polimerine precedentemente esaminate. Il rame, l'alluminio e il manganese sono naturalmente assenti. Infine lo zinco è scomparso, per la maggiore carica del  $Fe^{+3}$

Infine nella plmAl il potassio ha mostrato una diminuzione di circa 10 volte, per effetto della sostituzione dell' alluminio, la cui concentrazione varia da 0 a 0,19 meq. Il sodio conserva invariata la stessa tendenza che nelle altre polimerine. Invece tutti gli altri ioni hanno mostrato una diminuzione più elevata che nelle altre polimerine per le proprietà peculiari dell'alluminio, che oltre ad essere uno ione trivalente, possiede anche dimensioni più piccole degli altri e quindi può più facilmente raggiungere i siti di legame sopra menzionati.

In conclusione, come mostrato nelle ultime 2 colonne della Tabella XVI il contenuto totale dei metalli espresso in % in peso, che nella plmSDK è dell' 6,11%, decresce gradualmente nelle altre polimerine e drasticamente in quella saturata con alluminio, mentre il numero totale dei milliequivalenti conserva valori molto vicini. Tali dati indicano che nelle plmSDMe il numero di siti negativi che legherebbe i metalli resta sostanzialmente costante rispetto alla plmSDK, anche dopo il processo di scambio.

Anche le polimerineSDMe sono dei precipitati estremamente insolubili, che possono essere considerati dei macroaggregati e molto verosimilmente la loro formazione come nelle plmMe può essere attribuita alla forte chelazione dei metalli pesanti impiegati e dell'alluminio con gli

anioni carbossilato in seguito al processo di scambio con il potassio che li legava nella plmSDK.

Data la loro estrema insolubilità anche la caratterizzazione chimica delle plmSDMe è stata effettuata mediante spettroscopia DRIFT, confrontando gli spettri dei macroaggregati considerati, fra di loro e con la plmSDK derivante per idrolisi della plmK.

Come si osserva nella Figura 19 e nella Tabella XV corrispondente, gli spettri delle plmSDMe hanno presentato i principali assorbimenti a valori di frequenza molto simili, in alcuni casi coincidenti con quelli della plmSDK

Tale risultato ha indicato chiaramente che tutte le plmSDMe derivate dalla plmSDK hanno conservato immutati i gruppi funzionali e la natura chimica rappresentata, come è stato precedentemente determinato, principalmente da proteine e catecolmelanine e in misura minore da zuccheri. Unica variazione spettroscopica di rilievo delle plmSDMe, comparate con la plmSDK è l'allargamento della banda di caratteristico assorbimento nella regione di stiramento degli OH alcolici e fenolici e degli NH peptidici, che cade intorno a  $3250-3450\text{ cm}^{-1}$ . Tale variazione, più pronunciata nella plmSDFe e plmSDAl, si può molto verosimilmente attribuire alla macroaggregazione derivante dalla chelazione dei metalli utilizzati che hanno scambiato il potassio. A tale fenomeno si può anche attribuire l'incremento di intensità delle bande di piegamento che cadono intorno a  $670\text{ cm}^{-1}$ , presentato dalle plmSDMe, eccetto la plmSDZn ma particolarmente pronunciato nella plmAl.

### **3.1.C. POTENZIALI APPLICAZIONI DELLE POLIMERINE ESAMINATE.**

La plmK, le plmMe, la plmSDK e la plmSDMe, come abbiamo esaminato precedentemente, contengono proteine, zuccheri e catecolammine, che sono fonte di macronutrienti quali ossigeno, carbonio e azoto e di metalli macro e micronutritivi eccetto l'alluminio e il sodio (vedi Tabelle XIV e XVI). Pertanto esse, eccetto la plmAl e la plmSDAl che

hanno solo interesse scientifico data la tossicità dell'alluminio, potrebbero presentare un notevole interesse in agricoltura come potenziali bioammendanti e/o biointegratori.

In particolare, la plmK è ricca di potassio, che rappresenta il macronutriente metallico nettamente predominante sugli altri macro (Ca e Mg) e micro-nutrienti metallici (Zn, Mn, Fe e Cu) (Tabella V). Le plmMe derivate (Tabella XIV) dalla prima, potrebbero rappresentare dei bioammendanti e dei biointegratori specifici per un determinato metallo, considerando che in questi biomateriali il metallo scelto ha sostituito massivamente il potassio e in parte anche gli altri metalli contenuti.

La plmSDK presenta delle analogie con la plmK, ma appare di minore interesse per gli usi menzionati, dato il minor contenuto di potassio, anche se maggiormente ricca di calcio (Tabella X); inoltre essa è più povera di zuccheri (Tabelle IXe Figure 10a e 10b e 11a e 11b). Le plmSDMe possono anch'esse rappresentare dei biointegratori specifici dei metalli scelti e in generale per gli altri macro e micronutrienti, ma sono anch'esse povere di zuccheri.

Inoltre, la plmSDK e quindi le sue derivate plmSDMe sono meno convenienti anche dal punto di vista preparativo, poiché la prima si prepara per idrolisi della plmK, seguita da un processo di neutralizzazione per dialisi; le derivate si ottengono, successivamente, mediante un processo di scambio con i vari metalli scelti dalla plmSDK. Invece la plmK si può ottenere dalle AV mediante un semplice processo di separazione chimico-fisica (dialisi o ultrafiltrazione) e le plmMe per scambio con la plmK con i vari metalli scelti.

### **3.1.D. SAGGI DI FITOTOSSICITÀ SU PIANTINE DI POMODORO DELLA PLMK DELLE PLMME E PLMSDME**

Allo scopo di valutare l'attività biologica di tali biomateriali, in prospettiva di un loro possibile utilizzo pratico, è stata saggiata la loro fitotossicità su piantine di pomodoro.

### **3.1.D.1. Effetto della plmK e delle plmMe su piantine di pomodoro recise**

Come mostrato nella Tabella XVII la plmK completamente solubile in acqua ha causato l'appassimento delle piantine di pomodoro (tre piantine immerse in 1 ml di acqua ultrapura) già dopo cinque ore dalla immersione dello stelo, sia a concentrazione di 5 mg/ml, corrispondente a una concentrazione media relativa di 30 $\mu$ M, cioè alla concentrazione della miscela polimerica nelle AV di centrifuga, sia a una concentrazione cinque volte minore come 1 mg/ml, corrispondente a una concentrazione media relativa 6 $\mu$ M.

E' interessante notare che, relativamente alla concentrazione di 1 mg/ml, due piantine su tre si sono riprese nel corso del tempo, fino alla totale ripresa dopo 4 giorni (le piantine appaiono completamente sane come i testimoni). Invece, le piantine trattate con 5 mg/ml hanno conservato sostanzialmente l'appassimento per tutto il tempo dell'esperimento, culminando dopo 4 giorni con l'avvizzimento di due e la ripresa totale di una soltanto.

Tali dati indicano chiaramente che la plmK ha ostruito meccanicamente la conduzione dell'acqua attraverso i vasi xilematici delle foglie, date le sue elevate dimensioni molecolari, determinandone l'appassimento dopo 4 giorni. Una delle tre piantine è stata in grado di neutralizzare tale effetto, probabilmente per caratteristiche morfo-strutturali migliori.

La plmNa completamente solubile in acqua come mostrato in Tabella XVII ha causato dopo 5h l'appassimento di tutte le piantine di pomodoro sia alla concentrazione di 5 mg/ml che a quella di 1 mg/ml. Nel corso del

tempo tutte le piantine sia alla concentrazione di 1 mg/ml che di 5 mg/ml si sono riprese fino alla scomparsa di tutti i sintomi.

Riguardo alle altre polimerine, si è notato che la plmCu e la plmZn hanno dato sintomi di appassimento soltanto alla concentrazione di 5 mg/ml e fino a due giorni. Dopo 4 giorni le piantine si sono totalmente riprese.

La plmMn, la plmFe e la plmAl non hanno mostrato alcun effetto, conservandosi sane come i testimoni.

Per la plmNa contrazioni di volume per le minori dimensioni del sodio rispetto al potassio che sostituisce massivamente hanno condotto alla completa ripresa delle piantine.

Riguardo alla plmCu e plmZn possiamo affermare, con molta probabilità, che dopo il transitorio appassimento che è potuto dipendere dalla residua solubilità dei due macro-aggregati le piantine però sono state in grado di annullare gli effetti dell'ostruzione meccanica data la loro bassa concentrazione.

Riguardo alla plmMn, la plmFe e la plmAl non si è osservato alcun effetto in quanto essendo totalmente precipitate non hanno rilasciato alcun macroaggregato in soluzione (almeno non significativamente). Tale risultato era particolarmente atteso riguardo alle plmFe e plmAl, che sono precipitati formati da ioni trivalenti.

### **3.1.D.2. Effetto della plmSDK e delle plmSDMe su piantine di pomodoro recise**

Come mostrato nella Tabella XVIII la plmSDK completamente solubile in acqua ha causato l'avvizzimento fogliare di una della tre piantine di pomodoro (tre piantine immerse in un ml di acqua ultrapura) dopo venti ore dalla immersione dello stelo, a concentrazione di 1 mg/ml corrispondente a una concentrazione media relativa di 150 $\mu$ M, cioè alla concentrazione 5 volte più grande di quella della miscela polimerica nelle AV di centrifuga, mentre alla concentrazione di 0,2 mg/ml, corrispondente a una concentrazione media relativa 30 $\mu$ M, non ha mostrato alcun effetto,

ovvero nessun danno. Lo stesso comportamento si è osservato anche dopo 2 e quattro giorni.

Dopo quest'ultimo periodo si è osservato l'avvizzimento fogliare anche su una delle tre piantine trattate con plmSDK alla concentrazione di 0,2 mg/ml (30  $\mu$ M).

Tutte le altre plmSDMe non hanno mostrato alcun danno nel tempo, eccetto la plmSDMn, che a concentrazione 0,2 mg ha determinato sintomi di appassimento su una delle tre piantine dopo 20 ore e conservato questo comportamento anche dopo 4 giorni. La stessa polimerina, a concentrazione di 1 mg/ml, ha determinato appassimento di una delle tre piantine di pomodoro dopo 20 ore, mentre a 30 ore fino a 4 giorni l'appassimento della piantina si è sviluppato in una manifestazione di tossicità con contorni della foglie necrotizzate che si sono accompagnate all'avvizzimento.

Il comportamento della plmSDK era atteso essendo questa polimerina completamente solubile e quindi assorbibile dalla piantina.

In particolare, alla concentrazione più bassa, 30  $\mu$ M (0,2 mg/ml), essa ha mostrato un effetto di avvizzimento sulle foglie di una piantina soltanto dopo quattro giorni, mentre a concentrazione 5 volte maggiore, cioè 150 $\mu$ M (1 mg/ml) questo stesso effetto è comparso soltanto su una piantina già dopo 20 giorni.

E' interessante notare il fatto che la plmSDK è meno tossica della plmK sulle piantine in esame (cfr Tabella XVII e XVIII in cui si è osservato che la prima polimerina a concentrazione micromolare uguale cioè 30  $\mu$ M e a concentrazione 5 volte più grande della seconda cioè 150  $\mu$ M ha mostrato effetti fitotossici più deboli) confermando che l'azione tossica è dipesa dalle dimensioni molecolari relative differenti dei due aggregati polimerici: come indicato schematicamente nella Figura 20, la plmK è circa 25 volte più grande della plmSDK per cui a parità di concentrazione la polimerina con dimensioni più grandi ostruisce la conduzione dell'acqua alle foglie attraverso lo xilema a livello del picciolo,

dove tale vaso si rimpicciolisce, molto più facilmente di quella con dimensioni minori.

Riguardo alla plmMn la sua debole azione tossica alla concentrazione più bassa (una piantina su tre ha dato soltanto sintomi di appassimento da 20 ore a 4 giorni), è derivata dal piccolo residuo solubile del macro-aggregato che ha agito come responsabile di ostruzione di flusso dell'acqua alle foglie. Alla concentrazione più elevata, da trenta ore fino a quattro giorni, tale residuo ha determinato sulle foglie di una piantina non soltanto avvizzimento, ma anche necrosi marginale delle foglie, suggerendo due possibili meccanismi. Uno che l'ostruzione di macroaggregati più concentrati, ha causato una ostruzione completa al passaggio dell'acqua attraverso il vaso xilematico della foglia. Il secondo è che il Mn della plmSDMn abbia potuto essere responsabile di uno squilibrio nel complesso di sviluppo dell'ossigeno nel processo fotosintetico di ossidazione dell'acqua, essendo noto che tale metallo è coinvolto in tale processo.

Riguardo alle altre plmMe, queste hanno mostrato inattività, perché hanno formato macroaggregati completamente insolubili.

### **3.2. APPLICAZIONI DELLA PLMMIX E DELLA PLMSEA**

La plmK, come già accennato sopra, possiede il potassio come metallo prevalente sugli altri come il calcio, il sodio, il ferro, il magnesio, lo zinco ed il rame. La sua mobilità nel processo di scambio è risultata abbastanza elevata sia per effetto della concentrazione che per effetto della singola carica positiva, confermando dall'altra parte precedenti osservazioni (Arienzo e Capasso, 2000).

Tali proprietà ci hanno suggerito di sperimentare questo aggregato anche come biofiltro di soluzioni contenenti metalli pesanti e di soluzioni saline come l'acqua di mare. Questo al fine di detossificare effluenti tossici e desalinizzare acque marine e possibilmente riciclare gli aggregati derivati dallo scambio quali bioammendanti e/o biointegratori.

### **3.2.A. Biofiltro di soluzioni di metalli pesanti (soluzione simulata di metalli tossici)**

Come si vede nella Tabella XIX la plmK è stata trasformata in un derivato denominato polimerinaMix (plmMix) dopo trattamento per 24 ore con una soluzione di ioni metallici (11mg/10ml) costituita da rame, zinco, ferro, alluminio e manganese (2,2 mg per ogni ione metallico), metalli spesso presenti di effluenti tossici.

La plmMix, però, inaspettatamente ha mostrato che il potassio non è stato completamente sostituito dai metalli considerati (infatti decresce da 8,26 a 5,12) anche se si è osservato un incremento significativo dei metalli pesanti presenti nella plmMix e l'adsorbimento del manganese e dell'alluminio assenti nella plmK.

Nella soluzione risultante (Soldetox) si ritrovano il potassio, il calcio, il magnesio ed il sodio espulsi parzialmente dalla plmK, e ancora parte degli ioni dei metalli tossici scelti per l'esperimento.

Anche se tale esperimento non mostra risultati completamente soddisfacenti si può evincere una tendenza all'adsorbimento da parte di tale materiale. Ciò suggerisce pertanto degli sviluppi e approfondimenti.

### **3.2.B. Biofiltro di acque marine**

Come è mostrato nella Tabella XX la plmK è stata trasformata in un derivato denominato polimerinaSea (plmSea) dopo trattamento per una notte con una soluzione di acque marine (SolSea).

Anche in questo caso, inaspettatamente, il sodio come il calcio ed il magnesio hanno sostituito solo parzialmente il potassio (decremento da 8,26 a 6,65 mg), mentre, di contro vi è stata una piccola espulsione di rame e di ferro.

La soluzione salina risultante (SolSeaDes) anche se ha mostrato un leggero incremento di potassio e di calcio, ha mantenuto un livello ancora alto di sodio. Pertanto anche in questo caso la sperimentazione va certamente continuata e approfondita.

### **3.2.C. Saggi di fitotossicità su piantine di pomodoro della plmMix e della plmSea**

#### **3.2.C.1. Effetto della plmMix su piantine di pomodoro recise**

La plmMix essendo ancora solubile per la presenza del potassio ha determinato la presenza di macroaggregati ancora solubili che hanno ostruito i canali xilematici delle foglie maggiormente della plmK per cui dopo 4 giorni alla concentrazione di 1 mg/ml e di 5 mg/ml 2 piantine su tre sono completamente avvizzite come si vede nella Tabella XXI.

#### **3.2.C.2. Effetto della plmSea su piantine di pomodoro recise**

La plmSea (Tabella XXI) in cui parte del potassio è stato sostituito dal sodio ha un comportamento molto più simile alla plmK, risultando tossica alla concentrazione di 5 mg/ml, che alla plmNa che è risultata non tossica a tale concentrazione (Tabella XVII). Questa polimerina, invece, alla concentrazione di 1 mg/ml ha mostrato un comportamento peculiare (Tabella XXI) essendo tossica contrariamente alla plmK e alla plmNa.

Questo comportamento potrebbe derivare dalla differente morfologia delle piantine e, comunque, anche in questi esperimenti l'azione di tali biomateriali ha mostrato di essere correlata alle loro dimensioni molecolari e non all'interferenza in processi metabolici, escludendo quindi l'interazione con siti specifici della cellula vegetale.

### **3.3 ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE DELLE POLIMERINE DI ORIGINE NATURALE PLMK, LA PLG $\beta$ K E PLGSDK**

La presenza del sistema orto-catecolico di origine catecolmelaninica, contenuto abbondantemente negli aggregati polimerici solubili sin qui esaminati, come la plmK, la plg $\beta$ K e la plgSDK, ci ha stimolato lo studio della loro attività antiossidante, utilizzando tre test appropriati: saggio del  $\beta$ -carotene/linoleato, saggio del deossiribosio e saggio della

metamioglobina; il primo per il monitoraggio dell'attività antiossidante nei confronti dei radicali perossilici mentre gli altri due per il monitoraggio dell'attività in questione nei confronti dei radicali ossidrilici.

L'attività antiossidante delle miscele polimeriche in esame è stata messa in confronto con quella del catecolo contenuto nelle AV e di un polimero noto come l'acido tannico.

L'obiettivo finale è stato quello di valutare il ruolo degli aggregati considerati nella salvaguardia delle macromolecole biologiche (proteine, lipidi, DNA) per possibili applicazioni nell'industria alimentare, farmaceutica e delle molecole sintetiche in applicazioni nell'industria dei coloranti.

Il test del deossiribosio indica inoltre il grado di attività antimutagenica degli agenti considerati, dal momento che il deossiribosio è un componente del DNA.

Come è mostrato nella Tabella XXII l'aggregato polimerico più attivo è risultato la plmK che, a concentrazione millimolare 14 volte minore degli altri agenti antiossidanti elencati, ha evidenziato un'attività notevole, per cui esso rappresenta il più conveniente tra le miscele polimeriche in esame, considerando anche che la sua tecnologia di recupero dalle AV è la meno complessa.

La frazione polimerica delle AV, denominata polimerinaK (plmK) è una miscela mista organico-metallica, che contiene adsorbiti il potassio, principalmente, ed, in minor misura, sodio, calcio, magnesio, zinco, rame e ferro. Le sue dimensioni molecolari relative sono comprese in un intervallo tra 500 e 2 KDa.

Più precisamente, la plmK é risultata costituita da un polisaccaride libero (polisaK) e da un pigmento bruno polimerico (plgK), questo, a sua volta costituito di due frazioni plg $\alpha$ K e plg $\beta$ K. In realtà la plg $\alpha$ K e la plg $\beta$ K sono degli aggregati organici, formati da una componente polisaccaridica, una catecolmelaninica ed una proteica, che legano a sé il potassio e gli altri metalli attraverso ioni carbossilato ed altri gruppi funzionali, con legami ionici e di chelazione. Le componenti organiche sono fortemente legate tra di loro, molto verosimilmente, mediante una

combinazione di legami covalenti, legami di idrogeno e CH- $\pi$ , formando una struttura cosiddetta supramolecolare.

Il suo derivato deglicosilato, ovvero il sale di potassio della polimerina deglicosilata, denominato polimerinaSDK (plmSDK), é composto qualitativamente come la plmK, differendo da quest'ultima per un minor contenuto di zuccheri e di metalli. La plmSDK coincide con il sale di potassio del pigmento ed é stato denominato anche plgSDK. In quest'ultima il sistema catecolmelaninico-proteico rappresenta il nucleo comune alla plg $\alpha$ K e all plg $\beta$ K.

Considerando l'abbondanza e la mobilità degli ioni potassio, la plmK è stata trasformata nei suoi derivati saturati separatamente con sodio, rame, zinco, manganese ferro e alluminio, e i metallo-aggregati così ottenuti sono stati monitorati per l'attività fitotossica, in vista di una loro possibile utilizzazione come bioammendanti e biointegratori.

Delle polimerine saggiate quella con attività tossica di rilievo é risultata la plmK, anche se l'effetto di avvizzimento riscontrato sulle foglie è stato attribuito ad una ostruzione meccanica del flusso di acqua alle foglie e non all'interferenza con l'attività metabolica delle cellule vegetali.

La plmK è stata utilizzata anche in esperimenti come biofiltro di acqua marina e di soluzioni simulate di metalli inquinanti, ottenendo però soltanto una rimozione parziale dei metalli indesiderati. I metallo-aggregati così ottenuti sono stati testati anche per l'attività fitotossica, mostrando risultati molto simili a quelli della plmK.

La plmK, la plmSDK e la plg $\beta$ K hanno mostrato anche una notevole attività antiossidante nei confronti dei radicali COO $\cdot$  e OH $\cdot$ , dovuta alla presenza di molti gruppi orto-catecolici e la prima ha mostrato una maggiore attività.

In conclusione, la frazione polimerica delle acque di vegetazione nell'ottica del riciclo, rappresenta una biomassa di notevole interesse per applicazioni in agricoltura (come biointegratori e bioammendanti), in processi di biotecnologia ambientale (come biofiltro di acque contenenti

metalli indesiderati) e nell'industria alimentare, farmaceutica e dei coloranti (come antiossidante)

Amat P., Rinaldi A., Sanjust E., Satt G., Viola, A. (1984). Vegetable material in water in the olive oil industry: raw material or polluting waste. Riv. Merceol. 25, 183-199.

Arienzo M. e Capasso R., (2000). Analysis of metal cations and inorganic anions in olive oil mill waste waters by atomic absorption spectroscopy and ion chromatography. Detection of the metals mainly bound to the organic polymeric fraction. J. Agric. Food Chem. 48, 1405-1410.

Balice V., Boari G., Cera O., Abbaticchio P. (1982). Indagine analitica sulle acque di vegetazione. Nota 1 Inquinamento 7, 49-53.

Balice V., Carrieri, C., Cera O., Rindome B. (1988). The fate of tannin-loke compounds from olive mill effluents in biological treatments. In Hall

ER and Hobson PN (eds) proceedings of the Fifth International Symposium on Anaerobic Digestion, Bologna Italy, Academic Press, 275-280.

Bartolini S., Capasso R., Evidente A., Giorgelli F., Vitagliano C. (1994). Effect of olive oil mill waste waters and their main polyphenols on leaf and fruit abscission. *Acta Horticulturae*, 356: 292-296.

Bautista J., Hernandez-Pinzon I., Alais M., Parrado J., Millan F.(1996). Low-molecular weight sunflower protein hydrolysate with low concentration in aromatic aminoacids, *J. Agric. Food Chem.*, 47, 967-971

Bell A.A., Wheeler M.H. (1986). Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24, 411-451

Blumenkrantz N. e Asboe-Hansen G. (1973). New mehod for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 54, 484-489

Bondioli P., Mariani C., Lanzani A., Fedeli E., Muller A. (1993). Squalene recovery from olive oil deodorizer distillates. *JAOCS* 70 (8) 763-766.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254

Capasso R., Cristinzio G., Evidente A., Scognamiglio F. (1992a). Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable waste waters. *Phytochemistry*, 31, 4125-4128;

Capasso R., Evidente A., Scognamiglio F., (1992b). A simple thin layer chromatographic method to detect the main polyphenols occurring in olive oil vegetation waters. *Phytochemical analysis* 3, 270-275.

Capasso R., Evidente A., Visca C., (1994a). Production of hydroxytyrosol by chromatography of olive oil vegetation waters. *Agrochimica* 38, 165-171.

Capasso R., Evidente A., Tremblay E., Sala A., Santoro C., Cristinzio G., e Scognamiglio F. (1994b). Direct and mediated effects on *Bactrocera oleae* Gmelin of natural polyphenols and some related synthetic compounds: structure activity relationship. *J. Chemical Ecology*, 20, 1189-1199

Capasso R. e Evidente A. (1995a). Metodi cromatografici e spettroscopici per l'isolamento e l'identificazione di composti organici nelle acque di vegetazione. Atti Convegno P.A.N.D.A. (Tecnologie avanzate per l'agricoltura) Roma (CNR), 10-11 aprile 1995, p. 169-172.

Capasso R., Evidente A., Schivo L., Orru G., Marcialis M. A., Cristinzio G. (1995b). Antibacterial polyphenols from OMW. *The Journal of Applied Bacteriology* 79, 393-8.

Capasso R., Evidente A., Cutignano A. (1996a). Recupero di un composto fungistatico non fenolico da acque di vegetazione delle olive. Atti XIII Convegno Nazionale della Società Italiana di Chimica Agraria. Bologna, 219-223.

Capasso R., Evidente A., Visca C., Gianfreda, L., Maremonti, M., Greco G. J. (1996b). Production of glucose and bioactive aglycone by chemical and enzymatic hydrolysis of purified oleuropein from *Olea europea*. *Appl. Biochem. And Biotech.* 60, 365-377

Capasso R., Colombo C., Violante A., Scognamiglio F. (1998). Procedimento di assorbimento su matrice solida delle acque di vegetazione effluenti dai frantoi oleari. Brevetto Ministero Industria, Commercio ed Artigianato n. 01290945.

Capasso R., Evidente A., Avolio S., Solla F. (1999). A Highly convenient synthesis of hydroxytyrosol and its recovery from Agricultural Waste Waters. *J. Agric. Food Chemistry*, 47, 4, 1745-1748.

Chimi H. Sadik A., Le Tutor B., Rahamani M. (1988). Contribution a l'etude comparative des pouvoirs antioxydants dans l'huile d'olive du tyrosol, de l'hydroxytyrosol, de l'acide cafeique, de l'oleuropeine et du BHT. *Revue Francaise des Corps Gras*, 8/9:339-344.

Dalcanale E. (1996). *Comprehensive supramolecular chemistry*. Elsevier Science, Oxford (UK), Vol. 10, Chapter 20, 583.

Dayoff M.O. (1978). *Atlas of protein sequence and structure*. National Biomedical Research Foundation., 121, 404-427

Di Giovacchino L. (1996). I sottoprodotti della lavorazione delle olive. Seminario Internazionale: Trattamento e Riciclaggio in Agricoltura dei Sottoprodotti dell'Industria Olearia, Lecce, 8-9 marzo, 1-6

Drake L.R., Lin S. e Rayson G. D. (1996). Chemical modification and metal binding of *Datura innoxia*. *Environ. Sci. Technol*, 30, 110-114

Faliagas C. (1995). Chemical composition of olive by product and modification through enzymatic treatment. *J. Sci. Food Agric*. 69, 27-32.

Fantozzi P. (1996). Tecniche di estrazione e purificazione di antiossidanti naturali. In: *Antiossidanti Naturali negli Alimenti*, (a cura di Conte L., Dalla Rosa M., Zamorani A.) 13-25, Sottoprogetto 4, CNR-Raisa, Roma

Federici F., Montedoro G., Servili M., Petruccioli M. (1988). Pectic enzyme production by *Cryptococcus albious* var. *albidus* on olive

vegetation waters enriched with sunflower calathide meal, *Biological Wastes* 25, 291-301.

Fernandez Diaz M. J. (1983). Olives. In Rehm HJ, Reed G. (eds) *Biotechnology*, 5, Verlag Chemie, Weinheim, pp 379-397, 1983.

Fiestas Ros de Ursinos, J. A. 1981. Differentes utilisations des margines. In proc. Of Seminaire international sur la valorisation des sous-produits de l'olivier. FAO-UNAP Tunisia pp 93-110

Fleming H. P. Walter, W. M. jr., Etchells, J. L. 1973. *Appl. Microb.* 26, 777.

Fung F., Scheffer F.L. e Kirk P.K. (1953). The ultramicro-determination of glycogen in liver. A comparison of anthrone and reducing sugars methods. *Archives Biochemica Biophysica Acta*, 71, 319-326

Giulietti A. M., Ercoli E., Ertola, R. (1984). Purification and utilization of olive black water and distillery slops by microbial treatment. *Acta Cient Venez*, 35, 76-86.

Hagerman A.E., Riedl K.M., Jones A., Sovik K.N., Ritchard N.T., Hartzfeld P.W., Riechel T.L. (1998). High molecular weight plant polyphenolics (Tannins) as biological antioxidant. *J. Agric. Food Chem.* 46, 1887-1892

Halliwell B. (1990). Low to characterize a biological antioxidant. *Free Rad. Res. Comms.* 9(1), 1-32

Hamdi M. (1993). Utilità della microbiologia industriale nell'avvaloramento e nel trattamento delle acque reflue dei frantoi. *Scienza e Tecnica*, 46, 20-24.

Iacobellis N. S., Surico G., Evidente A, Iasiello I., Randazzo G. (1985). Note preliminari sulla identificazione di alcune citocinine estratte da liquidi colturali di *Pseudomonas syringae* (Smith) Yung et al. Pv. savastanoi. *Phytopathologica Mediterranea*, 24, 315-318.

Ielmini M., Sanna M., Pelosi N., (1976). Indagine sulle acque di rifiuto degli stabilimenti di produzione olearia in provincia di Roma: possibilità di depurazione: *Industrie Alimentare* 15, 123-131.

Iniotakis N., Israelides C., Katsaboxakis K., Michailides D., Iconomou D., Papanicolau D. (1990). Ecological and economical utilization of waste water from olive oil products with physicochemical and biotechnological methods. EEC Simposyuum on treatment and use of sewage sludge and liquid agriculture wastes. 1-4 Oct 1990, Athens, Greece.

Jenning A. C. (1981). The determination of dydroxyphenolic compounds in extracts of plants tissue. *Analitical Biochemistry*, 118, 396-398.

Kang K.S. e Flbeck G.T., JR. (1965) A comparison of the alkaline extract of tissues of *Aspergillus niger* with umic acid from three soils. *Soil Science*, 99, 175-181.

Kolthoff I.M., Sandell E.B., Heenan E:J., Stanley B. (1992). *Analisi chimica quantitativa* Vol. 2, 1214, Tabella A.7. Piccin Editore

Lee Y, Howard L.R., Villalon B. (1995). Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars. *J.Food Sci.* 60, (3), 473-476

Lehn J.M. (1995). *Supramolecular chemistry concepts and perspective.* VCH Weinheim, 139

Linhares L.F. and Martin J. P. (1979) Carbohydrate content of fungal humic acid -type polymers (melanins). *Soil Sci. Soc. Am. J.* 43, 313-318.

Lo Scalzo R., Scarpati M. L., (1993). A new secoiridoid from olive waste waters. *J. Nat. Prod.* 56, 621-623.

Lotti G. (1985). *Principi di chimica e biochimica vegetale*. Vol.1, p. 368, ETS Editrice

Martilotti F. (1983): Use of olive by-products in animal feeding in Italy. Division de la production et de la santè animale. FAO, Rome.

Modica G. (1987). Lo smaltimento delle acque reflue dei frantoi oleari. *Infor. Agrario* 41, 81-82

Montedoro G., Regliomini A. L., Servili M., Petruccioli M., Federici F. (1993). Pectinase production from olive vegetation waters and its use in the mechanical olive oil extraction process to increase oil yield and improve quality. *Italian J. Food Science*, 4, 355-62.

Motohiro N., Mimoru H., Yohi U., (1998). The CH/ $\pi$  interaction. Evidence, nature and consequences. Wiley-VCH, 1-203.

Omar J.M.A. 1995 Utilization of olive cake in fattening rations. France

Pacifico A. (1989). Acque di vegetazione. In: *Agricoltura ed Innovazione*. Not. ENEA RENAGRI, 11

Panizzi L. M., Scarpati M. L., Oriente E. G. (1960). Costituzione della oleuropeina, glucoside amaro ad azione ipotensiva dell'olivo. Nota II. *Gazz. Chim. Ital.* 90, 1449-1485.

Perez J., Hernandez M.T., Ramos-Cormenzana A., Martinez J. (1987). Caracterizacion de fenoles del pigmento del alpechin y transformacion por *Phanerochaete chrysosporium*. *Grasas y Aceites*, 38, 367-371

Petruccioli M., Servilli M., Montedoro F., Federici F. (1988). Development of recycle procedure for the utilization of vegetation waters in the olive-oil extraction process. *Biotechnol. Lett*, 10, 55-60.

Ragazzi E., Veronese G., Pietrogrande A. (1967). Ricerche sui componenti idrosolubili delle olive. Nota II. Pigmenti e Polisaccaridi. *Annali di Chimica*, 1398-1413

Ranalli A. (1990). Tecnologie di risanamento e recupero delle acque reflue degli oleifici. Parte I e II. *Genio rurale*, 4, 27-54.

Rice-Evans C.A., Miller N.J., (1996). Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem. Soc. Trans.* 24,790- 795.

Rodriguez-Lopez J.N., Tudela J., Varon R., Garcia Cormenzana F. (1992). Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.* 267, 3801-3810

Ross J., Sanchez F., Millan F., Murphy D. (1993). Differential presence of oleosins in oleogenic seed and mesocarp tissues in olive (*Olea europaea*) and avocado (*Persea americana*). *Plant Science* 93, 203-210.

Salami M., Galli C., De Angelis L., Visioli F. (1995). Formation of F2-isoprostanes in oxidized LDL: protective effect of hydroxytyrosol. *Pharm. Res.*, 31, 225-279.

Salvemini F. (1985). Composizione chimica e valutazione biologica di un mangime ottenuto essiccando termicamente le acque di vegetazione delle olive. Riv. Delle Sostanze grasse, 112, 559-564.

Saviozzi A., Riffaldi R., Levi-Minzi R., Scagnozzi A., Vanni G. (1993). Decomposition of vegetation-water sludge in soil. Bioresource Technology, 44, 223-228

Schlösser E. (1983). Praformierte chemische Abwehrstoffe in Pflanzen. Berichte Deutsche Botanische Gesellschaft, 96, 351-356.

Servili M., Montedoro G. (1989). Recupero di polifenoli dalle acque di vegetazione delle olive e valutazione del loro potere antiossidante, Industrie Alimentari, XXVIII, 1, 9-14.

Silverstein, Bassler and Morrill (1981). Spectrometric e identification of organic compounds, 4<sup>a</sup> Edizione

Tanchev S., Joncheva N., Genov N., Codounts M. (1980). Identification of anthocyanins contained in olives. Georgike Ereuna 4, 5-13

Vaccarino C., Lo Curto R., Tripodo M. M., Lagana G., Patene R., Munao F. (1986). Vegetation water treatment by aerobic fermentation with fungi. Simposio Internacional sobre Valorizacion de los subproductos del olivar, alpechin y orujo. 5-6-7 March, Seville, Spain, pp 23.

Valiente C. (1995). Composicion de la fibra alimentaria en el orujo de aceituna. Aminoacidos asociados a la fibra insoluble, soluble y total. Grasas y Aceites, 46,2, 98-102.

Visioli F., Galli C. (1994). Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. Life Sciences 55, 24, 1965-1971.

Visioli F., Galli C. (1995). Natural antioxidants and prevention of coronary heart disease: the potential role of olive oil and its minor constituents. *Nutr. Metabol. Cardiovasc. Dis.* 5, 306-314.

Visioli F., Vinceri F.F., Galli C. (1995). "Waste waters" from olive oil production are rich in natural antioxidants. *Experientia* 51, 1, 32-34.

Whitburn K.D., Shich J.J., Sellar R.M., Hoffman M.Z., Taub I.A. (1982). Redox transformation in ferrimyoglobin induced by radiation generated free radicals in aqueous solution. *J. Biol. Chem.*, 257, 1860-1869

## **ABSTRACT DELLA TESI DI DOTTORATO DEL DOTT. DE MARTINO ANTONIO**

Le acque di vegetazione (AV) rappresentano dopo le sanse il secondo sottoprodotto della lavorazione delle olive. Esse sono prodotte in grande abbondanza soprattutto in Italia e negli altri paesi del bacino del Mediterraneo in ragione di 0,4 m<sup>3</sup>/t di olive nella lavorazione con metodo discontinuo o a pressione e 1-1,5 m<sup>3</sup>/t di olive nella lavorazione con metodo continuo o per centrifugazione.

Le AV possiedono proprietà inquinanti per cui non possono essere smaltite negli impianti di depurazione pubblici e, solo limitatamente e secondo le norme dei paesi europei produttori possono essere sparse in campo. D'altra parte, esse sono ricche di prodotti organici ed inorganici per cui possono essere considerate una fonte di prodotti di potenziale interesse economico.

Nell'ambito di un piano triennale di ricerca è stata studiata la frazione polimerica delle AV con l'obiettivo finale di un riutilizzo in agricoltura come fertilizzante e/o ammendante, nell'industria alimentare per le proprietà antiossidanti ed in processi tecnologici come biofiltro per la decontaminazione di effluenti contenenti metalli tossici e/o indesiderati o come vettori di micro e macroelementi per la nutrizione vegetale.

Mediante precipitazione metanolica e dialisi è stata recuperata la frazione polimerica dalle AV denominandola polimerina AVD; essa mediante cromatografia a fase inversa è stata frazionata in due sub-unità di diverso peso molecolare e composizione. La polimerina AVD è stata caratterizzata chimicamente e biologicamente.

Per la caratterizzazione chimica sono state condotte analisi all'infrarosso (DRIFT), analisi dei fenoli (colorimetricamente con saggio di Folin-Ciocalteu e mediante cromatografia liquida ad alta risoluzione o HPLC), degli zuccheri (colorimetricamente con il reattivo dell'antrone e mediante cromatografia ionica o HPAEC-PAD), delle proteine (colorimetricamente con il metodo Bradford e mediante cromatografia ionica impiegando un analizzatore di amminoacidi), analisi di cationi (mediante spettroscopia ad assorbimento atomico o AAS). Inoltre, è stato determinato il peso molecolare relativo mediante cromatografia su setacci molecolari. Lo studio dell'attività biologica della polimerina AVD è stata condotta mediante prove di fitotossicità su foglioline cotiledonari di pomodoro e mediante saggi di attività antiossidante.

La polimerina AVD per essere ulteriormente caratterizzata è stata idrolizzata con HCl 2N a ricadere per 4 ore. Il precipitato recuperato mediante centrifugazione è stato ridisciolti con idrossido di potassio.

Tale prodotto denominato polimerina AVDK è stato sottoposto come per la polimerina AVD a indagini chimiche e biologiche. Per la caratterizzazione chimica sono state condotte analisi all'infrarosso (DRIFT), analisi dei fenoli (colorimetricamente con saggio di Folin-Ciocalteu), degli zuccheri (colorimetricamente con il reattivo dell'antrone), delle proteine (colorimetricamente con il metodo Bradford e mediante cromatografia ionica impiegando un analizzatore di amminoacidi), analisi di cationi (mediante AAS). Inoltre abbiamo determinato il peso molecolare relativo mediante cromatografia su setacci molecolari. Lo studio dell'attività biologica della polimerina AVDK è stata condotta mediante prove di fitotossicità su foglioline cotiledonari di pomodoro e mediante saggi di attività antiossidante.

Inoltre la polimerina AVD e la polimerina AVDK in prove di scambio con i cloruri di rame, ferro, zinco, manganese e alluminio hanno manifestato la capacità di caricarsi con i metalli utilizzati per lo scambio espellendo parte di quelli costitutivi.

Inoltre la polimerina AVD è stata utilizzata per desalificare acque marine e per decontaminare soluzioni contenenti miscele di metalli pesanti. In entrambi i casi la polimerina ha manifestato di caricarsi con i metalli utilizzati per lo scambio.