



Università
Ca'Foscari
Venezia

Corso di laurea magistrale in biotecnologie per l'ambiente e
lo sviluppo sostenibile

Tesi di laurea

Valorizzazione di alghe rosse Gracilaria per l'estrazione di agarosio
mediante processi innovativi di pretrattamento ed estrazione

Relatrici

Prof.ssa Cristina Cavinato

Prof.ssa Valentina Beghetto

Correlatrici

Dott.ssa Francesca Mazzolini

Dott.ssa Manuela Facchin

Laureanda:

Ilaria Botto

Matricola 892802

Anno accademico
2022/2023

INDICE

ABSTRACT	3
1. INTRODUZIONE	4
1.1 GRACILARIA	4
1.2 AGAROSIO	5
1.3 PRETRATTAMENTI	6
1.4 METODI DI ESTRAZIONE	7
1.4.1 Liquidi ionici	7
1.4.2 Ultrasuoni	8
2. STATO DELL ARTE	10
3. SCOPO DELLA TESI	12
4. MATERIALI E METODI	13
4.1 SUBSTRATO	13
4.2 ANALISI CHIMICO-FISICHE	13
4.2.1 Domanda chimica di ossigeno (COD)	13
4.2.2 Domanda chimica di ossigeno della componente solubile (sCOD)	14
4.2.3 Solidi totali (TS) e solidi volatili totali (TVS)	14
4.2.4 Analisi chimica delle fibre	15
4.2.5 Analisi dei carboidrati	16
4.3 PRETRATTAMENTO ALCALINO	16
4.4 PRETRATTAMENTO A ULTRASUONI	17
4.5 ESTRAZIONE CON LIQUIDI IONICI	17
4.5.1 Estrazione su alghe pretrattate con NaOH (3%)	17
4.5.2 Estrazione su alghe pretrattate con ultrasuoni	18
4.6 ESTRAZIONE COMBINATA	19
5. RISULTATI E DISCUSSIONE	21
5.1 CARATTERIZZAZIONE DEL SUBSTRATO	21
5.2 PRETRATTAMENTO NaOH	23
5.2.1 Riciclo della soluzione basica (NaOH 3%) (rNaOH)	25
5.3 PRETRATTAMENTO A ULTRASUONI	26
5.3.1 sCOD e carboidrati	26
5.3.2 Zolfo e proteine	30
5.4 ESTRAZIONE CON LIQUIDI IONICI	31
5.4.1 Estrazioni su pretrattato NaOH 3%	31
5.4.2 Estrazioni su pretrattato con riciclo di NaOH 3%	33
5.4.3 Estrazioni su pretrattato con ultrasuoni	35

5.5	ESTRAZIONE COMBINATA.....	37
5.5.1	Resa e purezza.....	37
5.5.2	Zolfo e proteine	40
5.5.3	sCOD e carboidrati.....	43
6.	CONCLUSIONE.....	45
7.	ALLEGATI.....	46
7.1	ALLEGATO 1	46
7.2	ALLEGATO 2	50
8.	BIBLIOGRAFIA.....	56

ABSTRACT

In questo studio alcuni campioni di alghe del genere *Gracilaria* sono stati rivalorizzati utilizzandoli per l'estrazione di agarosio. Il metodo tradizionale prevede un pretrattamento alcalino per l'eliminazione delle impurezze che è stato confrontato con un metodo innovativo di pretrattamento a ultrasuoni. Per favorire l'estrazione e l'isolamento dell'agarosio, sono stati sintetizzati tre liquidi ionici (ILs) a base di colina come catione e variando l'anione a partire da acido laurico, acido decanoico e acido oleico da idrolisi di olio di frittura esausto. I risultati così ottenuti sono stati messi a confronto.

Al fine di ottimizzare il processo è stata proposta una strategia innovativa, sia per ridurre i passaggi sia le tempistiche di estrazione, che prevede l'utilizzo di ultrasuoni in concomitanza con i ILs (*one pot*) sul campione non pretrattato. La stessa procedura è stata applicata anche sulle alghe pretrattate con idrossido di sodio per valutare, in questo caso, un eventuale effetto migliorativo degli ultrasuoni nell'estrazione di agarosio.

Gli estratti sono stati caratterizzati mediante FT-IR e analisi elementare e sono state calcolate le rese grezze e la purezza di ogni campione.

Da questa prima analisi si è potuto stabilire che gli ultrasuoni come pretrattamento non sono efficaci tanto quanto il pretrattamento alcalino tradizionale. Il liquido ionico che ha dato i migliori risultati in termini di resa grezza è stato l'oleico bio-based con un valore pari al 27%. Per quanto riguarda l'estrazione combinata US e ILs, i risultati migliori si sono ottenuti alle condizioni di 10 min ad 80°C con una resa grezza del 16% e una purezza del 84%.

1. INTRODUZIONE

1.1 GRACILARIA

Le alghe rosse del genere *Gracilaria* sono rappresentate da più di 160 specie e vengono utilizzate per l'estrazione e la produzione di diverse sostanze fitochimiche. Queste macroalghe sono considerate risorse economicamente utili (Francavilla et al., 2013) in quanto rappresentano una materia prima che può essere impiegata in diversi ambiti: dalle risorse alimentari umane, all'estrazione di diversi prodotti chimici. Inoltre, la quasi assenza di lignina nella struttura cellulare facilita l'estrazione di polisaccaridi e la depolimerizzazione, utile per la generazione di composti che in seguito possono costituire importanti substrati per la produzione di biocarburante (Albuquerque et al., 2021).

La *Gracilaria* è soggetta al fenomeno dell'eutrofizzazione che consiste in un aumento di nutrienti come azoto e fosforo nell'ambiente marino e che causa una riproduzione incontrollata delle macroalghe, le quali sottraggono ossigeno e spazio agli altri esseri viventi marini. Per esempio, nell'acquacoltura e in particolare negli allevamenti di molluschi, questi fattori causano una moria dei bivalvi, con conseguenti effetti sull'economia (Burkholder & Shumway, 2011). Le alghe del genere *Gracilaria* sono tra le alghe più comuni presenti in Mar Adriatico. In generale esse presentano un corpo filiforme ramificato di colore rosso scuro (Figura 1); crescono nei fondali sabbioso-fangosi costieri e nelle lagune, nelle zone di acque temperate si trovano fino a 20 m di profondità (Mouedden et al., 2024).



Figura 1 Gracilaria Gracilis

Nella parete cellulare e negli spazi intercellulari la *Gracilaria* contiene ficocolloidi, polimeri ad alto peso molecolare come l'agar, gli alginati e le carragenine (R. Zhang et al., 2024). Essi sono la risorsa principale di agar-agar, un carboidrato gelatinoso e non tossico. Le alghe rosse sintetizzano naturalmente molecole contenenti il gruppo solfato, elemento che deve essere eliminato per ottenere agar di alta qualità. In *Gelidium* la desolfatazione avviene naturalmente attraverso un processo enzimatico che ha luogo durante l'estrazione, in *Gracilaria* invece non sono presenti le unità enzimatiche adatte ad operare questa reazione e i solfati non vengono convertiti in altri composti. È quindi necessario sottoporre le alghe a un pretrattamento prima dell'estrazione (Xiao et al., 2021a).

1.2 AGAROSIO

L'agar è un polisaccaride naturale solubile in acqua, estratto principalmente da alghe rosse ed è il primo ficocolloide utilizzato nell'industria alimentare adatto al consumo umano. Esso è ampiamente impiegato come agente gelificante e stabilizzante nel settore alimentare, nei cosmetici e per la produzione prodotti farmaceutici (J. Zhang et al., 2023a).

Dal punto di vista strutturale, l'agarosio è un carboidrato costituito da due componenti principali: l'agarosio e l'agaropectina. In particolare, è composto da un'alternanza di unità di β -D-galattosio legato, con legame glicosidico α (1-3), all'unità 3,6-anidro-L-galattosio (3,6-AG) legata a sua volta ad un'altra unità con legame β (1-4) (Figura 2) (T.-P. Wang et al., 2012). Il gruppo idrossile di L-galattosio è soggetto a sostituzioni, le quali possono includere solfati, metossili e altri composti (Hernández-Carmona et al., 2013). Tali modifiche dipendono dalla specie di alga utilizzata per l'estrazione, dalle condizioni ambientali di crescita, e possono influenzare la capacità gelificante dell'agar (J. Zhang et al., 2023a).

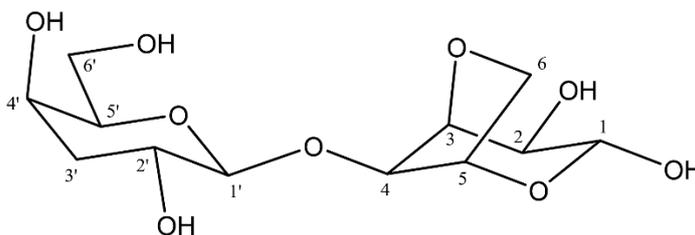


Figura 2 Unità di β -D-galattosio legato all'unità 3,6-anidro- α -L-galattosio con legame β (1-4)

Le alghe del genere *Gracilaria*, rispetto a *Gelidium*, presentano un maggior numero di solfati, a causa di modifiche del C-6' dell'unità 3,6-AG. *Gracilaria* sintetizza il residuo L-galattosio 6-solfato (Figura 3) come un precursore biologico del 3,6-anidro-L-galattosio, ed è enzimaticamente convertito nella forma anidra dalla solfoidrolasi. Tuttavia, l'attività enzimatica di quest'ultima è minore rispetto a quella che avviene in *Gelidium*. Questo si traduce in un numero maggiore di molecole 6-solfato presenti nell'agarosio (Hernández-Carmona et al., 2013).

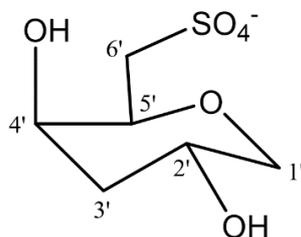


Figura 3 Galattosio 6-solfato

Per questo motivo, l'agarosio estratto da *Gelidium* è di qualità superiore in termini di capacità gelificante rispetto a quello estratto da *Gracilaria*, ma la necessità di trovare nuove fonti ha stimolato la ricerca di nuove risorse per l'estrazione di questo polisaccaride. (J. Zhang et al., 2023a).

Nonostante le specie di *Gracilaria* producano generalmente un agar con minor capacità gelificante sono considerate le più importanti fonti di agar ad uso alimentare. Questo è dovuto

sia al facile accesso al substrato sia alla possibilità di migliorarne la qualità dell'estratto attraverso un pretrattamento alcalino (Hernández-Carmona et al., 2013).

Altri fattori quali le variazioni stagionali, la località geografica, la crescita, l'accesso ai nutrienti e il processo di estrazione influenzano la sintesi e la resa del polisaccaride estratto. (Marinho-Soriano & Bourret, 2003).

Per questi motivi le procedure di estrazione sono estremamente dipendenti da diversi aspetti, ma generalmente consistono in un pretrattamento alcalino, seguito da un' estrazione in acqua ad alte temperature (Martínez-Sanz et al., 2021).

Dal punto di vista applicativo, l'importanza dell'agarosio si riflette nel suo impiego diffuso in diversi ambiti tra cui la microbiologia, la farmaceutica e l'industria alimentare, dove assume ruoli chiave come agente gelificante, stabilizzante (T.-P. Wang et al., 2012).

La crescente domanda di agarosio di alta qualità ha incentivato la ricerca di metodi estrattivi efficienti e sostenibili, e questa tesi si propone di contribuire a tale obiettivo attraverso l'analisi e la comparazione di diverse metodologie estrattive e di pretrattamento. L'approfondimento di questa ricerca mira a cercare la procedura più appropriata, considerando un approccio più eco-compatibile.

1.3 PRETRATTAMENTI

Le tecniche di pretrattamento nelle procedure di estrazione di sostanze come l'agarosio da fonti naturali sono molto importanti per garantire un processo funzionale e un prodotto di qualità (J. Zhang et al., 2023a). I trattamenti a cui vengono sottoposte le alghe prima dell' estrazione hanno lo scopo di rompere le pareti cellulari che contengono la sostanza desiderata, facilitandone l' estrazione nelle fasi successive del processo (Öğretmen & Duyar, 2018). Questa fase è fondamentale per agevolare l' estrazione e la purificazione del prodotto, di fatti il pretrattamento ha anche l'obiettivo di ridurre le impurità presenti nel substrato come pigmenti, proteine e altri composti (Hernández-Carmona et al., 2013).

Le proprietà dell'agar estratto da *Gracilaria* non sono consone ai requisiti richiesti dal mercato proprio a causa dell'alta quantità di solfati, elemento indesiderato, sintetizzato naturalmente dall'alga e presente nell'unità 3,6-AG (Xiao et al., 2023). Gli studi intrapresi nei primi anni del '900 hanno condotto alla consapevolezza che i gruppi solfato possono essere idrolizzati da un trattamento basico (Yanagawa T., 1938).

Per questo motivo il metodo di pretrattamento tradizionale di *Gracilaria* per l' estrazione di agarosio prevede un trattamento alcalino, generalmente costituito da una soluzione a base di NaOH. Modificando alcune variabili del trattamento come la concentrazione di soluto, la temperatura e il tempo di esercizio è possibile ottenere le condizioni ideali per l' estrazione di un ottimo prodotto (J. Zhang et al., 2023a). Diverse ricerche hanno studiato il trattamento alcalino applicato alle diverse specie dell'alga rossa in esame e altri substrati, partendo da una concentrazione di 0.5% v/v di NaOH (Freile-Pelegrin & Robledo, s.d.-a; Hernández-Carmona et al., 2013) fino ad arrivare al 5% (Kumar & Fotedar, 2009) e a un massimo del 10% (Meena et al., 2007; Sharma et al., 2015a).

Tuttavia, questo tipo di pretrattamento ha un impatto negativo sull'ambiente in quanto produce dei liquidi di rifiuto basici che è obbligatorio smaltire in modo adeguato,

sostenendone anche i costi. Inoltre, per riportare il substrato pretrattato a pH 7 è necessario effettuare molti lavaggi con acqua, il che comporta un elevato consumo di questa risorsa; alternativamente, per la neutralizzazione del pretrattato, si possono utilizzare degli acidi con ulteriori costi di produzione e ambientali. (J. Zhang et al., 2023a).

Diversi studi hanno cercato metodi alternativi di estrazione, tra cui l'estrazione enzimatica. Alcuni aspetti positivi di questa tecnica includono la sua natura *eco-friendly*, la produzione ridotta di rifiuti e il minore consumo energetico. Tuttavia, è importante notare la necessità di comprare e utilizzare diversi enzimi come idrolasi e proteasi e procedere nel trattamento secondo le loro condizioni ideali (Xiao et al., 2019, 2021a).

Il presente studio si inserisce in questo contesto, proponendo sia un riciclo delle acque basiche utilizzate nel pretrattamento del substrato, sia la tecnologia a ultrasuoni, alternativa più sostenibile per pretrattare le alghe.

1.4 METODI DI ESTRAZIONE

1.4.1 *Liquidi ionici*

I liquidi ionici sono una classe di solventi costituiti interamente da un catione e un anione. Sono caratterizzati da alcune proprietà fisiche importanti come la stabilità chimica e termica, la bassa volatilità e il basso punto di fusione (Petkovic et al., 2010).

Si tratta di una classe di solventi più “green” rispetto ai solventi organici (Trivedi & Kumar, 2014), che hanno suscitato un interesse crescente in ambito scientifico grazie alla possibilità di riciclo e riutilizzo senza compromettere la resa di prodotto (Sharma et al., 2015a).

Negli ultimi anni diversi studi hanno focalizzato l'attenzione sui possibili utilizzi di questi polimeri, dimostrando un grande potenziale nelle separazioni e nelle estrazioni di diverso genere: dalla dissoluzione di biomassa lignocellulosica (Da Costa Lopes et al., 2013), ai lipidi (Sneha et al., 2023), a quella delle proteine (Suarez Garcia et al., 2023). I liquidi ionici sono stati utilizzati anche come mezzo per estrarre diverse sostanze fitochimiche tra cui l'agarosio; infatti, secondo alcuni studi la presenza di specifici ioni può influenzare la solubilità dell'agarosio, migliorandone la selettività nel processo di precipitazione (Trivedi & Kumar, 2014).

Quando i liquidi ionici sono composti da un sale d'ammonio quaternario come la colina, e un anione derivato da un donatore di idrogeno, generalmente si parla di Deep Eutectic Solvents (DES). Se entrambi gli ioni hanno origine naturale si parla di Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) (Liu et al., 2018). La differenza tra DES e IL è ancor oggi oggetto di dibattito (Płotka-Wasyłka et al., 2020), perciò nell'ambito di questa tesi, i composti sintetizzati verranno nominati come LI.

In questo lavoro sono stati sintetizzati e testati tre liquidi ionici a base di colina monocarbonato (Figura 4), cui anione è costituito da acido laurico LI (I), acido decanoico LI (II) e acido oleico da idrolisi di olio di frittura esausto LI (III). L'efficacia di LI (I) in questo ambito è già stato materiale di studio (Sharma et al., 2015a).

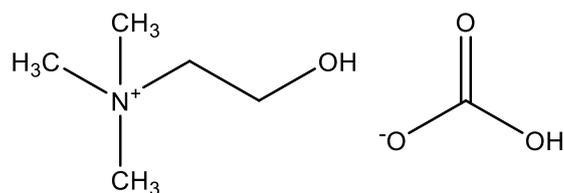


Figura 4 Colina monocarbonato

La presente trattazione si propone di esaminare in dettaglio l'applicazione dei tre diversi liquidi ionici nell'ambito delle estrazioni di agarosio, focalizzandosi sulla capacità di ciascun solvente di migliorare la resa grezza e la purezza del prodotto finale. Una particolare attenzione è riposta in LI (III), utilizzato per la prima volta in questo studio; si tratta infatti di un solvente *bio-based* sintetizzato a partire dall'olio esausto, categorizzato come rifiuto urbano. L'utilizzo di questo scarto come materiale di partenza per la sintesi di composti ad alto valore aggiunto, potrebbe rappresentare un'ottima alternativa per la sua rivalorizzazione, inquadrando il progetto in un'ottica di economia circolare.

1.4.2 Ultrasuoni

La tecnologia a ultrasuoni (Figura 5) è un'applicazione innovativa nel campo dell'estrazione di agarosio.



Figura 5 Sonotrodo Getwave 20 kHz generatore Titako mini 400 W utilizzato nella sperimentazione

Le onde si formano grazie a un traduttore che converte l'energia elettrica in energia ultrasonica, queste si propagano nel mezzo, sottoposte ai fenomeni di riflessione e assorbimento. Gli ultrasuoni quando applicati alle estrazioni lavorano generalmente da una frequenza di 20 kHz a 25 kHz, la giusta frequenza consente alle onde di penetrare in diversi materiali, tra cui la parete cellulare delle alghe (Vinatoru et al., 2017).

L'effetto degli ultrasuoni si basa sulla cavitazione, fenomeno che causa la formazione e implosione di bolle microscopiche, chiamate bolle di cavitazione. L'impatto e l'implosione

delle bolle sulla parete cellulare delle alghe ottimizza e influenza le reazioni chimiche (Gómez Barrio et al., 2022). Per quanto riguarda le alghe è riportato che gli ultrasuoni degradino la matrice della pianta in particelle più piccole, causando un aumento della superficie a contatto col solvente che produce un aumento delle interazioni tra il solvente e il composto di interesse (Vinatoru et al., 2017).

Gli ultrasuoni sono stati impiegati con successo in diverse ricerche con le alghe come substrato, tra cui: i) l'idrolisi enzimatica di *Dictyota dichotoma* per la produzione di zuccheri (Romero-Vargas et al., 2023); ii) la biometanazione in cui gli ultrasuoni sono stati utilizzati per migliorare il processo di produzione di metano da *Gracilaria salicornia* (Gondi et al., 2023); e iii) l'estrazione di polisaccaridi contenenti solfati attraverso l'uso di ultrasuoni sfruttando come substrato *Gracilaria birdiae* (Fidelis et al., 2014).

Infine, per quanto riguarda la produzione di agar da *Gelidium*, gli ultrasuoni sono stati esplorati come alternativa ai metodi convenzionali, ma con rese piuttosto basse, del 2-5% per ottenere un prodotto più puro e fino a un 19% omettendo il pretrattamento, ma ottenendo un agarosio di minor qualità (Martínez-Sanz et al., 2021). Questo è uno degli impieghi più recenti di questa tecnologia. Infatti, questo trattamento rappresenta una metodologia avanzata che offre vantaggi significativi come la possibilità di esercitare l'estrazione a basse temperature o per tempi minori rispetto ai metodi tradizionali di estrazione (Gómez Barrio et al., 2022).

Gli ultrasuoni emergono come una tecnologia versatile e promettente per svariati prodotti di estrazione, ed in questo studio viene proposta come soluzione innovativa e alternativa per migliorare l'efficienza e la sostenibilità del processo industriale di estrazione di agarosio, sperimentandone l'utilizzo anche come pretrattamento, con l'obiettivo di valutarne l'efficacia.

2. STATO DELL'ARTE

Ad oggi diverse specie di alghe vengono valorizzate per la produzione di idrocolloidi, in questa categoria di molecole i principali estratti che si possono ottenere sono agar, alginati e carragenine (Chew et al., 2018). L'agar venne scoperto per la prima volta nel 1658, quando in Giappone si usava cuocere le alghe *Gelidium* in acqua calda; è stato il primo ficocolloide usato e uno dei primi ingredienti alimentari approvato come GRAS (*Generally Regarded As Safe*) nel 1972 (Hernández-Carmona et al., 2013).

L'agarosio presente nelle alghe rosse è associato a diverse applicazioni, la sua produzione deriva soprattutto da *Gracilaria* (53%) e dal genere *Gelidium* (44%) (Marinho-Soriano & Bourret, 2003). Entrambe sono le macroalghe maggiormente sfruttate a livello mondiale per l'estrazione di composti ad alto valore aggiunto tra cui l'agarosio (Francavilla et al., 2013).

Nella procedura di estrazione sono impiegati diversi metodi, tra cui quello più antico che prevede l'estrazione con acqua calda, seguita poi da diversi cicli di congelamento-scongelo. Questo metodo è un approccio relativamente semplice e uno dei primi ad essere utilizzato su scala industriale (Hernández-Carmona et al., 2013).

Nel corso degli anni la ricerca è proseguita, migliorando la procedura tradizionale (Kumar et al., 2009) attraverso la scoperta che un pretrattamento alcalino effettuato sul substrato può migliorare la qualità dell'agarosio e accorciare i tempi di reazione (Xiao et al., 2023). Diversi studi si sono susseguiti negli anni sui distinti trattamenti alcalini a cui poter sottoporre le alghe, ad esempio, in alcune pubblicazioni sono stati investigati trattamenti a differenti percentuali di NaOH (1%, 2%, 3% e 5%), variando la temperatura di esercizio (Kumar & Fotedar, 2009); in questa pubblicazione la resa maggiore di prodotto, calcolata su peso secco iniziale di alga, (62%) è stata raggiunta a una temperatura di 30°C, ma anche la quantità di solfati è alta: 7.5%. Altri studi invece si propongono di testare soluzioni più concentrate (10% di NaOH) ad alte temperature (85°C), investigando gli effetti combinati di un trattamento basico e termico (Meena et al., 2007). In questo caso la resa è minore, si tratta del 23%, ma la quantità di solfati è molto più bassa (0.25%).

È evidente che un trattamento basico più aggressivo migliora la qualità dell'agarosio, ma allo stesso tempo la resa diminuisce notevolmente. Inoltre, il trattamento alcalino a livello industriale genera una quantità rilevante di acque basiche che devono essere gestite, compromettendo anche l'ecocompatibilità del processo (J. Zhang et al., 2023a).

La ricerca di altre metodologie è proseguita fino agli studi di applicazione degli ultrasuoni. L'utilizzo di una sonda a ultrasuoni è stato proposto in letteratura per l'estrazione di sostanze fitochimiche, tra cui proteine (Pan-utai et al., 2022) e pigmenti (Brain-Isasi et al., 2022). Per quanto riguarda l'estrazione di agarosio, lo studio di Martínez-Sanz et al. (2021), sottopone l'alga *Gelidium sesquipedale* a un trattamento alcalino; la procedura prevede poi la filtrazione e la raccolta del materiale solido che prima viene posto in acqua e scaldato a 90°C per quattro ore con agitazione continua. Infine, viene aggiunto il sonotrodo a 25kHz, impostato alla massima potenza per 30 minuti (Martínez-Sanz et al., 2021). Un'altra pubblicazione più recente, ma che utilizza il medesimo substrato, non prevede un pretrattamento, infatti, l'alga è direttamente trattata in acqua a 85°C con un sonotrodo a 20 kHz, variando la potenza e il tempo di esercizio (30-45-60 minuti), ottenendo un range di resa compreso tra 4.5% e 6.8% su peso di alga secca (Gómez Barrio et al., 2022).

Con lo scopo di migliorare l'estrazione di agarosio, Sharma et al (2015) ha approfondito l'utilizzo di alcuni liquidi ionici a base di colina carbonato, applicabili alla precipitazione di agarosio, di cui il migliore è risultato essere quello composto da colina carbonato e acido laurico, in quanto ha presentato una resa finale del 14% (Sharma et al., 2015b).

Tuttavia, ad oggi la letteratura è ancora limitata riguardo l'utilizzo di liquidi ionici nell'estrazione di agarosio, così come la sostituzione del trattamento alcalino a favore degli ultrasuoni, e l'utilizzo combinato di liquidi ionici e sonicazione.

3. SCOPO DELLA TESI

La presente ricerca si focalizza sulle fasi più importanti del processo di estrazione di agarosio da alghe rosse, ponendo particolare attenzione alle operazioni di pretrattamento e alle metodologie estrattive; al fine di migliorare la sostenibilità del processo sono state esaminate diverse tecniche.

Partendo dall'analisi delle tecniche di pretrattamento, la tesi propone un approccio alternativo al tradizionale pretrattamento alcalino, mirato a diminuire il consumo d'acqua e a eliminare la necessità di gestire acque di scarto basiche. L'obiettivo è stato perseguito mediante la proposta di un metodo basato sull'applicazione di ultrasuoni per il pretrattamento delle alghe.

Per quanto riguarda i metodi di estrazione, lo scopo del presente studio è valutare l'efficacia dei liquidi ionici in esame, come specificato nel paragrafo 1.4.11.4.1: LI (I), LI (II), LI (III), nella precipitazione di agarosio su alghe pretrattate sia con processo alcalino che con ultrasuoni, operando un confronto dei risultati ottenuti.

Infine, la necessità di individuare alternative ai tradizionali metodi estrattivi ha condotto all'elaborazione e alla valutazione di uno studio preliminare, mirato a esplorare la possibilità di combinare la tecnologia a ultrasuoni con i liquidi ionici per l'estrazione dell'agarosio. Sono state testate diverse densità di potenza e la loro efficacia su diversi tipi di substrato, costituito da alghe seccate, alghe seccate e macinate e alghe pretrattate. Il liquido ionico utilizzato in questa procedura è LI (I), costituito da colina monocarbonato e acido laurico.

L'adozione di ultrasuoni e liquidi ionici rappresenta un tentativo di ottimizzare il processo di estrazione di agarosio, con un'attenzione particolare alla sostenibilità ambientale attraverso una riduzione delle risorse impiegate e ad una diminuzione delle tempistiche di estrazione.

4. MATERIALI E METODI

4.1 SUBSTRATO

L'alga *Gracilaria gracilis* è stata raccolta durante il periodo primaverile nella zona del Delta del Po e trasportata al Campus Scientifico di Mestre, Venezia. In totale sono stati raccolti 5 kg di alghe, di cui 2.5 kg sono state asciugate in stufa a 60°C per 2 giorni come da procedura riportata in letteratura (Satmalee et al., 2023), e successivamente stoccate in barattoli di plastica, mentre i restanti 2.5 kg sono stati congelati tal quali.

Il substrato è stato caratterizzato mediante analisi chimico-fisiche (metodi standard APHA, APAT, AWWA), analisi chimica delle fibre mediante i metodi standard TAPPI: TAPPI T 222 om-22 per la determinazione della lignina insolubile, TAPPI T19-54 per l'olocellulosa e T 429 cm-23 per la cellulosa. Infine, ne è stata studiata la composizione in C, N, O e S utilizzando l'analizzatore elementare Elementar Unicube.

4.2 ANALISI CHIMICO-FISICHE

4.2.1 Domanda chimica di ossigeno (COD)

Il COD rappresenta la quantità di ossigeno necessaria ad ossidare chimicamente tutta la sostanza organica presente nel campione. Il metodo consiste in un'ossidazione in ambiente acido delle sostanze organiche mediante soluzione di bicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$), operando ad elevate temperature. Viene effettuata una titolazione con una soluzione di ferro ammonio solfato (FAS) per determinare l'eccesso di bicromato. Per eliminare le interferenze di cloruri viene aggiunto Ag_2SO_4 .

La reazione ossidoriduttiva che avviene è la seguente:



Procedura

Il campione solido viene posto in stufa a 105°C per 24/48 ore e in seguito viene polverizzato con un mortaio. Si pesano 0,02 g di campione secco in una bilancia analitica e il campione viene trasferito in un vessel in teflon per la successiva digestione.

Nel vessel si aggiungono una punta di spatola di Ag_2SO_4 e $HgSO_4$, 15 ml di $K_2Cr_2O_7$ 0,25 N e 15 ml di H_2SO_4 concentrato. Per la preparazione del bianco si segue lo stesso procedimento solo che vengono aggiunti 10 ml di acqua distillata al posto del campione. Tutti i vessel vengono chiusi e posti all'interno del mineralizzatore a microonde Speedwave® (Berghof Products + Instruments GmbH-Germany, EU). La mineralizzazione avviene in due passaggi: il primo in cui viene raggiunta la temperatura di 175°C in 7 minuti e che viene mantenuta per 40 minuti; nel secondo passaggio si mantiene la temperatura di 50°C per 10 minuti dopo averla raggiunta in 3 minuti. In totale la digestione dura 60 minuti.

Al termine della digestione i vessel vengono lasciati raffreddare prima di trasferire il loro contenuto in beute di vetro con l'aggiunta di 2-3 gocce di ferroina come indicatore e procedere con la loro titolazione.

Si inizia con la titolazione del titolo preparato precedentemente in una beuta con 10 ml di acqua distillata, 15 ml di $K_2Cr_2O_7$ 0,25 N, 15 ml di H_2SO_4 concentrato e ferroina. La soluzione titolante è una soluzione di FAS 0,25 N. Si procede poi col bianco e con il campione. Il viraggio dell'indicatore ferroina coincide con il passaggio del colore della soluzione da verde-azzurro a rosso-marrone scuro che corrisponde al consumo completo di bicromato residuo presente nella soluzione del campione digerito.

Il COD viene calcolato come descritto dall' Equazione 1.

$$\left[COD \left(\frac{gO_2}{kgTS} \right) \right] = \frac{(B - C) \times \left(\frac{V \times N}{T} \right) \times 8}{P}$$

Equazione 1 COD

- N: normalità del bicromato (0,25 N)
- V: volume di $K_2Cr_2O_7$ usato (mL)
- B: volume di FAS usato per la titolazione del bianco (mL)
- C: volume di FAS usato per la titolazione del campione (mL)
- T: volume di FAS usato per la titolazione del titolo (mL)
- P: peso secco (g_{TS})
- 8: peso equivalente dell'ossigeno (g_{O₂} * eq⁻¹)

4.2.2 Domanda chimica di ossigeno della componente solubile (sCOD)

L'sCOD rappresenta il COD solubile. All'interno di una provetta da 10 ml vengono inseriti 1.5 mL di bicromato, 3.75 mL di H_2SO_4 e un totale di 2,5 mL di soluzione acquosa del campione nell'opportuna diluizione. Il bianco viene preparato utilizzando la stessa procedura descritta precedentemente, con l'unica differenza che vengono aggiunti 2.5 mL di acqua distillata al posto del campione.

Le provette vengono poste in incubatore per 2 ore a 150 °C, al termine della digestione viene letta l'assorbanza a 660 nm allo spettrofotometro UV-Vis.

Il valore di sCOD viene calcolato come descritto dall' Equazione 2.

$$\left[sCOD \left(\frac{gO_2}{L} \right) \right] = \frac{Fd \times Ab}{coeff}$$

Equazione 2 sCOD

- *coeff*: 4.1×10^{-4} ; determinato dalla retta di calibrazione.
- Fd: Fattore di diluizione
- Ab: Assorbanza

4.2.3 Solidi totali (TS) e solidi volatili totali (TVS)

I TS rappresentano i solidi totali, ossia tutte le sostanze flottabili, sedimentabili, le particelle colloidali (cui diametro è compreso tra 0.01 μm e 1 μm) e il materiale in soluzione.

Per procedere all'analisi dei TS è necessario tarare un crogiolo (P_0) e mettere al suo interno una quantità rappresentativa di campione, pesare poi nuovamente il crogiolo ottenendo il peso

umido (P_1). Il crogiolo è posto in stufa a 105°C per 48 ore. Una volta concluso l'essiccamento il crogiolo è pesato nuovamente ottenendo così il peso del residuo secco (P_2).

Per procedere all'analisi dei TVS (solidi volatili totali) lo stesso crogiolo viene posto a incenerimento in muffola a 585°C per circa 12 ore. Al termine viene effettuata l'ultima pesata e si ottiene così il peso dei solidi totali fissi (P_3).

I TS e i TVS vengono calcolati come descritto in Equazione 3 e in Equazione 4.

$$\left[TS \left(\frac{gTS}{kgTQ} \right) \right] = \frac{P_2 - P_0}{P_1 - P_0} \times 1000$$

Equazione 3 TS

$$\left[TVS \left(\frac{gTVS}{kgTQ} \right) \right] = \frac{(P_2 - P_0) - (P_3 - P_0)}{P_1 - P_0} \times 1000$$

Equazione 4 TVS

4.2.4 *Analisi chimica delle fibre*

Determinazione contenuto di lignina insolubile (TAPPI T 222 om-22)

Per l'analisi, 1 g di fibre macinate viene pesato e introdotto in una beuta da 250 mL con 15 mL di una soluzione di H_2SO_4 al 72% in peso. La soluzione viene miscelata per 2 ore tramite un agitatore magnetico e al termine, la soluzione è trasferita in un pallone da 1L in cui vengono aggiunti 560 mL di H_2O per essere fatta reflussare per 4 ore.

La miscela viene quindi filtrata con un gooch poro 4, precedentemente tarato, e lavata con H_2O fino al raggiungimento del pH neutro, verificato con una cartina tornasole.

La soluzione filtrata contiene la frazione di lignina solubile, mentre il solido rappresenta la frazione di lignina insolubile. Il filtro gooch viene lasciato seccare in stufa per circa 12 ore a 95°C e pesato.

Il contenuto di lignina viene determinato come rapporto percentuale tra la massa filtrata e la massa iniziale.

Determinazione contenuto olocellulosa (TAPPI T19-54)

Per determinare il contenuto di olocellulosa 3 g di fibre macinate vengono pesati e introdotti in un pallone da 250 mL in cui sono aggiunti 120 ml di acqua distillata e un'ancoretta magnetica. Il pallone viene scaldato fino a 70°C e, una volta raggiunta tale temperatura, sono aggiunti 2.5 g di NaClO_2 e 1 mL di acido acetico glaciale.

La soluzione viene lasciata in agitazione a 70°C per 1 ora, al termine della quale vengono aggiunti altri 2.5 g di NaClO_2 e 1 mL di acido acetico glaciale e si attende un'altra ora. La stessa procedura è ripetuta una terza volta. La soluzione viene quindi raffreddata a 10°C e filtrata su un gooch poro 3, precedentemente tarato. Il residuo solido è olocellulosa: essa viene lavata ripetutamente con H_2O fino al raggiungimento di un pH 7. La procedura di lavaggio

continua con 10 mL di metanolo e il solido restante è lasciato seccare in stufa per circa 12 ore a 95°C.

Il contenuto di olocellulosa viene determinato come rapporto percentuale tra la massa filtrata e la massa iniziale.

Determinazione contenuto emicellulosa (TAPPI T429 cm-23)

Per stabilire il contenuto di emicellulosa, viene pesato 1 g di fibre provenienti dal precedente trattamento per la determinazione del contenuto di olocellulosa per porlo in un pallone a 1 collo da 250 mL in cui vengono aggiunti 10 mL di una soluzione di NaOH al 17.50%. Il pallone è mantenuto sotto agitazione per 30 minuti; quindi, al suo interno vengono aggiunti altri 10 mL di soluzione NaOH, mantenendo l'agitazione per altri 30 minuti.

Al termine dell'estrazione sono aggiunti 40 mL di acqua distillata e la soluzione viene filtrata su un gooch poro 3 precedentemente tarato. Il residuo solido viene lavato con acqua fino al raggiungimento di pH 7, poi viene lavato con 200 mL di acido acetico diluito (soluzione al 20%v/v) e infine con altri 200 mL di acqua distillata. Il gooch viene seccato in stufa per circa 12 ore a 95°C e successivamente pesato.

Il solido residuo corrisponde alla cellulosa, il cui contenuto viene determinato come rapporto percentuale tra la massa filtrata e la massa iniziale.

4.2.5 Analisi dei carboidrati

Per l'analisi dei carboidrati è stato seguito un metodo presente in letteratura (Nielsen, 2010), che prevede inizialmente la costruzione della retta di calibrazione usando un glucosio standard, cui concentrazione è compresa in un range tra 0-100 µl, in un volume totale di 2 mL.

Dopo l'identificazione dell'opportuna diluizione dei campioni, in ognuno vengono aggiunti 0.05 ml di fenolo all'80%, la soluzione viene miscelata con un Vortex. In seguito, vengono inseriti 5 mL di H₂SO₄ e la soluzione viene nuovamente miscelata, dopo 10 minuti i campioni sono mantenuti a temperatura costante di 25°C per 10 minuti e infine viene letta l'assorbanza a 490 nm.

La quantità di carboidrati in g/L è stata ricavata dall'equazione Equazione 5

$$\left[\text{carboidrati} \left(\frac{\text{g}}{\text{L}} \right) \right] = \frac{A - q}{m} \times \frac{Fd}{1000}$$

Equazione 5 Carboidrati

- A: assorbanza
- q: -0,0456; determinato dalla retta di calibrazione
- m: 0,0166; determinato dalla retta di calibrazione
- Fd: fattore di diluizione

4.3 PRETRATTAMENTO ALCALINO

Sono stati pesati 5 g di alga *Gracilaria Gracilis* essiccata e scaldati per 3 ore a 85°C in un pallone da 250 ml insieme a 100 mL di soluzione NaOH (3%) (J. Zhang et al., 2023b). Si

procede con una filtrazione usando un filtro gooch, il permeato è stato conservato per i test di riciclo (pretrattamento con riciclo di NaOH (3%)); il residuo solido viene pesato, ottenendo il peso umido (P*).

4.4 PRETRATTAMENTO A ULTRASUONI

Sono stati eseguiti tre test sfruttando la tecnologia a ultrasuoni (US). Tutti i test sono stati condotti con lo strumento Getwave 20 kHz generatore Titako mini 400 W (Everywave), usando una frequenza di 21 kHz su 5g di alga essiccata, in acqua distillata e impostando il sonotrodo a 100 W.

Ogni analisi è stata testata secondo due diverse densità di potenza (1 W/mL e 0.5 W/mL) e la temperatura è stata costantemente controllata. I parametri selezionati per le diverse prove sono i seguenti:

Tabella 1 Parametri del pretrattamento a ultrasuoni, con potenza fissa di 100 W

Test	Tempo di esercizio (minuti)	Temperatura iniziale °C	Temperatura finale °C
PrUS_1	13	25	70
PrUs_2	7	45	70
PrUS_3	5	25	57
PrUS_4	6	25	25

Al termine del trattamento si separano liquido e solido mediante l'uso di una tela filtrante con dimensione dei pori 25 µm. Il residuo solido viene conservato per procedere con l'estrazione, il filtrato viene conservato per analizzarne il contenuto di sCOD e identificare così le migliori condizioni di esercizio.

4.5 ESTRAZIONE CON LIQUIDI IONICI

L'estrazione con i liquidi ionici sintetizzati precedentemente si è svolta su alghe trattate sfruttando diverse tecniche di pretrattamento.

4.5.1 Estrazione su alghe pretrattate con NaOH (3%)

Per determinare la quantità necessaria di ciascun liquido ionico si parte dal peso P* del residuo solido di alga filtrato dopo il trattamento alcalino. Sono state eseguite due serie di test: per la prima serie la quantità utilizzata di ciascun liquido ionico è pari al 4% di P*, per la seconda serie la quantità di ciascun liquido ionico è pari al 3% di P*.

Prima di procedere con l'estrazione, il pH dell'alga è stato abbassato fino a pH neutro utilizzando una soluzione di HCl (10%). Questa fase è importante per promuovere una buona estrazione (Hernández-Carmona et al., 2013).

Per l'estrazione, 5 g di alga pretrattata con soluzione alcalina sono stati riscaldati per 2 ore e 30 minuti in 100 ml di acqua distillata e la quantità calcolata di liquido ionico.

La soluzione è stata trasferita in falcon da 50 ml e centrifugata; il precipitato è stato sottoposto a 3 cicli di lavaggi attraverso centrifugazione a 5000 rpm per 15 minuti: durante il primo lavaggio sono stati aggiunti 5 mL di soluzione di isopropanolo al 50%, nel secondo 5 mL di soluzione di isopropanolo al 75% e nel terzo 5 mL di isopropanolo al 100%.

Il precipitato residuo è stato asciugato in stufa a 40°C, macinato e analizzato attraverso spettrometro FT-IR PerkinElmer Spectrum One. (Kumar & Fotedar, 2009; Sharma et al., 2015c).

4.5.2 Estrazione su alghe pretrattate con ultrasuoni

Il residuo solido di alga pretrattata con ultrasuoni è stato pesato per determinare la quantità necessaria di ciascun liquido ionico. La quantità di liquido ionico utilizzata in ogni estrazione è pari al 4% del peso delle alghe umide.

La procedura seguita per l'estrazione e l'analisi è la stessa seguita per le alghe estratte post-trattamento alcalino (4.5.1).

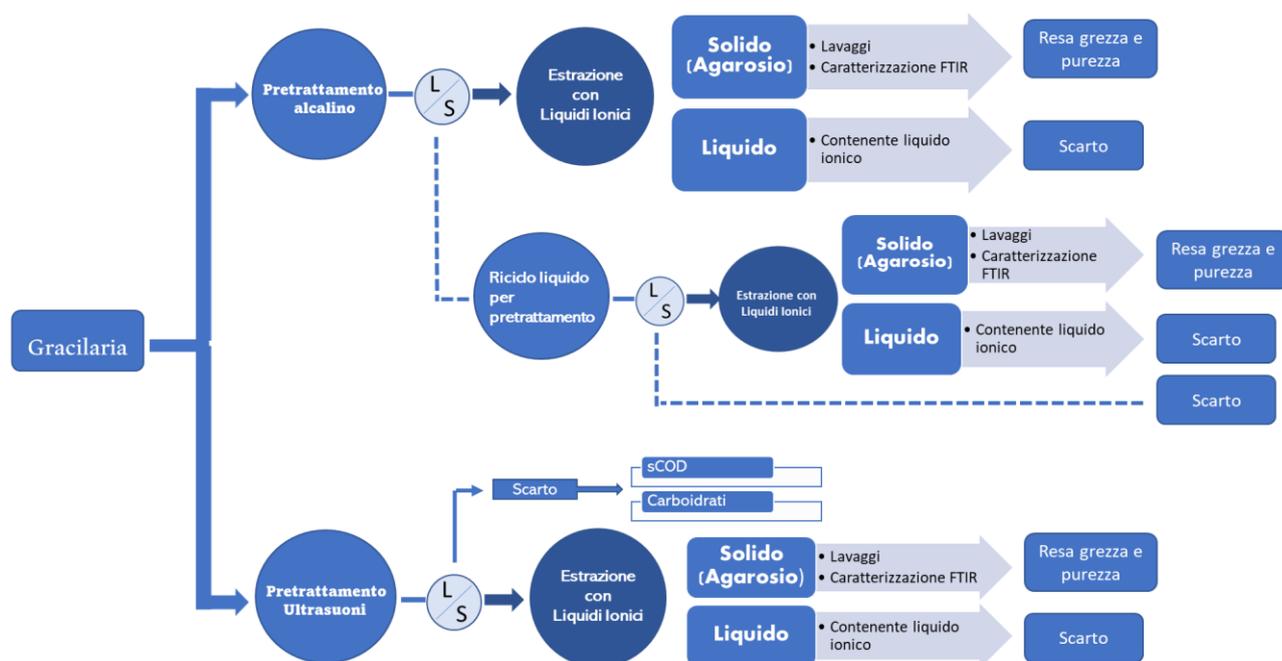


Figura 6 Diagramma di flusso procedura di estrazione con liquidi ionici

4.6 ESTRAZIONE COMBINATA

La procedura di estrazione combinata prevede l'utilizzo contemporaneo della tecnica a ultrasuoni e di LI (I) (ALLEGATO 1). Le prove sono state eseguite su tre diversi tipi di substrato: alga secca tal quale (TQ), alga secca macinata (M) e alga pretrattata con NaOH al 3% (PrNaOH) secondo il metodo descritto in 4.3; ne sono pesati 5 g per ogni estrazione.

Per l'estrazione, 0.20 g di liquido ionico vengono sciolti in 100 ml di acqua distillata. Sono aggiunti 5 g di substrato e il sonotrodo impostato a 100 W e 21 kHz, la frequenza impostata sulla base delle caratteristiche strutturali del sonotrodo.

I test di estrazione svolti sono costituiti da diverse combinazioni dei parametri tempo e temperatura come riportato in Tabella 2.

Tabella 2 Parametri estrazione combinata US e LI, volume di 100 ml e potenza di 100 W

Numero test	Substrato	Temperatura (°C)	Tempo (min.)
1.	TQ	<40	30 min.
2.	M		
3.	NaOH (3%)		
4.	TQ	80	
5.	M		
6.	NaOH (3%)		
7.	TQ	<40	10 min.
8.	M		
9.	NaOH (3%)		
10.	TQ	80	
11.	M		
12.	NaOH (3%)		

Durante alcuni test è stato necessario utilizzare del ghiaccio per mantenere la temperatura all'interno dei parametri prefissati (Figura 7).

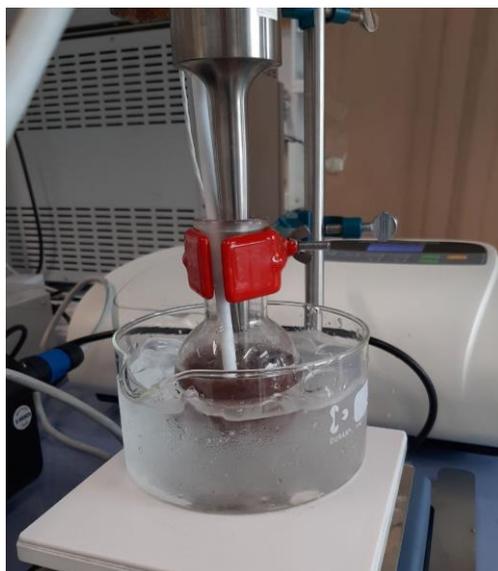


Figura 7 Controllo di temperatura con ghiaccio

Al termine del trattamento la soluzione è trasferita in falcon da 50 ml e centrifugata a 5000 rpm per 15 minuti. Quando presente, lo strato di gel formatosi al di sopra del precipitato è stato separato dal surnatante e ha subito la serie di lavaggi, asciugatura e caratterizzazione precedentemente illustrati in sezione 4.5.1.

Il gel non era presente nelle estrazioni in cui è stato utilizzato un substrato pretrattato con soluzione alcalina (Tabella 2 estrazioni n° 3, 6, 9, 12) in questi casi è stato prelevato e caratterizzato il precipitato.

Ulteriori analisi elementari sono state condotte per identificare la quantità di zolfo presente nel prodotto finale.

Il surnatante è stato conservato e caratterizzato mediante analisi di sCOD e analisi dei carboidrati.

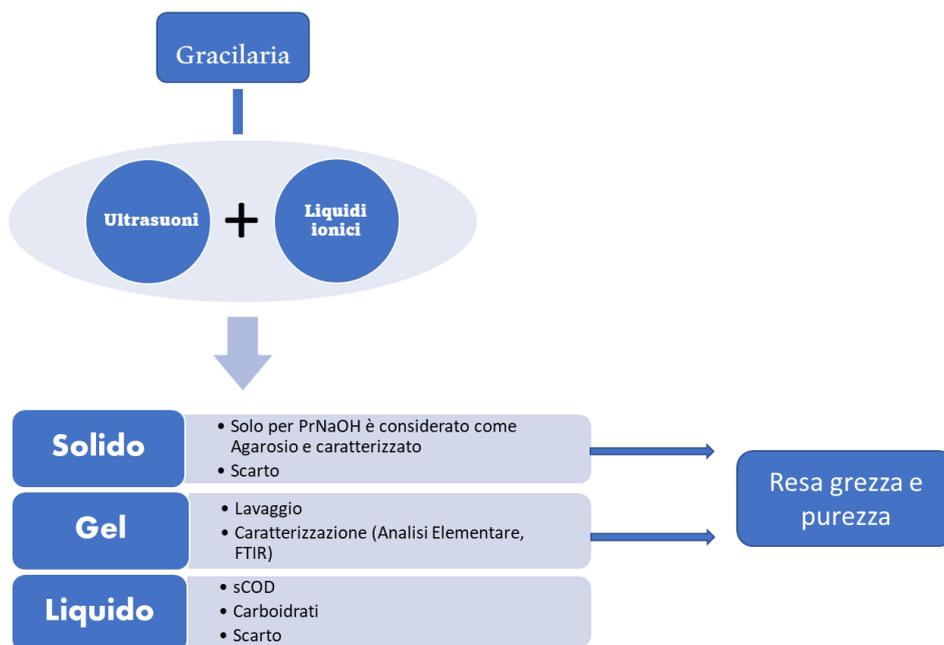


Figura 8 Diagramma di flusso procedura estrazione combinata

5. RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1 CARATTERIZZAZIONE DEL SUBSTRATO

Il substrato utilizzato in questo studio è rappresentato dall'alga *Gracilaria Gracilis* (Figura 10). Si tratta di una matrice complessa, eterogenea che si presenta aggrovigliata su sé stessa. Al momento della raccolta, negli interstizi delle alghe, sono state trovate diverse specie di copepodi di piccole dimensioni e due granchi di grandi dimensioni (Figura 9), successivamente liberati in laguna.



Figura 10 *Gracilaria Gracilis*



Figura 9 Granchi presenti nelle alghe al momento della raccolta

I dati risultanti dalle analisi di caratterizzazione del substrato sono mostrati in Tabella 3 e Tabella 4.

Tabella 3 Composizione biochimica di *Gracilaria Gracilis*

Umidità (%)	COD (gO ₂ /kgTS)	Ceneri (%)	TS (gTS/kgTQ)	TVS (gTVS/kgTQ)	Poteine (%)	N (%)	C (%)	H (%)	S (%)
47	86,57	8	95,64	71,83	20,21	3,33	31,04	4,85	3,019

Tabella 4 Composizione lignocellulosica di *Gracilaria Gracilis*

Lignina (%)	Cellulosa (%)	Olocellulosa (%)	Emicellulosa (%)
1,19	44,42	83,06	38,64

La macroalga analizzata in questo studio presenta un'umidità del 47% su peso secco e una quantità di COD pari a 86,57 (gO₂/kgTS); i dati sono confermati da studi recenti (Mouedden et al., 2024).

La quantità espressa in percentuale di N, C, H, sono in accordo con altri studi (Francavilla et al., 2015), la quantità di S risulta leggermente più alta, questo fattore potrebbe essere soggetto alle variazioni stagionali e alle differenti caratteristiche degli ambienti marini. Un'analisi approfondita della composizione dell'alga in esame ha contribuito a identificarne la specie.

L'analisi chimica delle fibre ha confermato che *Gracilaria Gracilis* presenta un'esigua quantità di lignina (Albuquerque et al., 2021), è invece risultata maggiore la componente cellulosa; esse costituiscono parti strutturali della parete cellulare, all'interno della quale contribuiscono a mantenere resistenza e rigidità. Quantificare la presenza di queste macromolecole è fondamentale quando si affrontano procedure di estrazione di composti come l'agarosio, esse infatti, costituiscono delle impurità che compromettono la qualità dell'estratto e rendono più difficoltosa l'estrazione. I pretrattamenti hanno lo scopo di indebolire la parete cellulare assicurando un'efficacia maggiore di estrazione ed eliminare quanto più possibile la componente lignocellulosica (Chen et al., 2020).

5.2 PRETRATTAMENTO NaOH

Le estrazioni di agarosio da *Gracilaria* prevedono sempre un pretrattamento per eliminare delle componenti indesiderate e per indebolire la parete cellulare dell'alga, preparandola alla fase di estrazione (Öğretmen & Duyar, 2018). La sostanza che deve necessariamente essere abbattuta è lo zolfo, in quanto questo elemento altera la qualità e la purezza del prodotto finale (Sharma et al., 2015a).

Per questo motivo, l'efficacia del pretrattamento alcalino è verificata attraverso il monitoraggio dello zolfo all'interno di alcuni campioni di *Gracilaria* (Xiao et al., 2021b). Il campione di alga è sottoposto ad un trattamento alcalino con concentrazioni crescenti di NaOH comprese in un range da 1 a 10% v/v.

Il risultato di ciascun trattamento è riportato in Figura 11.

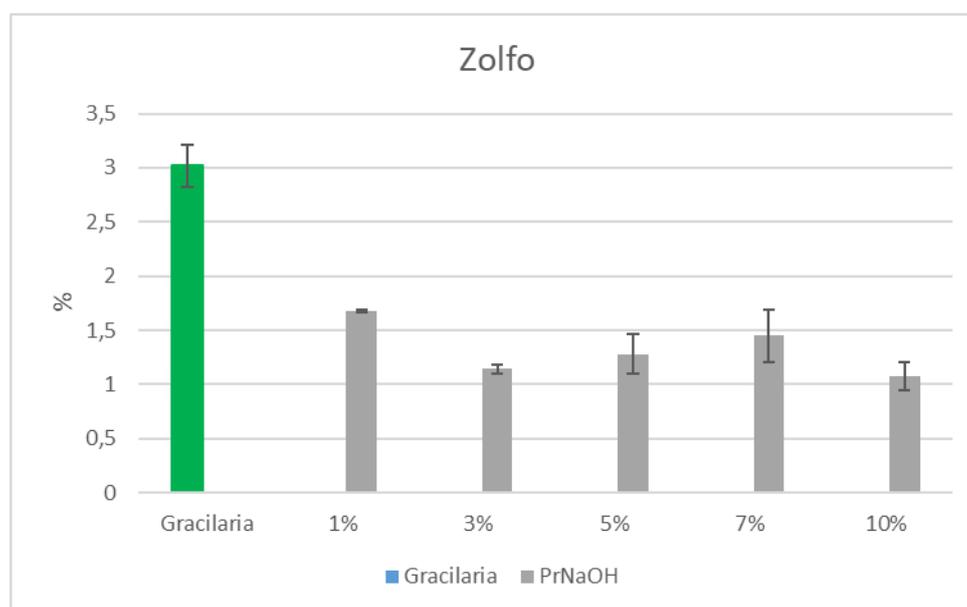


Figura 11 *Quantità di zolfo presente in substrati trattati a diversa concentrazione di NaOH*

Per confrontare l'efficacia del pretrattamento alcalino in funzione della percentuale di NaOH utilizzata, e in base alla percentuale di zolfo residua, si è analizzata anche l'alga non pretrattata, presa come riferimento. L'alga non pretrattata ed esaminata all'analizzatore elementare ha riportato una quantità di zolfo pari a $3.02 \pm 0.2\%$ su peso secco di alga.

La scelta di queste percentuali di NaOH, è dovuto ai riferimenti trovati nella letteratura scientifica; numerosi studi suggeriscono di testare diverse soluzioni per definire i parametri più appropriati a seconda del substrato (Freile-Pelegrin & Robledo, s.d.-b; Hernández-Carmona et al., 2013). In particolare, alcune ricerche si concentrano su soluzioni dal 1% al 5% di NaOH in soluzione (Kumar & Fotedar, 2009; Mohibullah et al., 2023), mentre altre conducono le analisi su un range più vasto, ma mai superando il 10% di soluto (Meena et al., 2007; Sharma et al., 2015a; L. Wang et al., 2017).

Aumentando progressivamente la concentrazione di NaOH in soluzione la quantità di zolfo in ciascun campione è rispettivamente: $1.68 \pm 0.01\%$, $1.14 \pm 0.04\%$, $1.28 \pm 0.18\%$, $1.45 \pm 0.24\%$, $1.07 \pm 0.13\%$.

I risultati suggeriscono che il trattamento al 10% di NaOH è stato il migliore in termini di abbattimento di zolfo, ma confrontandolo con gli altri dati, risulta che il trattamento al 3% di

NaOH ha mostrato un'efficacia simile usufruendo di una quantità molto minore di sostanza chimica. Per questa ragione, il trattamento al 3% di NaOH è stato scelto come il più consono da utilizzare per il pretrattamento del substrato considerato.

In letteratura viene riportato che durante la fase di pretrattamento per l'estrazione di agarosio vengono eliminate anche altre impurità come sali, pigmenti, proteine e altri contaminanti dell'agarosio (Meena et al., 2007). Inoltre, viene descritto anche che la rimozione di queste impurità può avvenire direttamente sull'estratto mediante tecniche di sbiancamento o filtrazione (Xiao et al., 2021b). Tuttavia, in questo studio, non è stata eseguita una valutazione sulla rimozione delle altre impurità; per questo motivo si è voluta testare l'efficacia del pretrattamento andando a quantificare le proteine residue presenti sul liquido filtrato e conservato dopo il trattamento.

Il grafico presente in Figura 12 evidenzia una progressiva diminuzione delle proteine nei campioni pretrattati con NaOH, partendo da una quantità di 20.81 ± 0.04 % fino ad arrivare a 3.89 ± 0.02 %.

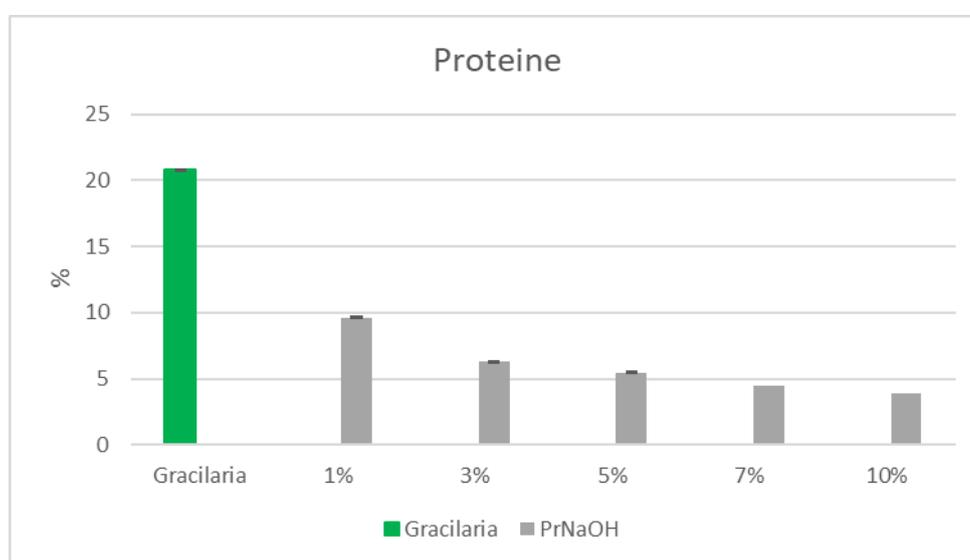


Figura 12 *Quantità di proteine presenti in substrati trattati con diverse concentrazioni di NaOH*

La presenza di una maggiore quantità di NaOH in soluzione ha un effetto positivo nella diminuzione delle proteine all'interno del campione e quindi nella rimozione di quest'ulteriore impurezza. La capacità di allontanare queste macromolecole preventivamente dall'alga ancor prima di iniziare il processo di estrazione potrebbe rivelarsi vantaggioso sia da un punto di vista strutturale della cellula, la quale privata di queste molecole è sempre più indebolita (Chen et al., 2020), sia per semplificare la fase di purificazione (Xiao et al., 2021b).

5.2.1 Riciclo della soluzione basica (NaOH 3%) (rNaOH)

La soluzione alcalina al 3% di idrossido di sodio filtrata è stata conservata per essere riutilizzata come soluzione di pretrattamento su altri campioni di alghe. Il riciclo potrebbe essere una soluzione per evitare lo smaltimento di acque basiche ancora potenzialmente efficaci, diminuendo perciò l'impatto ambientale del processo di estrazione (R. Zhang et al., 2024).

Per determinare l'efficienza del pretrattamento e valutare l'efficacia di estrazione della soluzione di NaOH, è stata svolta un'analisi specifica dei carboidrati rilasciati nelle soluzioni dopo il loro utilizzo. Tuttavia, questa analisi non è specifica per l'agarosio, anch'esso un carboidrato, e quindi non è stato possibile, con questa analisi, stabilire se ci fosse una pre-estrazione di agarosio con conseguente perdita di resa.

In Figura 13 sono evidenziati i carboidrati presenti nella soluzione di NaOH (3%) filtrata dopo il primo pretrattamento (PrNaOH) e nella soluzione di NaOH (3%) riciclata e filtrata dopo il secondo utilizzo (rNaOH). Per quanto riguarda il PrNaOH, esso presenta 14.89 ± 0.002 g/L di carboidrati, mentre nella soluzione riciclata sono presenti 25.67 ± 0.011 g/L di carboidrati. Se confrontati tra loro, il valore per l'rNaOH è il 67% in più rispetto a quello del PrNaOH. Questo indica che la soluzione mantiene gran parte della sua capacità estrattiva, nonostante la presenza in soluzione di carboidrati disciolti derivanti dal primo pretrattamento.

La presenza di agarosio nella soluzione alcalina potrebbe essere la causa della presenza di uno strato di gel sopra al precipitato nelle estrazioni su rNaOH (Figura 21).

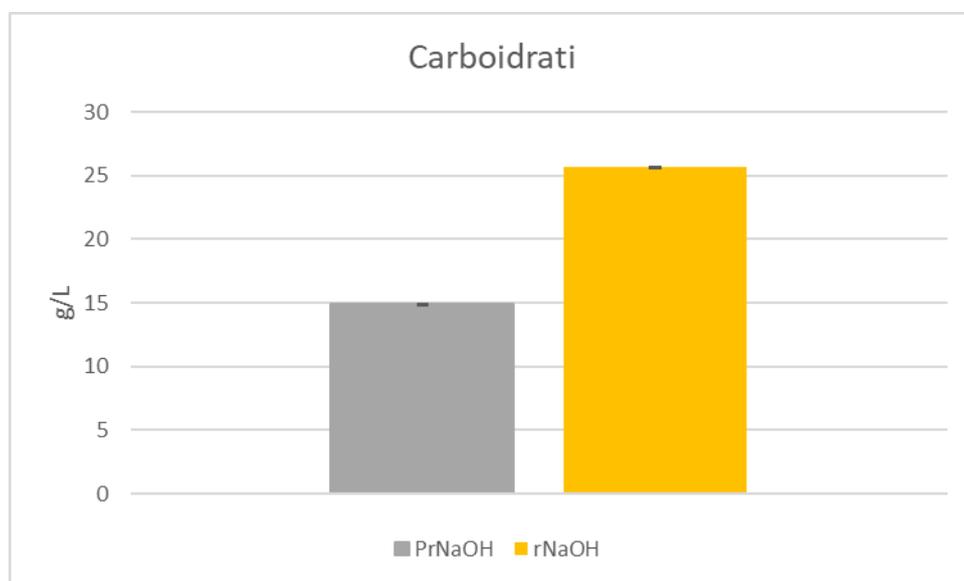


Figura 13 *Quantità di carboidrati in soluzione*

5.3 PRETRATTAMENTO A ULTRASUONI

5.3.1 sCOD e carboidrati

Il trattamento a ultrasuoni è un metodo innovativo e alternativo di pretrattamento; infatti, ad oggi non sono presenti studi che implementano questa tecnologia come pretrattamento alternativo a quello alcalino per l'estrazione di agarosio. Per identificare le migliori condizioni di esercizio sull'alga *Gracilaria Gracilis* sono stati proposti diversi test i cui parametri sono riportati nel paragrafo 4.4 su cui è stato analizzato l'sCOD, riportato in Figura 14.

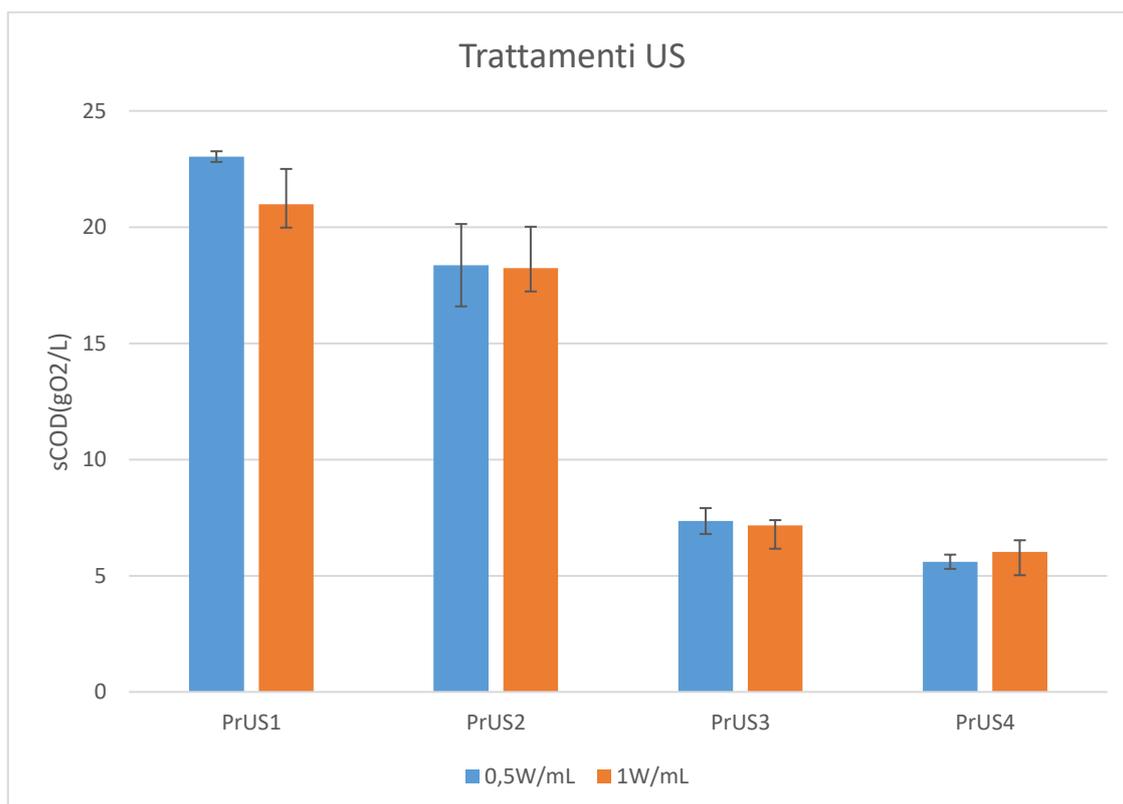


Figura 14 sCOD risultante dai pretrattamenti US su *Gracilaria essiccata*.

Le analisi sono state eseguite sul liquido filtrato derivante dal pretrattamento a ultrasuoni (paragrafo 4.4), in modo da determinare la quantità di sostanze organiche solubili disciolte in soluzione con tale pretrattamento, e capire così l'incidenza sul substrato delle differenti condizioni testate.

Le analisi evidenziano una similarità, in termini di sCOD, tra i campioni trattati che hanno raggiunto 70°C di temperatura per un tempo di 13 minuti e 7 minuti indipendentemente dalla densità di potenza con cui sono stati trattati; si presentano rispettivamente 23.0 ± 0.23 gO₂/L (0.5 W/mL), 21.0 ± 1.52 gO₂/L (1 W/mL) e 18.4 ± 1.77 gO₂/L (0.5W/mL), 18.2 ± 1.78 gO₂/L (1 W/mL). La temperatura potrebbe quindi essere un parametro fondamentale che aumenta la solubilità delle sostanze organiche. Infatti, nei test eseguiti a temperature inferiori (45°C o r.t.) e per un breve tempo (5-6min), il valore di sCOD, sempre indipendente dalla densità di potenza, si attesta attorno al (7.4 ± 0.55 gO₂/L – 5.6 ± 0.3 gO₂/L).

Si precisa che la temperatura raggiunta nei test è effetto del surriscaldamento dovuto all'esercizio del sonotrodo quindi non è necessario fornire ulteriore energia per raggiungere tali temperature.

Tuttavia, è necessario utilizzare un bagno a ghiaccio per un controllo maggiore sulla stabilità della temperatura durante il periodo di esercizio del sonotrodo, soprattutto per i test a temperature inferiori. Per quanto riguarda la densità di potenza, quindi, non è stato possibile notare una differenza significativa tra le prove effettuate a 0.5 W/mL e quelle a 1 W/mL. Per cui, a parità di efficacia, considerando il consumo energetico, è preferibile utilizzare una densità di potenza minore per aumentare l'efficienza energetica e rendere più semplice un futuro scale-up del processo; ciò ha a che vedere anche con le tempistiche: tempi minori di reazione significano anche un minor consumo di energia.

Il valore di sCOD riguardante il test PrUs3 è più che dimezzato rispetto ai precedenti con valori pari a 7.4 ± 0.55 gO₂/L (0.5W/mL) e 7.2 ± 0.23 gO₂/L (1 W/mL); è evidente che l'innalzamento della temperatura in questo caso ha avuto un'incidenza minore, se confrontato con quello a tempistica di 6 minuti a 25°C, i cui risultati sono leggermente inferiori e pari a 5.6 ± 0.30 gO₂/L (0.5 W/mL) e 6.0 ± 0.50 gO₂/L (1 W/mL). Tuttavia, se si considerano i tempi di pretrattamento, il test PrUS3 ha un periodo di esercizio dimezzato rispetto al test PrUS1 e PrUS2.

Quindi, il tempo di reazione e la temperatura di esercizio sono parametri cruciali per il pretrattamento di alghe rosse. L'esposizione al trattamento per tempi maggiori a temperature più elevate ha provocato una maggiore solubilizzazione della sostanza organica presente nel substrato.

I valori presenti nei test PrUS1 e PrUS2, indicano che è stata estratta dall'alga e portata in soluzione una quantità maggiore di sostanza organica. Essa può comprendere impurità come proteine, zuccheri e pigmenti, ma l'sCOD presente potrebbe anche essere costituito, in parte, da agarosio. Quest'ultimo potrebbe essere parzialmente pre-estratto dalle condizioni operative del pretrattamento ad ultrasuoni. Tuttavia, la fase di pretrattamento ha lo scopo di preparare il substrato all'estrazione per cui in questo contesto non deve avvenire una pre-estrazione di agarosio che altrimenti causerebbe una perdita sulla resa finale di agarosio. Valutando questa possibilità, si è deciso di analizzare il liquido anche per la determinazione dei carboidrati disciolti in esso. Tuttavia, l'analisi utilizzata non è selettiva per l'agarosio e quindi solo indicativa sull'ammontare della concentrazione dei carboidrati presenti in soluzione ed estratti con il metodo a ultrasuoni. Questa ulteriore analisi è servita per determinare quale delle condizioni utilizzare per il pretrattamento, per poi proseguire nella fase successiva di estrazione dell'agarosio con liquidi ionici.

Inoltre, per valutare l'effettiva efficacia degli US si è deciso di verificare l'incidenza del solo trattamento termico applicando le stesse condizioni sperimentali utilizzate con i pretrattamenti con US.

I risultati dei trattamenti termici, confrontati con quelli dei trattamenti a US sono mostrati in Tabella 5. I dati ottenuti confermano come la temperatura raggiunta sia un fattore importante nell'estrarre sostanza organica dal substrato. Tuttavia, sebbene i valori di sCOD siano minori rispetto al trattamento a ultrasuoni, i risultati indicando una debole incidenza degli US nell'estrarre la sostanza organica e una maggiore incidenza della temperatura.

Tabella 5 Confronto sCOD in soluzione tra i trattamenti US e i medesimi trattamenti solo termici

	sCOD (gO ₂ /L)			
	US 0.5 W/mL	Termico 0.5 W/ml	US 1W/mL	Termico 1 W/mL
1	23,03	17,36	20,98	19,64
2	18,36	11,72	18,23	11,64
3	7,35	6,86	7,16	7,41
4	5,60	5,47	6,02	4,90

Indicativamente il dato che più si discosta dal precedente è identificato nel test n° 2, in cui nel trattamento termico sono presenti 11.72 ± 0.46 gO₂/L (0.5 W/mL) e 11.64 ± 0.34 gO₂/L (1W/mL). Questa prova è l'unica in cui la temperatura di partenza è maggiore della temperatura ambiente (45°C), per cui l'effetto esclusivamente termico non ha condizionato la solubilità delle sostanze tanto quanto gli ultrasuoni, suggerendo quindi una possibile maggiore efficacia del sonotrodo quando si lavora a temperature iniziali più alte rispetto a quella ambiente.

La minor differenza è evidente nei test 3 e 4 dove sono state utilizzate temperature più basse e tempi di trattamento più brevi. Per cui, in entrambi i casi, la tecnologia a ultrasuoni non ha influito particolarmente nel risultato finale: la stessa quantità di sostanza organica è estraibile sfruttando solo un trattamento termico.

Dato che l'sCOD fornisce solo una valutazione sulla quantità di sostanza organica in soluzione, è consigliabile condurre anche un'analisi separata e specifica sui carboidrati, dato che l'agarosio rientra in questa categoria, per valutare l'incidenza del pretrattamento su questa tipologia di sostanze; i risultati sono mostrati in Figura 15.

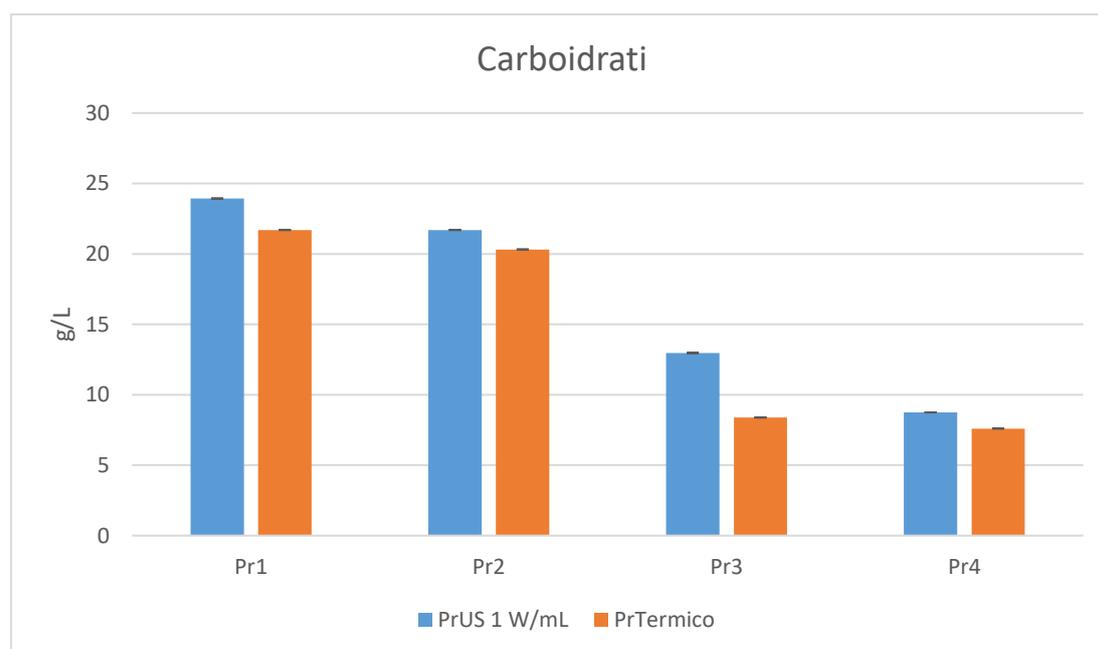


Figura 15 Carboidrati rilasciati in soluzione dopo il pretrattamento US e il pretrattamento termico

La maggior parte dell'sCOD misurato è costituito da carboidrati; è necessario considerare che l'agarosio potrebbe costituire una componente rilevante di questa frazione, anche se non dovrebbe essere rilasciato in soluzione durante questa fase di solo pretrattamento del substrato, in quanto causerebbe una resa finale minore.

L'obiettivo di questa fase è eliminare le impurità e indebolire la parete cellulare, evidenziando la capacità di allontanare dal substrato alcuni carboidrati. Sarebbero necessarie ulteriori analisi per verificare la quantità di agarosio presente tra i carboidrati indicati in Figura 15.

La capacità della tecnologia a ultrasuoni di solubilizzare alcune componenti dell'alga e in particolare l'agarosio è riportata in letteratura (Martínez-Sanz et al., 2021), utilizzando un sonotrodo che lavora a una frequenza di 25 kHz, per 30 minuti a 500 W, mantenendo la temperatura di esercizio a 90°C. L'efficacia è verificata anche da altri studi (Gómez Barrio et al., 2022) in cui sono sfruttate tecnologie a ultrasuoni che lavorano a frequenze più basse (20 k Hz), ma ad alte temperatura (85°C) e per tempistiche maggiori, che vanno dai 30 ai 60 minuti.

Questo effetto degli ultrasuoni è stato confermato dai risultati presentati in Figura 14 e Figura 15, e potrebbe essere utilizzato come pretrattamento se le sostanze quantificate sono effettivamente riconducibili a impurità e non a un rilascio preliminare indesiderato di prodotto.

Date le condizioni presentate in letteratura, la temperatura e il tempo di reazione individuati in questo studio sono minori proprio per evitare la solubilizzazione del prodotto di interesse. Sulla base dei valori di sCOD e carboidrati riportati in Figura 14 e Figura 15, è stata scelta la prova PrUS3 come pretrattamento dell'alga.

5.3.2 Zolfo e proteine

Per completare la caratterizzazione sulle condizioni ottimali di pretrattamento alcalino e a ultrasuoni, è stato determinato il contenuto di zolfo e proteine nel campione solido pretrattato da estrarre, in seguito, con liquidi ionici. I pretrattamenti scelti sono, rispettivamente, quello alcalino al 3% di NaOH e quello con ultrasuoni per 5 minuti da temperatura ambiente a 45°C con una densità di potenza di 0.5 W/mL. Per evidenziarne i risultati, essi sono confrontati in Figura 16 e in Figura 17 con i contenuti di zolfo e proteine dell'alga tal quale.

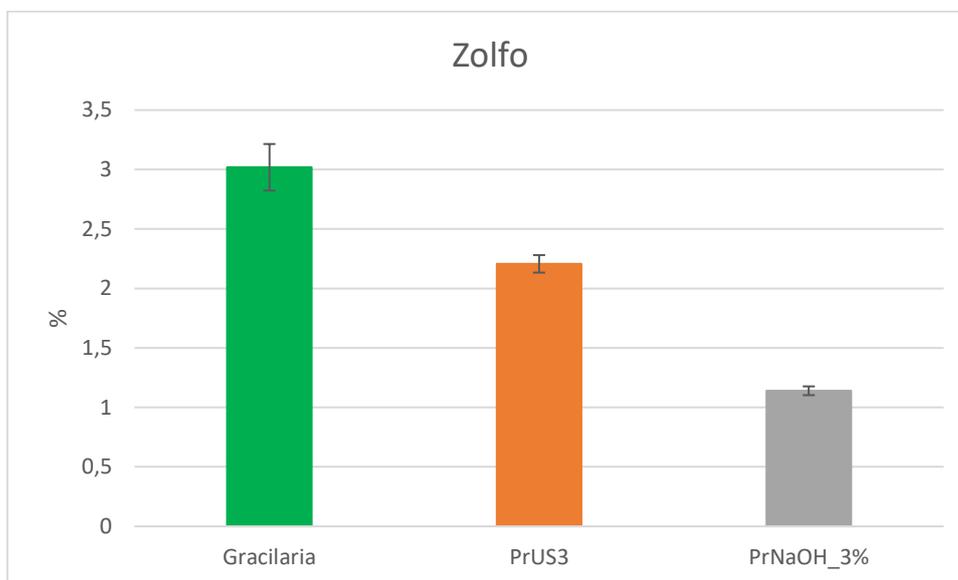


Figura 16 *Quantità di zolfo presente in alga tal quale, pretrattata US e NaOH*

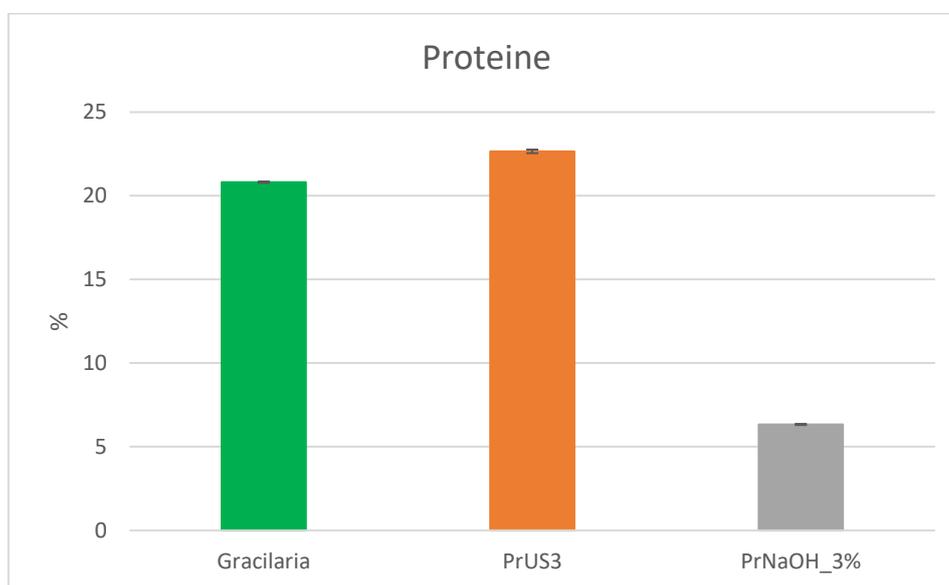


Figura 17 *Quantità di proteine presenti in alga tal quale, pretrattata US e NaOH*

La percentuale di abbattimento dello zolfo rispetto all'alga essiccata è del 27% per il pretrattamento ad ultrasuoni e questo significa che il sonotrodo ha contribuito alla diminuzione dello zolfo, seppur con abbattimento <50%; confrontando il dato con il trattamento basico la differenza rimane sostanziale dato che nel campione PrNaOH l'abbattimento dello zolfo è stato del 62%.

Il valore di PrUS3 relativo alle proteine in soluzione mostra un leggero aumento rispetto all'alga originale. Tuttavia, poiché il substrato non è stato soggetto a nessun trattamento se non quello a ultrasuoni, è plausibile che ci sia stata una contaminazione.

Per quanto riguarda il pretrattamento basico si rileva una diminuzione delle proteine del 70%, per cui questo trattamento ha avuto un effetto positivo nell'eliminazione di questa impurità, come già dimostrato in Figura 12.

5.4 ESTRAZIONE CON LIQUIDI IONICI

L'agarosio ottenuto dalle estrazioni con i tre liquidi ionici (**I**, **II**, e **III**) sui campioni pretrattati con trattamento alcalino e con ultrasuoni sono stati analizzati valutandone la resa e la purezza attraverso spettro IR. La purezza è stata ricavata mediante un confronto dello spettro di un agarosio standard presente in commercio con gli spettri ricavati dai campioni di agarosio estratto, la resa identifica una resa grezza del prodotto.

5.4.1 Estrazioni su pretrattato NaOH 3%

Le estrazioni su alga pretrattata con una soluzione di NaOH (3%) sono state effettuate utilizzando testando due differenti percentuali di tre distinti liquidi ionici (**I**), (**II**), (**III**) (ALLEGATO 1), i campioni sono nominati rispettivamente 1-**I**, 2-**II**, 3-**III**. Sono state proposte estrazioni con il 4% (Figura 18) e il 3% (Figura 19) di liquidi ionici su peso umido delle alghe misurato dopo il pretrattamento.

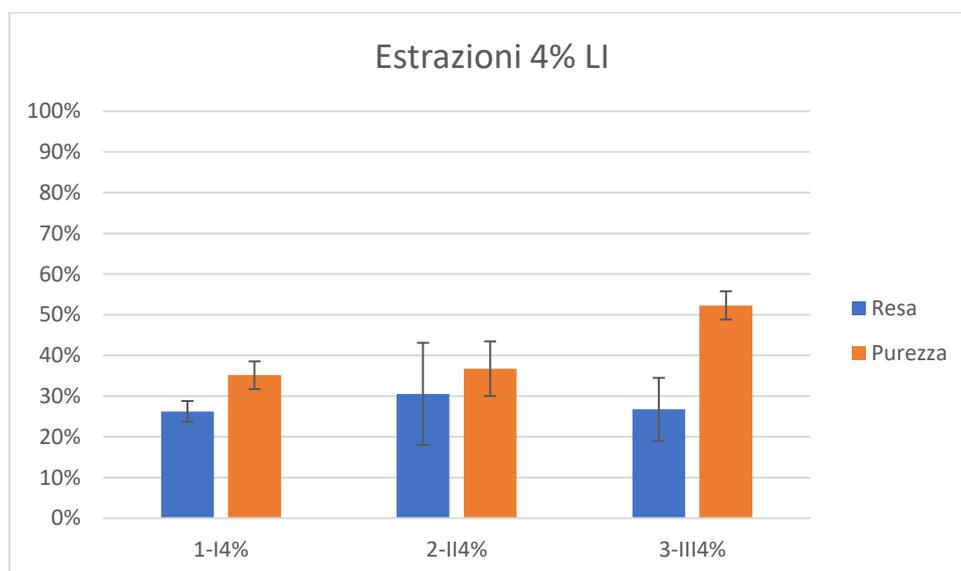


Figura 18 Resa e purezza di agarosio da estrazioni con 4% di liquidi ionici

I dati riguardanti le rese di estrazione dei tre liquidi ionici in esame sono paragonabili tra loro. I risultati si differenziano per la purezza, la quale risulta essere simile per i campioni 1-**I**4% e 2-**II**4% (35%, 37%). Contrariamente a quanto ci si potrebbe aspettare da un liquido ionico sintetizzato da un substrato di recupero, la purezza maggiore è presente nel campione 3-**III**4%, con un valore del 52%.

Il campione 1-**I**4% presenta la resa più bassa: 26%, simile a quella misurata per il campione 2-**II**4%. Nonostante si tratti della resa minore in questo studio, il dato è ottimo se confrontato

con altre ricerche che presentano una resa del 14% utilizzando lo stesso liquido ionico (Sharma et al., 2015a).

I dati mostrati in Figura 19 rappresentano le rese e le purezze delle estrazioni svolte utilizzando il 3% di liquidi ionici. In questo caso le rese complessive risultano minori rispetto a quelle illustrate in Figura 18, suggerendo come una maggior quantità di liquido ionico presente in soluzione durante l'estrazione influisca nell'aumentare la precipitazione di prodotto. Si evidenzia una riduzione importante soprattutto nei campioni 2-II3% e 3-III3%, che presentano rispettivamente una resa del 20% e del 15%.

Il campione 3-III3% presenta la resa minore (15%), ma mostra nuovamente un dato molto positivo riguardo la purezza: 47%, confermando la possibilità di usare il liquido ionico (III) per migliorare la qualità dell'agarosio. La dimostrazione che questo composto, sintetizzato da un elemento di scarto (acido oleico da idrolisi di olio di frittura esausto), ha un'attività comparabile a quella dei composti comunemente sintetizzati da acidi inorganici, rappresenta una svolta nella ricerca di metodologie sostenibili e rispettose dell'ambiente. L'utilizzo di elementi di scarto per la sintesi di LI (III) contribuisce alla valorizzazione di materiali precedentemente considerati come scarti, contribuendo anche alla gestione dei rifiuti.

Dai risultati analizzati in Figura 18 e Figura 19 è possibile sottolineare la rilevanza dei dati sulla purezza e la competitività per l'efficienza della resa; questo nuovo solvente di cui non sono ancora presenti studi in letteratura, potrebbe rappresentare un'alternativa sostenibile all'utilizzo degli altri acidi poiché *bio-based* e di recupero da scarti, rientrando nell'ottica dell'economia circolare e degli obiettivi *zero-waste*.

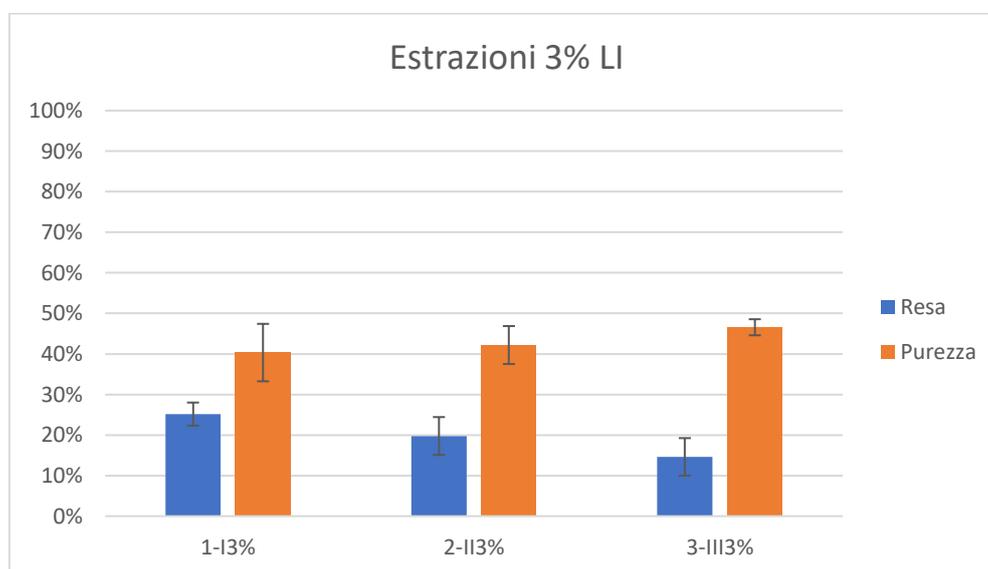


Figura 19 Resa e purezza di agarosio da estrazioni con 3% di liquidi ionici

5.4.2 Estrazioni su pretrattato con riciclo di NaOH 3%

L'obiettivo delle estrazioni su alga pretrattata con una soluzione riciclata di NaOH (3%) (rNaOH), è valutare il mantenimento dell'efficacia del pretrattamento di questa soluzione nell'indebolimento della struttura cellulare e nella rimozione delle impurità. Le estrazioni sono state svolte utilizzando il 4% dei tre liquidi ionici presentati in ALLEGATO 1, i campioni sono nominati rispettivamente 1-r, 2-r, 3-r e rappresentati in Figura 20 e Figura 22.

I grafici riportano le analisi riguardanti la resa e la purezza del precipitato e del gel recuperato dopo i lavaggi in centrifuga (paragrafo 4.5.1). Per quanto riguarda il precipitato, l'utilizzo del liquido ionico (I) nel campione 1-r ha prodotto una resa dell'11%, per il liquido ionico (II) si quantifica una resa del 20%, mentre il dato più alto si ha nel campione 3-r in cui è stato usato il liquido ionico (III). Tuttavia, è essenziale considerare anche la purezza dei campioni, cui dato sorprendente è registrato nel campione 2-r, in cui si misura una purezza del 64%, ciò significa che questo campione risulta essere il più simile all'agarosio standard tra quelli analizzati fino ad ora. La purezza dei campioni 1-r e 3-r è rispettivamente, 37% e 41%.

Confrontando questi dati con quelli ottenuti dall'estrazione operata su substrato pretrattato con NaOH 3%, presentati nel paragrafo 5.4.1 è possibile constatare una diminuzione generale di resa nei campioni sottoposti al riciclo. Tuttavia, è stato possibile raggiungere una notevole purezza nel campione 2-r, maggiore della purezza più elevata registrata nella precedente estrazione (52%).

È evidente che il riciclo della soluzione alcalina abbia avuto un impatto nella diminuzione di resa di tutti i campioni, ma a livello di purezza i risultati non si discostano da quelli presenti in Figura 18. Il riciclo del liquido di pretrattamento costituisce un vantaggio nella gestione delle acque di scarto, un efficiente riciclo permetterebbe di dimezzare il consumo di acqua necessaria per il pretrattamento.

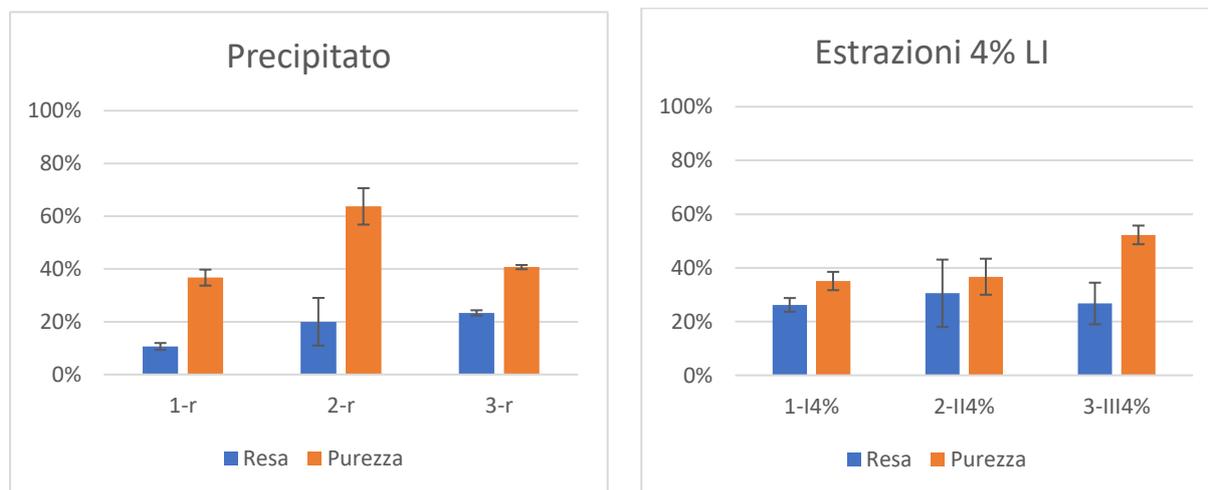


Figura 20 Resa e purezza del precipitato derivante dall'estrazione su alghe pretrattate rNaOH

Richiamo Figura 18 Resa e purezza di agarosio da estrazioni con 4% di liquidi ionici Figura 18 per confronto

Nei campioni 1-r e 2-r si è osservata la formazione di un gel, raffigurato in Figura 21, la cui analisi è mostrata in Figura 22. La presenza di questo strato potrebbe essere attribuita ad una pre-estrazione di parte dell'agarosio presente nelle alghe, verificatosi durante il primo

pretrattamento con la soluzione alcalina che poi si è andato ad accumulare durante il suo riciclo. Sostenendo questa ipotesi il gel risultante non è ricollegabile esclusivamente al substrato utilizzato in queste estrazioni, ma dovuto al primo utilizzo della soluzione basica, fattore da considerare nella valutazione delle rese.

I dati di purezza riguardante il campione 1-r indicano che il gel prodotto è notevolmente puro: 78%, ma ciò si traduce anche in una resa molto bassa: 4%, quindi utilizzando il liquido ionico **I** è possibile raggiungere un'alta qualità di prodotto, rinunciando a una resa finale alta.

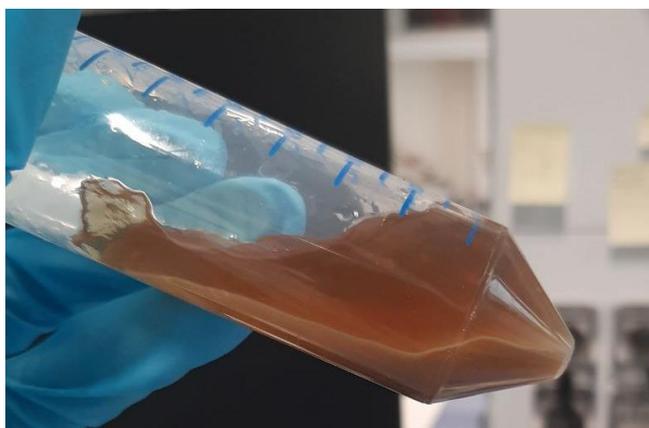


Figura 21 Gel formatosi sopra il precipitato durante i lavaggi del precipitato pretrattato con rNaOH

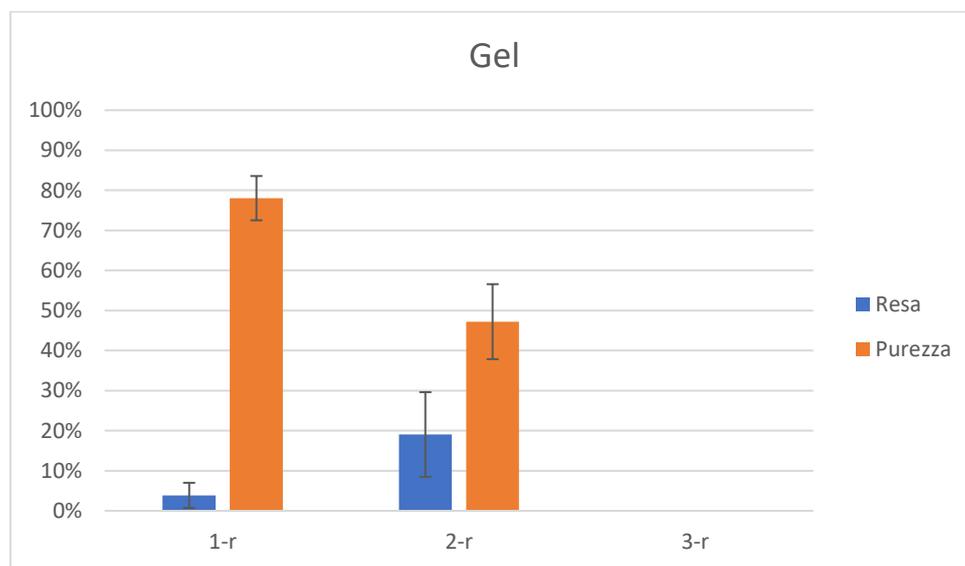


Figura 22 Resa e purezza del gel risultante dall'estrazione su alghe pretrattate con rNaOH

Nel campione 3-r non è stata rilevata alcuna formazione di gel, l'assenza di questo prodotto potrebbe derivare dalla natura diversa del liquido ionico utilizzato (**III**) rispetto agli altri. Infatti, in precedenti studi è stata valutata l'efficacia delle condizioni sperimentali su LI (**I**) (Sharma et al., 2015c), la temperatura e il tempo fissati in questo studio seguono le indicazioni presenti in letteratura. Le migliori condizioni per l'utilizzo di LI (**III**) non sono presenti in letteratura, ma potrebbero essere differenti data anche la particolare natura, precedentemente illustrata, del liquido ionico.

5.4.3 Estrazioni su pretrattato con ultrasuoni

L'utilizzo di un metodo di pretrattamento innovativo basato sull'utilizzo degli ultrasuoni per l'estrazione di agarosio ha suscitato interessanti risultati, come evidenziato dai dati presenti in Figura 23. I campioni US1, US2, US3 rappresentano il precipitato ottenuto utilizzando rispettivamente il liquido ionico (I), (II), (III). Per quanto riguarda la resa finale il più efficace risulta essere il liquido ionico (III) (47%), suggerendo in questo caso una maggiore affinità del solvente con il substrato pretrattato attraverso la tecnologia US. L'ipotesi è sostenuta dai risultati della qualità del prodotto, in cui il campione US3 presenta una notevole purezza: 59%.

I risultati ottenuti potrebbero rendere il liquido ionico (III) una scelta preferita per l'estrazione di agarosio da *Gracilaria* pretrattata con ultrasuoni.

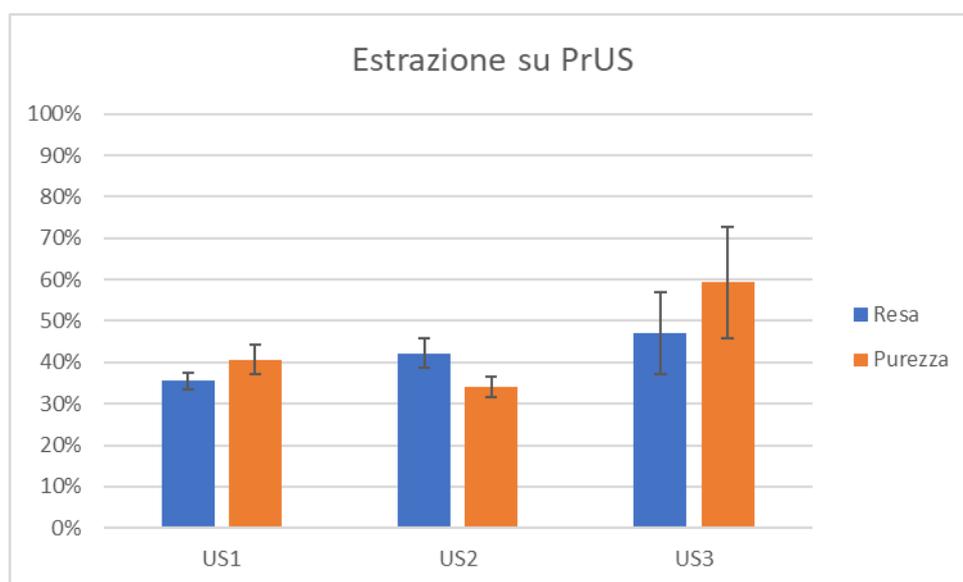


Figura 23 Resa e purezza del precipitato risultante dalle estrazioni su substrato pretrattato con US

Per comprendere al meglio la presenza di impurità nei campioni sono state eseguite analisi mirate alla determinazione dello zolfo e delle proteine presenti nell'estratto.

Dai risultati presenti in Figura 24 è evidente come la tecnologia a ultrasuoni nelle condizioni di lavoro adoperate, non risulta efficace per eliminare una delle cause di scarsa purezza dell'agarosio e cioè la presenza di zolfo all'interno dei campioni.

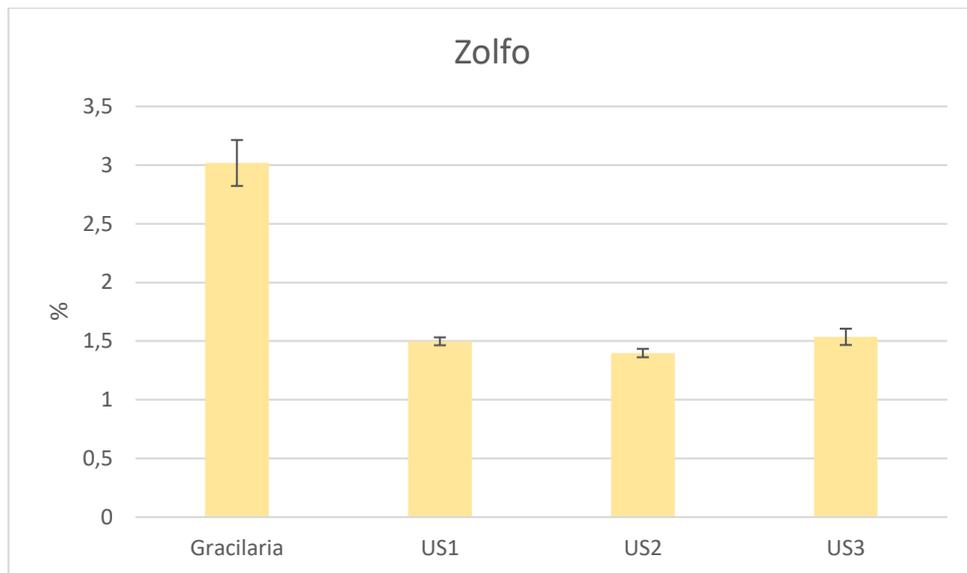


Figura 24 Zolfo residuo presente nel precipitato estratto da substrato pretrattato con US

In Figura 25 è mostrata la quantità di proteine residue presenti nel campione estratto da confrontare con quelle presenti nel substrato iniziale. Dai dati riportati, si evidenzia un maggior contenuto di proteine in tutti e tre i campioni estratti con i tre liquidi ionici.

La causa di un innalzamento delle proteine potrebbe infatti essere dovuta alla presenza di liquido ionico, costituito da colina, contenente azoto.

Data la possibile presenza di liquido ionico residuo nel campione estratto, è auspicabile che i lavaggi per pulire il precipitato non siano stati molto efficaci nel loro allontanamento e nella rimozione delle impurità.

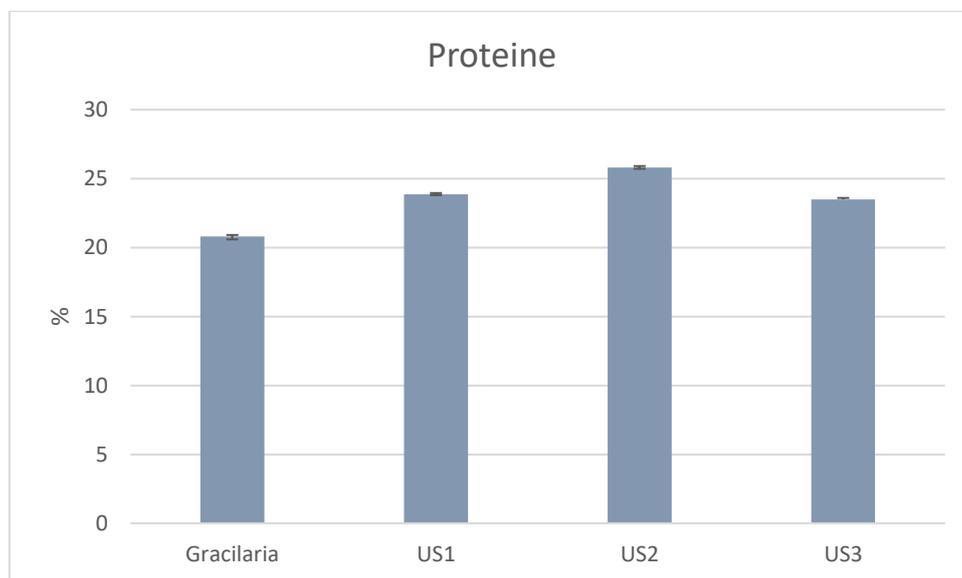


Figura 25 Carboidrati residui presenti nel precipitato estratto da substrato pretrattato con US

5.5 ESTRAZIONE COMBINATA

La ricerca di metodologie originali per l'estrazione di agarosio dall'alga *Gracilaria Gracilis* ha condotto verso l'utilizzo simultaneo di ultrasuoni e liquidi ionici. L'integrazione delle due tecnologie rappresenta una promettente sinergia, al fine di migliorare la sostenibilità del processo. Si tratta di una combinazione di tecniche innovative di cui non sono ancora presenti studi in letteratura.

L'obiettivo di questa ricerca è esplorare l'influenza delle condizioni di estrazione su diverse tipologie di substrato: alghe seccate (TQ), alghe seccate macinate (m) e alghe pretrattate con soluzione alcalina al 3% (NaOH). L'adozione degli ultrasuoni ha lo scopo di potenziare la penetrazione e l'efficacia dei liquidi ionici nel substrato, facilitando l'estrazione esclusiva dell'elemento desiderato e diminuendo la tempistica di reazione.

In particolare, sono studiati i risultati ottenuti variando la durata del trattamento (10 minuti e 30 minuti) e la temperatura raggiunta (80°C e 40°C). Ogni test svolto è stato numerato, parametri e substrati utilizzati in ogni prova sono raffigurati schematicamente in Tabella 2.

5.5.1 Resa e purezza

I dati relativi all'analisi del prodotto ottenuto in ciascuna estrazione attraverso analisi FTIR sono presentati in Tabella 6 e Tabella 7. La purezza è stata ricavata mediante un confronto dello spettro di un agarosio standard con gli spettri dei diversi campioni, la resa identifica una resa grezza del prodotto.

Fissando come parametro il tempo di reazione a 30 minuti, è possibile evidenziare che i dati rivelano delle tendenze differenti in relazione alle diverse temperature raggiunte durante il trattamento. I test 1, 2, 3 presenti in Tabella 6 e condotti a temperature inferiori di 40°C presentano una purezza notevole del prodotto estratto, soprattutto per i campioni che non hanno subito pretrattamento alcalino (test 1 e 2: 88% e 90%). Una temperatura di esercizio inferiore potrebbe quindi favorire una maggiore purezza, ma è importante anche notare la resa inferiore; la correlazione tra i due dati potrebbe indicare che le relazioni tra i parametri sono complesse e sarebbero necessari ulteriori test per identificare la temperatura ottimale.

La purezza del campione relativo al test n°3 è del 66%, notevolmente più bassa rispetto ai primi due. Questo dato potrebbe indicare che operare un pretrattamento alcalino non è efficace quando si esegue un'estrazione combinata per ottenere l'agarosio e anzi, può essere controproducente.

Tabella 6 Resa e purezza dei campioni ottenuti con l'estrazione combinata svolta per 30 minuti

N° test	Temperatura (°C)	Resa %	Purezza %
1	<40	7	88
2		5	90
3		9	66
4	80	-	-
5		10	86
6		14	61

Per quanto riguarda le estrazioni compiute a 80°C i risultati relativi al test n° 4 non sono disponibili perché il trattamento combinato non è stato eseguito in quanto eseguendo la medesima estrazione per 10 minuti (Tabella 7), la consistenza del substrato non permetteva il corretto propagarsi delle onde provocando solo surriscaldamento e non un'effettiva efficacia degli ultrasuoni, è stato quindi deciso di non procedere con la prova di durata 30 minuti.

I test successivi condotti a 80°C indicano una diminuzione della purezza del prodotto (86% e 61%), mostrando però una resa maggiore in entrambi i test (10% e 14%).

I dati indicano che la temperatura di esercizio è un fattore critico nell'estrazione di agarosio mediante ultrasuoni e liquidi ionici: le temperature inferiori a 40°C promuovono una maggiore purezza, mentre temperature maggiori compromettono leggermente la qualità del prodotto, ma promuovono una resa maggiore.

I risultati delle estrazioni condotte per 10 minuti sui differenti substrati sono rappresentati in Tabella 7. Per quanto riguarda le estrazioni condotte a una temperatura inferiore a 40°C, non sono presenti i dati dei test n° 7 e 8 perché in entrambi i casi non c'è stata alcuna estrazione; ne risulta che temperature minori accoppiate a tempistiche minori non favoriscano la precipitazione di alcun prodotto. In questo caso, il solido è stato recuperato e analizzato solo nel test n° 9, in cui il substrato è stato pretrattato con soluzione alcalina al 3% di NaOH, per cui in queste condizioni, il pretrattamento basico ha incentivato la precipitazione dell'agarosio.

L'assenza di prodotto indica che l'utilizzo di ultrasuoni a temperature contenute e per tempistiche poco prolungate non è funzionale a indebolire sufficientemente la parete cellulare per estrarre agarosio da alghe non pretrattate. La presenza di precipitato nel test n° 9 conferma l'ipotesi, mostrando anche una purezza elevata: 78%; quindi, mantenendo a livelli minimi i parametri delle due variabili (tempo e temperatura), l'unico modo per ottenere un precipitato è compiere un pretrattamento. Tuttavia, queste condizioni non eliminerebbero il problema dell'uso di un pretrattamento alcalino e la conseguente produzione di acque basiche di scarto da dover smaltire.

Gli andamenti di resa e purezza riguardanti i test condotti a 80°C per 10 minuti sono molto positivi: il test n°10 è stato svolto su alga secca, un trattamento di minima durata ad alta temperatura ha permesso di ottenere la resa maggiore di tutte le prove effettuate (16%), dato

ancora più interessante se confrontato con l'ottima purezza ottenuta (84%). Il risultato, seppur minore rispetto alla purezza ottenuta nel test n° 2 (Tabella 6) è incoraggiante se confrontato con un'analisi energetica del caso: il riscaldamento a temperature elevate per poco tempo potrebbe richiedere meno risorse rispetto a mantenere una temperatura più bassa per periodi lunghi. Inoltre, tenendo presente che l'effetto termico è una conseguenza del lavoro svolto dal sonotrodo, per tempi brevi, non è necessario fornire ulteriore energia esterna per raggiungere tali temperature; invece, per trattamenti prolungati è necessario un refrigerante con ulteriore dispendio energetico. Per confermare l'ipotesi sarebbe necessario svolgere un'ulteriore analisi sui consumi energetici.

Tabella 7 Resa e purezza dei campioni ottenuti con l'estrazione combinata svolta per 10 minuti

N° test	Temperatura (°C)	Resa %	Purezza %
7	<40	-	-
8		-	-
9		9	78
10	80	16	84
11		3	74
12		1	71

5.5.2 Zolfo e proteine

Al fine di approfondire la valutazione dell'efficacia del trattamento, sui campioni più interessanti in base alle considerazioni precedentemente affrontate, sono state condotte analisi specifiche per rilevare la presenza di zolfo e di proteine nei campioni.

In Figura 26 è raffigurato l'andamento dello zolfo nei campioni trattati per 30 minuti. La minore quantità di zolfo (1%) è presente nei due campioni che hanno svolto un pretrattamento con soluzione alcalina (test n° 3 e 6). I dati riguardanti la purezza dei medesimi campioni è la più bassa registrata (Tabella 7), ciò significa che il pretrattamento alcalino ha un potere di abbattimento dello zolfo elevato, ma non risulta efficace nell'eliminazione di altri composti indesiderati, oppure potrebbe avere un effetto negativo sull'agarosio, modificandone la struttura.

L'analisi delle proteine ha evidenziato risultati in linea con i dati ottenuti dalle altre analisi; infatti, i campioni provenienti da substrati pretrattati mostrano una quantità minore di questa impurità rispetto agli altri. Il dato più interessante in questo caso riguarda il test n° 5, svolto a 80°C per 30 minuti su un substrato secco macinato, in cui le proteine costituiscono l'11% del campione. Di conseguenza, la macinazione, aumentando l'area superficiale, e il tempo di trattamento prolungato unito all'alta temperatura, rendono il substrato maggiormente accessibile all'estrazione anche delle sostanze considerate impurezze influenzando la qualità del prodotto finale; anche nell'analisi dello zolfo in Figura 26 è possibile evidenziare una diversità tra i test 1 e 2, rispettivamente svolti su alghe secche e su alghe secche macinate.

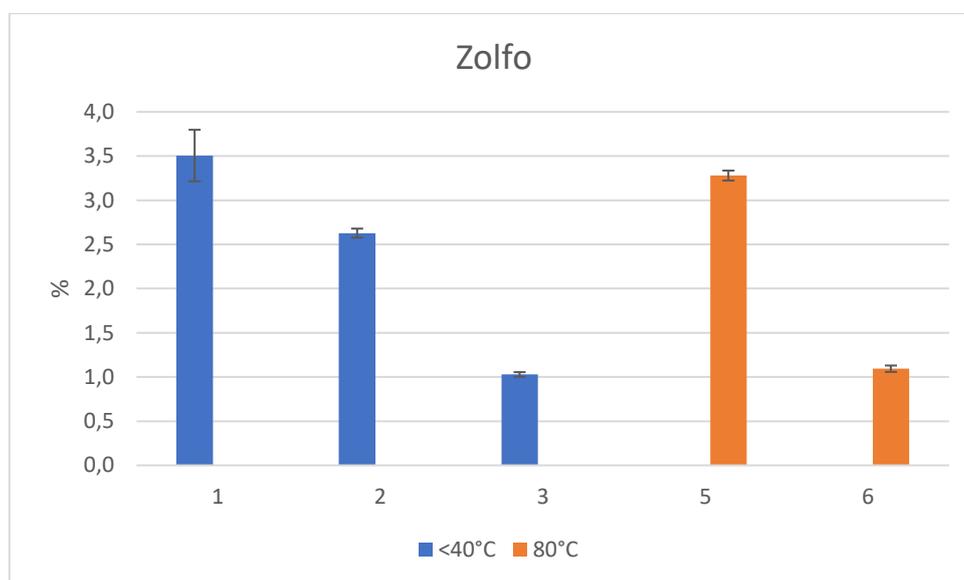


Figura 26 Zolfo presente nei campioni estratti operando il trattamento di estrazione combinata per 30 minuti

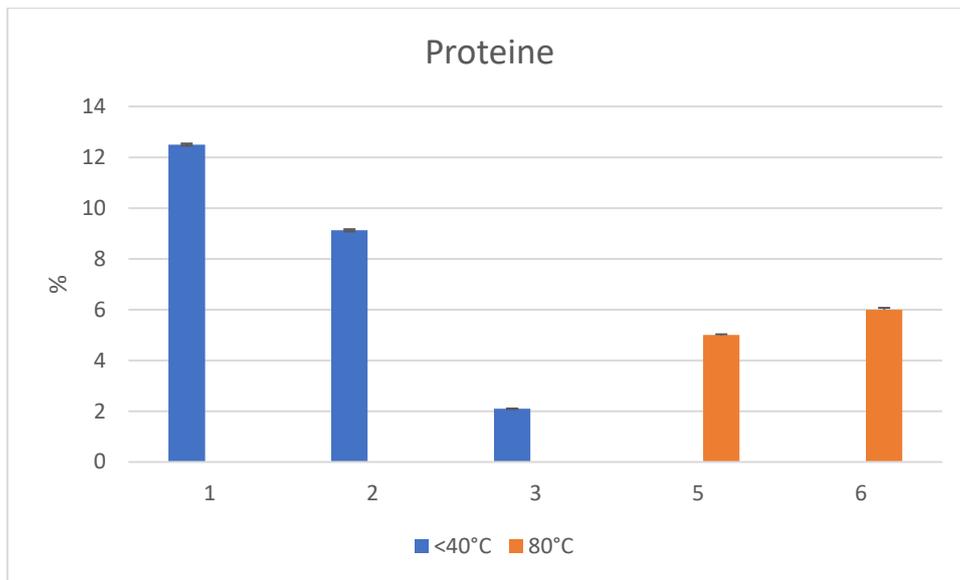


Figura 27 Proteine presenti nei campioni estratti operando il trattamento di estrazione combinata per 30 minuti

Per quanto concerne le analisi riguardanti le estrazioni operate per 10 minuti è stato considerato il campione risultante dal test n°10 confrontato con il campione del test n°12, il quale rappresenta il substrato pretrattato sottoposto alle medesime condizioni di esercizio (Figura 28).

Lo zolfo presente nel campione 10 è maggiore del risultato molto promettente ottenuto nel campione 12 (0,7%), ma risulta essere comparabile a quello del campione 2 (Figura 26). Operando a temperature maggiori per un tempo minore è possibile ottenere lo stesso abbattimento di zolfo che si ottiene operando a tempi maggiori (30 min); per definire la condizione ottimale di esercizio sarebbe necessaria un'analisi economica dei consumi. Lo studio effettuato sulla presenza di proteine mostrato in Figura 29 conferma nuovamente che il pretrattamento alcalino aiuta nell'eliminazione delle sostanze indesiderate come le proteine, data la presenza del 5% nel campione 10 e del 3% nel campione 12.

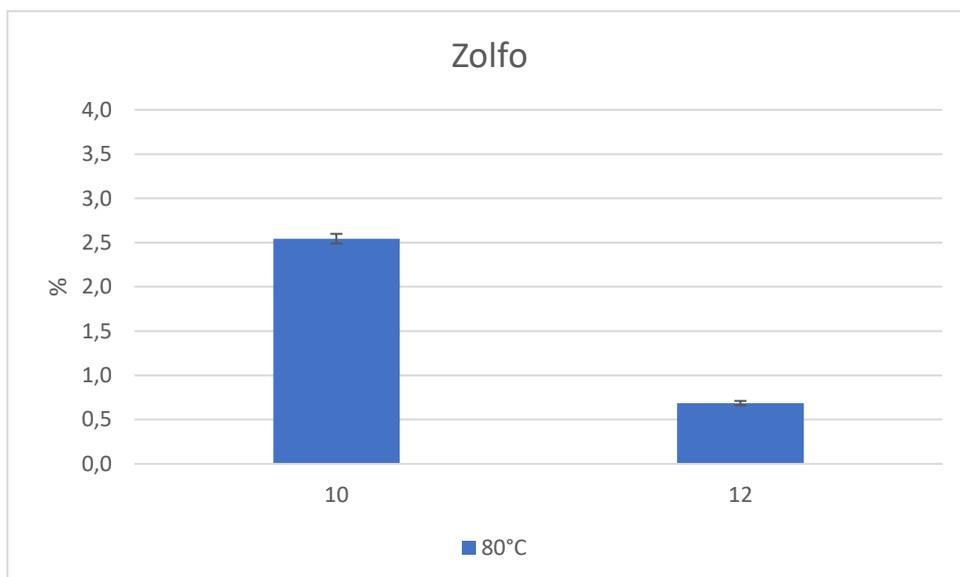


Figura 28 Zolfo presente nei campioni estratti operando il trattamento di estrazione combinata per 10 minuti

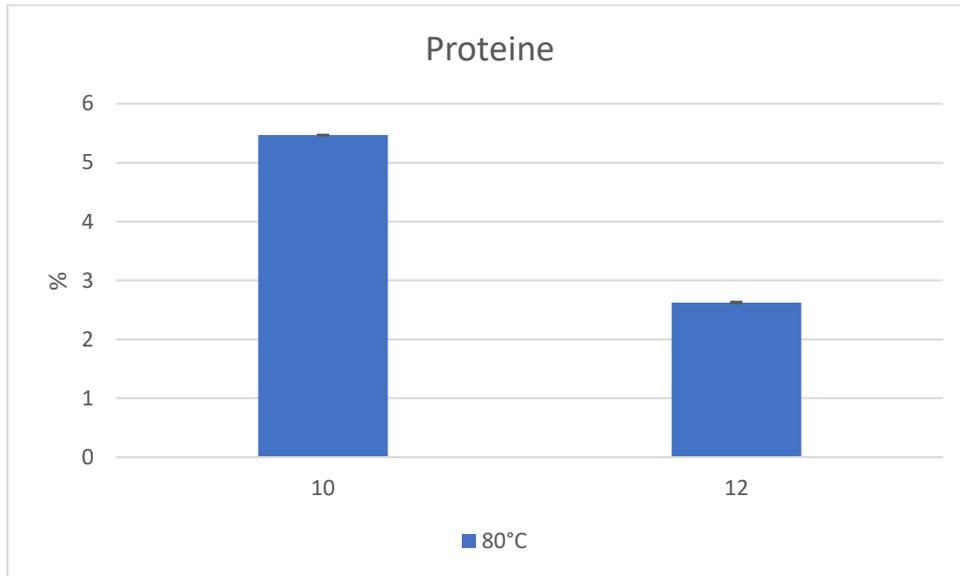


Figura 29 Proteine presenti nei campioni estratti operando il trattamento di estrazione combinata per 10 minuti

5.5.3 sCOD e carboidrati

L'analisi di sCOD e carboidrati è stata eseguita sulla frazione liquida alla fine del pretrattamento estrattivo (4.5.1) per evidenziare le sostanze organiche perse. Infatti, si ricorda che a fine test per quelli con substrato non pretrattato con NaOH, si sono ottenute nella maggior parte dei casi tre frazioni: solido, liquido e gel.

I dati presenti in Figura 30 confermano l'elevata capacità estrattiva riportata nel test n°10, del quale non è stato possibile misurare l'sCOD in quanto le condizioni operative hanno prodotto solo gel e solido di scarto e non una frazione liquida.

Per quanto riguarda gli altri campioni si identifica che mantenere una temperatura inferiore a 40°C per 30 minuti comporta il rilascio del doppio di sCOD in soluzione rispetto a una durata di 10 minuti, è evidente che operando a basse temperature il tempo è un parametro cruciale per la solubilizzazione dei composti organici. Infatti, questa condizione non si verifica se si prende in considerazione una temperatura di 80°C: in questo caso i valori sono simili per entrambe le tempistiche in esame. Per cui l'effetto della temperatura è molto maggiore rispetto all'effetto relativo al tempo di trattamento se si opera ad alte temperature.

La prova a 80°C per 30 minuti non è stata effettuata per limiti già riscontrati durante la medesima prova di durata 10 minuti, l'impossibilità di svolgere il test è dovuto alla consistenza del substrato durante il trattamento; infatti, l'incremento della densità del campione rende difficile la diffusione delle onde nel mezzo rendendo la tecnologia a ultrasuoni inefficace.

I campioni inerenti alle alghe pretrattate con NaOH, a parità di temperatura e in entrambi i casi (<40° e 80°C), presentano una quantità maggiore di sCOD nelle estrazioni più durature: i trattamenti a tempi maggiori hanno dato un sCOD maggiore. In ogni caso i risultati di sCOD sono molto minori rispetto agli altri campioni e ciò può essere ricondotto al pretrattamento a cui il substrato è stato sottoposto precedentemente, il quale potrebbe aver già rimosso parte della sostanza organica solubile dal campione.

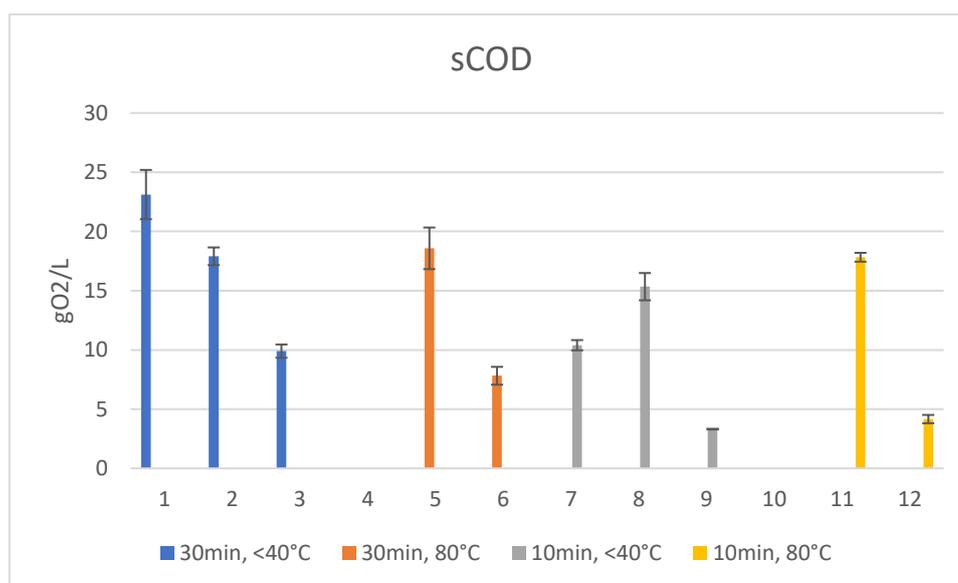


Figura 30 sCOD misurato sul liquido filtrato, recuperato derivante dalle estrazioni combinate

Per analizzare in modo più approfondito la sostanza organica solubile presente in soluzione è stata effettuata anche un'analisi sui carboidrati (Figura 31).

I risultati forniti dall'analisi dei carboidrati mostrano andamenti simili all'sCOD, con l'unica eccezione del campione 2 il quale misura 22,2 g/L di carboidrati, dato leggermente maggiore rispetto ai 21,3 g/L del campione 1. Entrambe le prove sono state condotte a temperatura inferiore di 40°C e per 30 minuti, ma il substrato nel primo caso è stato precedentemente macinato.

La macinazione potrebbe rappresentare una fase preliminare e fondamentale di trattamento che rende il substrato più accessibile e fruibile dai trattamenti volti all'eliminazione delle impurezze. Tuttavia, non è scontato considerare che la macinazione sia un aspetto negativo nell'ottimizzazione dell'estrazione di agarosio poiché potrebbe invece provocare una perdita di prodotto. Per una maggior comprensione di questo aspetto sarebbero necessari ulteriori test esplorativi.

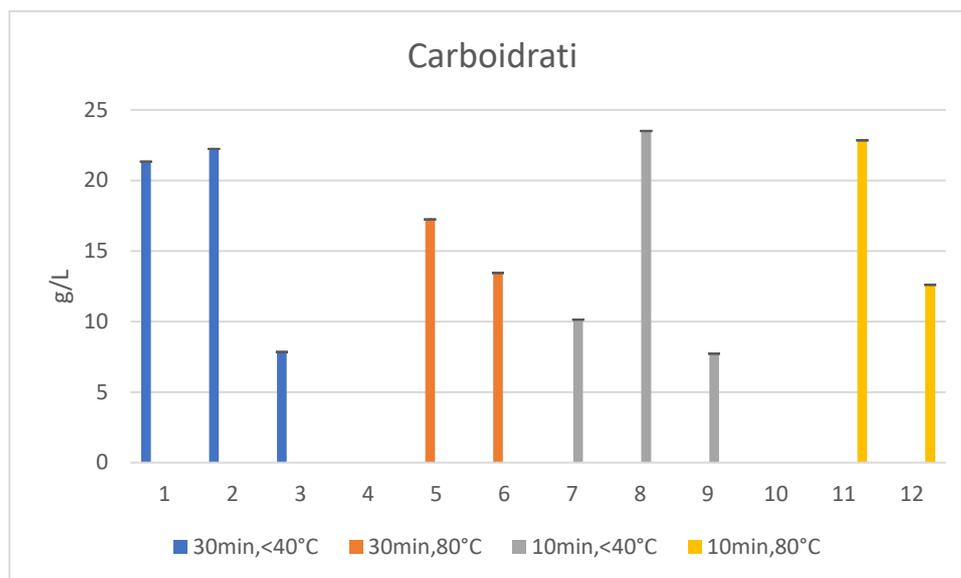


Figura 31 Carboidrati misurati sul liquido filtrato, recuperato derivante dalle estrazioni combinate

Questa analisi non è specifica per l'agarosio, anch'esso un carboidrato, per cui non è stato possibile stabilire se fosse presente nella frazione liquida di scarto; sarebbe necessaria un'analisi più selettiva per verificare la presenza del prodotto di interesse.

6. CONCLUSIONE

La presente ricerca ha approfondito il processo di estrazione di agarosio dalle alghe rosse del genere *Gracilaria*, focalizzando l'attenzione inizialmente sulla valutazione dell'efficienza di un pretrattamento a ultrasuoni in confronto al tradizionale pretrattamento alcalino; per poi valutare l'efficienza dei solventi impiegati (Liquidi ionici **I**, **II**, **III**) e infine determinare l'efficacia di una nuova tecnica di estrazione combinata.

- Il pretrattamento a ultrasuoni si configura come un'alternativa sostenibile, ma la sua azione non è comparabile a quella di un trattamento alcalino, il quale rimane la miglior soluzione da adottare col substrato in esame.
- Le estrazioni che sono state condotte utilizzando tre distinti liquidi ionici nell'estrazione da substrato pretrattato con trattamento alcalino, hanno rilevato un aumento significativo della resa grezza di prodotto quando la quantità di solvente impiegata è maggiore.
- Le prestazioni ottimali sono state ottenute con l'utilizzo del liquido ionico (**III**), reagente di origine bio-based e di recupero dello scarto della filiera della ristorazione, introdotto per la prima volta in questo studio. L'approfondimento delle specifiche condizioni operative offre nuove prospettive per lo sviluppo di nuove strategie di estrazione.
- Il nuovo trattamento di estrazione proposto, che prevede l'associazione di ultrasuoni e liquidi ionici (LI **I**), ha evidenziato risultati promettenti, raggiungendo una resa di agarosio del 16% con una purezza dell'84%, trattando le alghe per soli 10 minuti a 80°C, senza la necessità di un pretrattamento. L'approccio senza pretrattamento ha il vantaggio di richiedere un tempo di estrazione più breve rispetto alla tecnica che prevede il pretrattamento basilico.

In conclusione, quest'ultimo approccio innovativo apre nuove prospettive per l'applicazione della tecnologia a ultrasuoni nell'ambito dell'estrazione di agarosio. La presenza del liquido ionico LI (**I**) ha esercitato un impatto significativo sui risultati ottenuti, indicando la necessità di ulteriori indagini riguardanti l'estrazione combinata e ricerche sull'eventuale comportamento di LI (**III**) se posto alle medesime condizioni data la sua notevole efficacia nell'estrarre agarosio su alghe pretrattate con NaOH.

7. ALLEGATI

7.1 ALLEGATO 1

STRUMENTAZIONE E METODI ANALITICI

Gli spettri NMR sono stati realizzati utilizzando uno spettrometro Bruker UltraShield 400 che opera a una frequenza di 400,00 MHz per lo spettro del protone, in solvente deuterato CDCl₃.

Gli spettri IR sono stati acquisiti con uno spettrometro FT-IR Spectrum One, Perkin Elmer precisely

REAGENTI E SOLVENTI

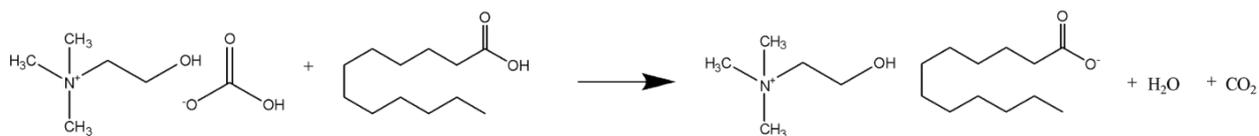
I reagenti e solventi utilizzati sono:

- Colina monocarbonato
- Acido laurico
- Acido decanoico
- Cloroformio deuterato
- Acido oleico da idrolisi di olio di frittura esausto

Tutti i reagenti, fatta eccezione per l'acido oleico, sono stati forniti da Sigma Aldrich. L'acido oleico è stato ottenuto da idrolisi di olio di frittura esausto secondo procedure sono sviluppate internamente e consultabili nelle tesi di laurea di Angelica Mognato ed Eleonora Fabris.

2-IDROSSI-N,N,N-TRIMETILETANO-1-AMMINO DODECANOATO (I)

Sintesi



In un pallone dotato di ancoretta magnetica sono stati aggiunti 0,97 g di acido laurico (4,8 mmol) in 0,85 ml di colina monocarbonato (4,8 mmol) e 2 ml di acqua distillata. Il pallone è rimasto in agitazione a temperatura ambiente per 1 ora.

Successivamente si procede con l'allontanamento dell'acqua mediante l'utilizzo di un evaporatore rotante alla temperatura di 60 °C per 1 ora e successivamente in pompa ad alto vuoto.

Il prodotto si presenta come un gel trasparente molto viscoso, è stato ottenuto con una resa dell'85% ed è stato caratterizzato mediante ¹HNMR (Figura 32).

Caratterizzazione

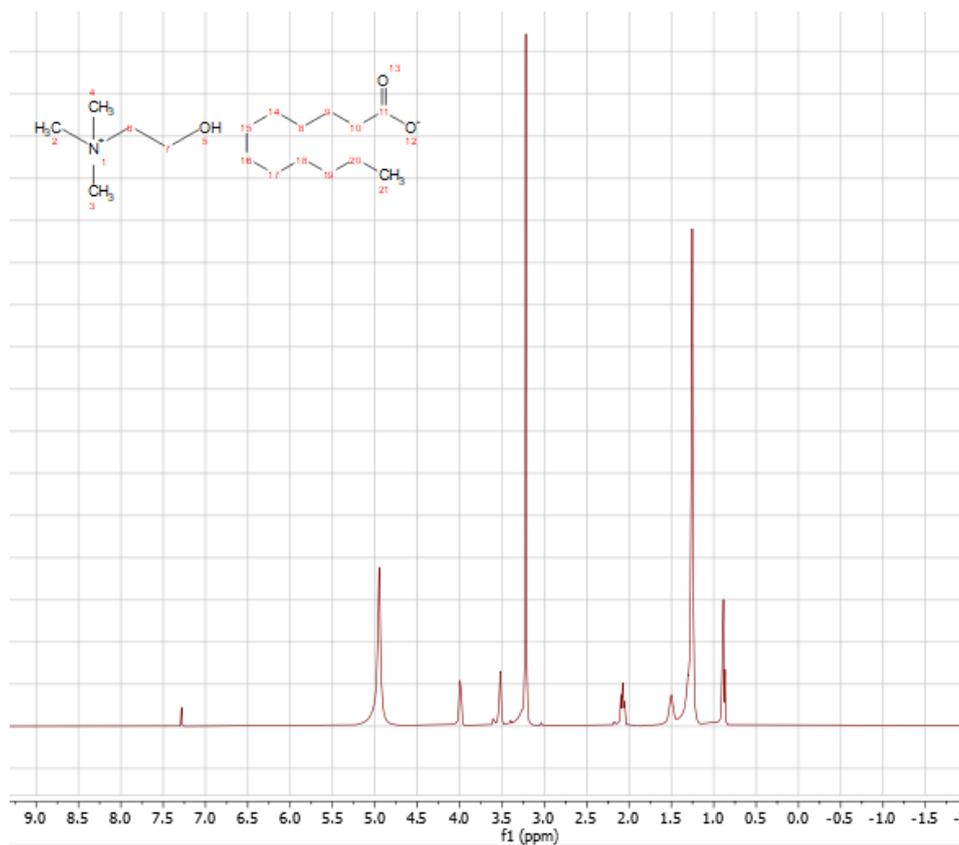
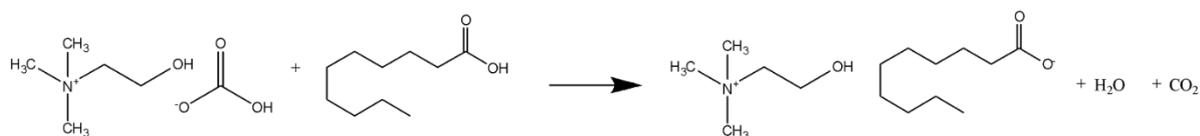


Figura 32 Spettro ¹H NMR di LI (I)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4.95 (1H, s, H₅), 3.99 (2H, s, H₆), 3.52 (2H, t, H₇), 3.22 (9H, s, H₂₋₄), 2.08 (2H, t, H₁₀), 1.51 (2H, s, H₉), 1.25 (18H, m, H₈₋₂₀), 0.88 (3H, t, H₂₁).

SINTESI 2-IDROSSI-N,N,N-TIMETILETANO-1-AMMINO DECANOATO (II)

Sintesi



In un pallone dotato di ancoretta magnetica sono stati aggiunti 0,83 g di acido decanoico (4,8 mmol) in 0,85 ml di colina monocarbonato (4,8 mmol) e 2 ml di acqua distillata. Il pallone è rimasto in agitazione a temperatura ambiente per 1 ora.

Successivamente si procede con l'allontanamento dell'acqua mediante l'utilizzo di un evaporatore rotante alla temperatura di 60 °C per 1 ora e successivamente in pompa ad alto vuoto.

Il prodotto si presenta come un gel trasparente molto viscoso, è stato ottenuto con una resa dell'81% ed è stato caratterizzato mediante ¹HNMR (Figura 33).

Caratterizzazione

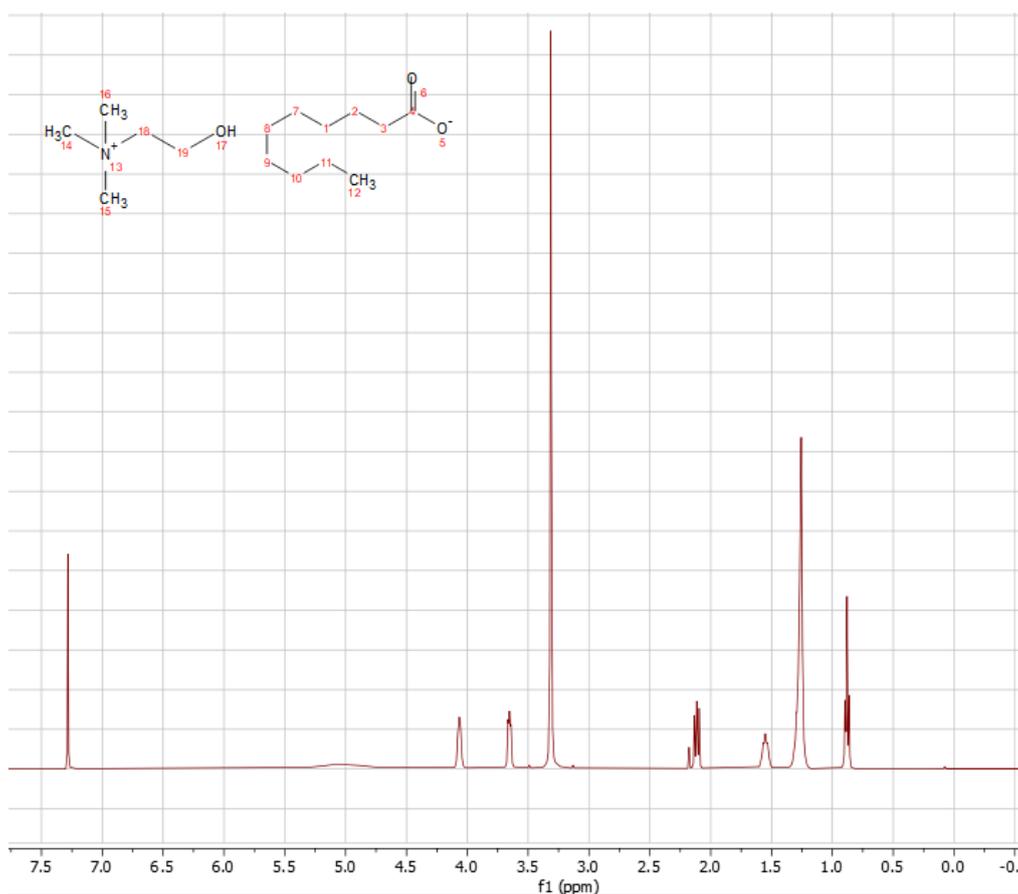
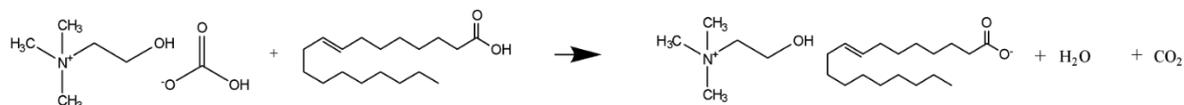


Figura 33 Spettro ¹H NMR di LI (II)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.0 (1H, s, OH) 4.07 (2H, t, H₁₉), 3.65 (2H, t, H₁₈), 3.31 (9H, s, H₁₄₋₁₆), 2.13 (2H, t, H₂), 1.56 (2H, t, H₃) 1.25 (13H, m, H₁ H₇₋₁₁), 0.88 (3H, t, H₁₂).

SINTESI 2-IDROSSI-N,N,N-TRIMETILANO-1-AMMINO (E)-OCTADEC-8-ENOATO (III)

Sintesi



In un pallone dotato di ancoretta magnetica sono stati aggiunti 0,71 g di acido derivante da olio esausto (2 mmol) in 0,42 ml di colina monocarbonato (2 mmol) e 1 ml di acqua distillata. Il pallone è rimasto in agitazione a temperatura ambiente per 1 ora.

Successivamente si procede con l'allontanamento dell'acqua mediante l'utilizzo di un evaporatore rotante alla temperatura di 60°C per 1 ora e successivamente in pompa ad alto vuoto.

Il prodotto si presenta come un gel trasparente molto viscoso, è stato ottenuto con una resa del 75% ed è stato caratterizzato mediante ¹HNMR (Figura 34).

Caratterizzazione

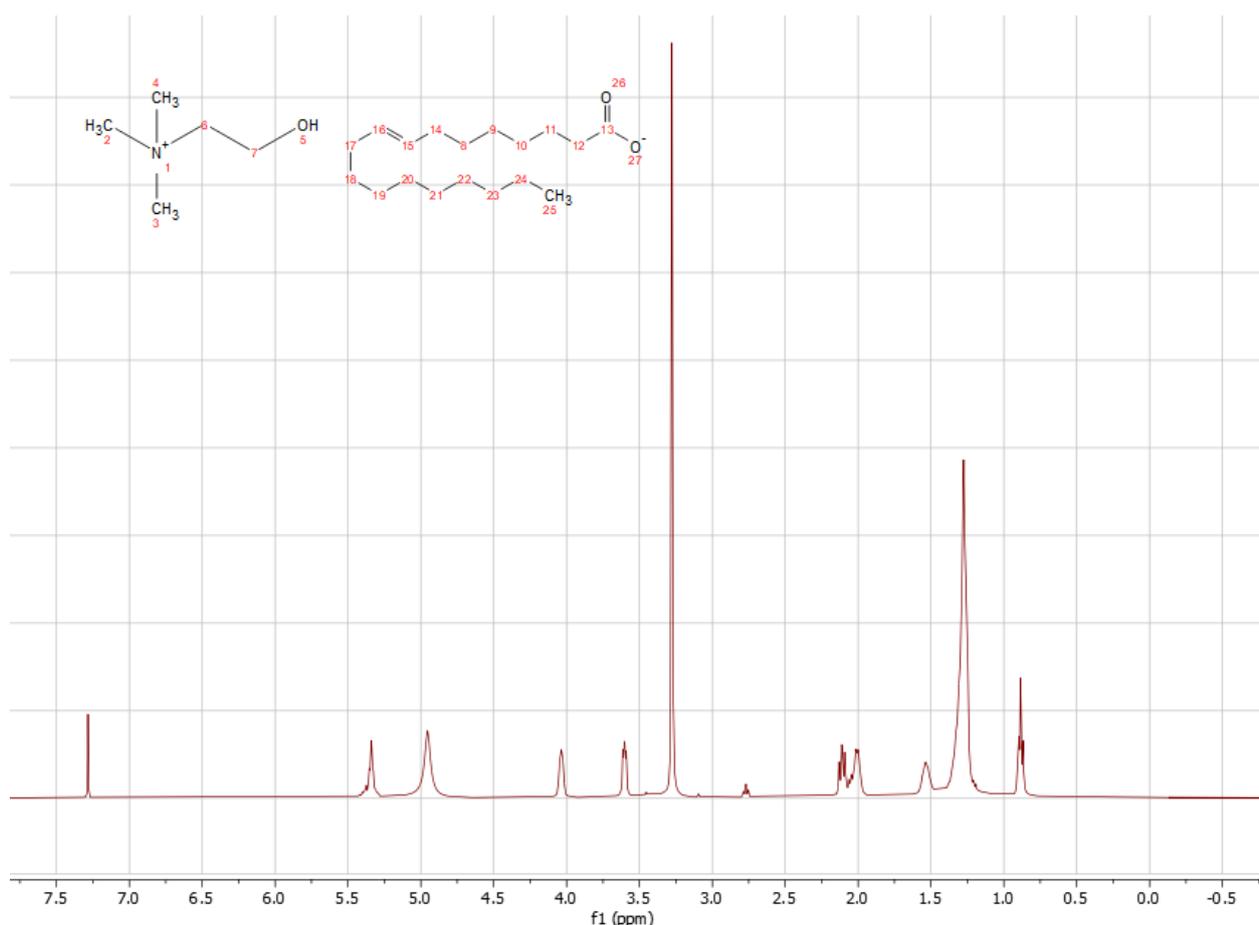


Figura 34 Spettro ¹H NMR di LI (III)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.34 (2H, m, H₁₅₋₁₆), 4.95 (1H, s, H₅), 4.04 (2H, t, H₇), 3.6 (2H, m, H₆), 3.28 (9H, s, H₂₋₄), 2.7 (2H, t, H₁₂), 2.06 (4H, m, H₁₄₋₁₇), 1.5 (2H, m, H₁₁), 1.2 (20H, m, H₁₀₋₈, H₁₈₋₂₄), 0.89 (3H, m, H₂₅).

7.2 ALLEGATO 2

CARATTERIZZAZIONE AGAROSIO

Le assegnazioni seguenti sono come suggerite dalla letteratura (Rodrigues et al., 2015; Sharma et al., 2015c).

Agarosio standard

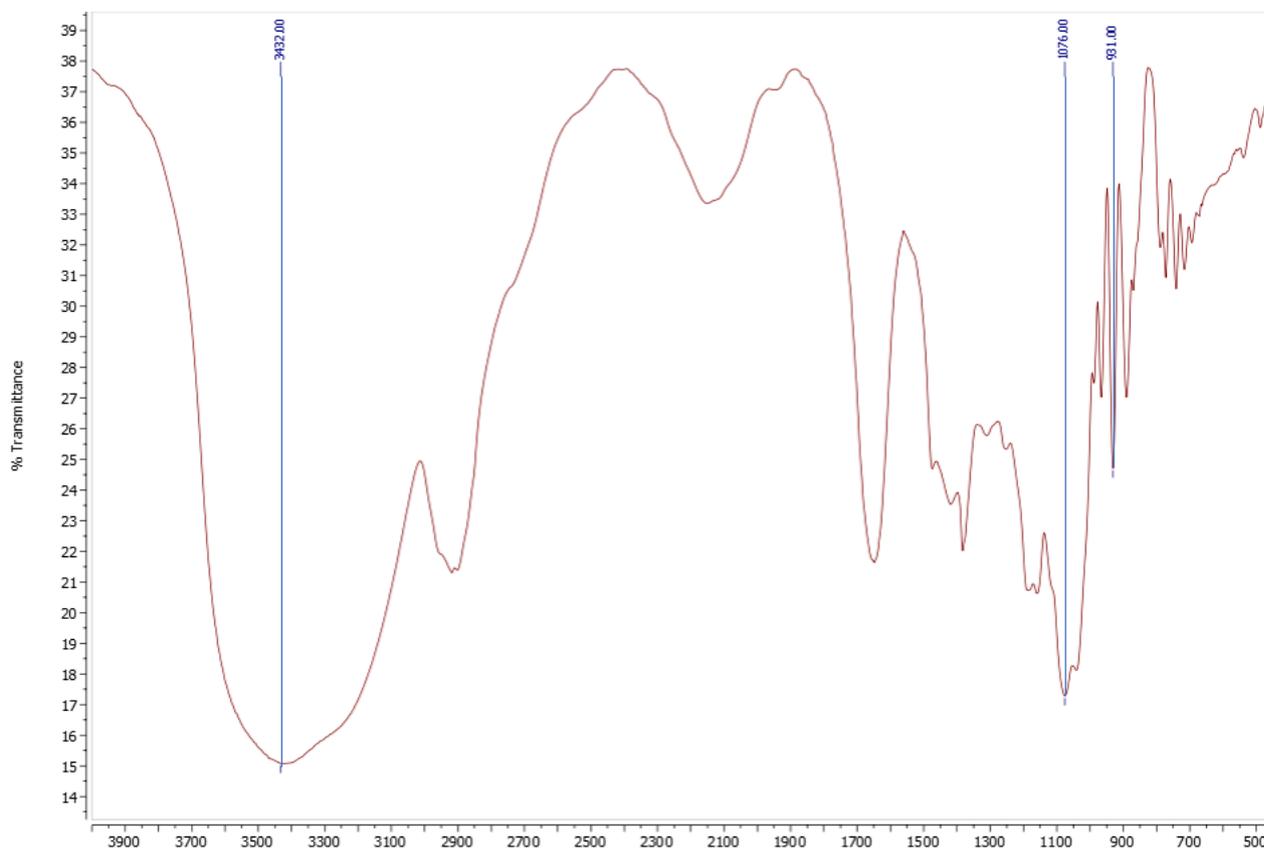


Figura 35 Spettro FT-IR agarosio standard

FT-IR (KBr, cm^{-2}): 3432 (idrossile C-OH), 1076 (legame glicosidico C-O-C), 932 (3,6-anidrogallattosio legame C-O-C).

Pr US, LI (III)

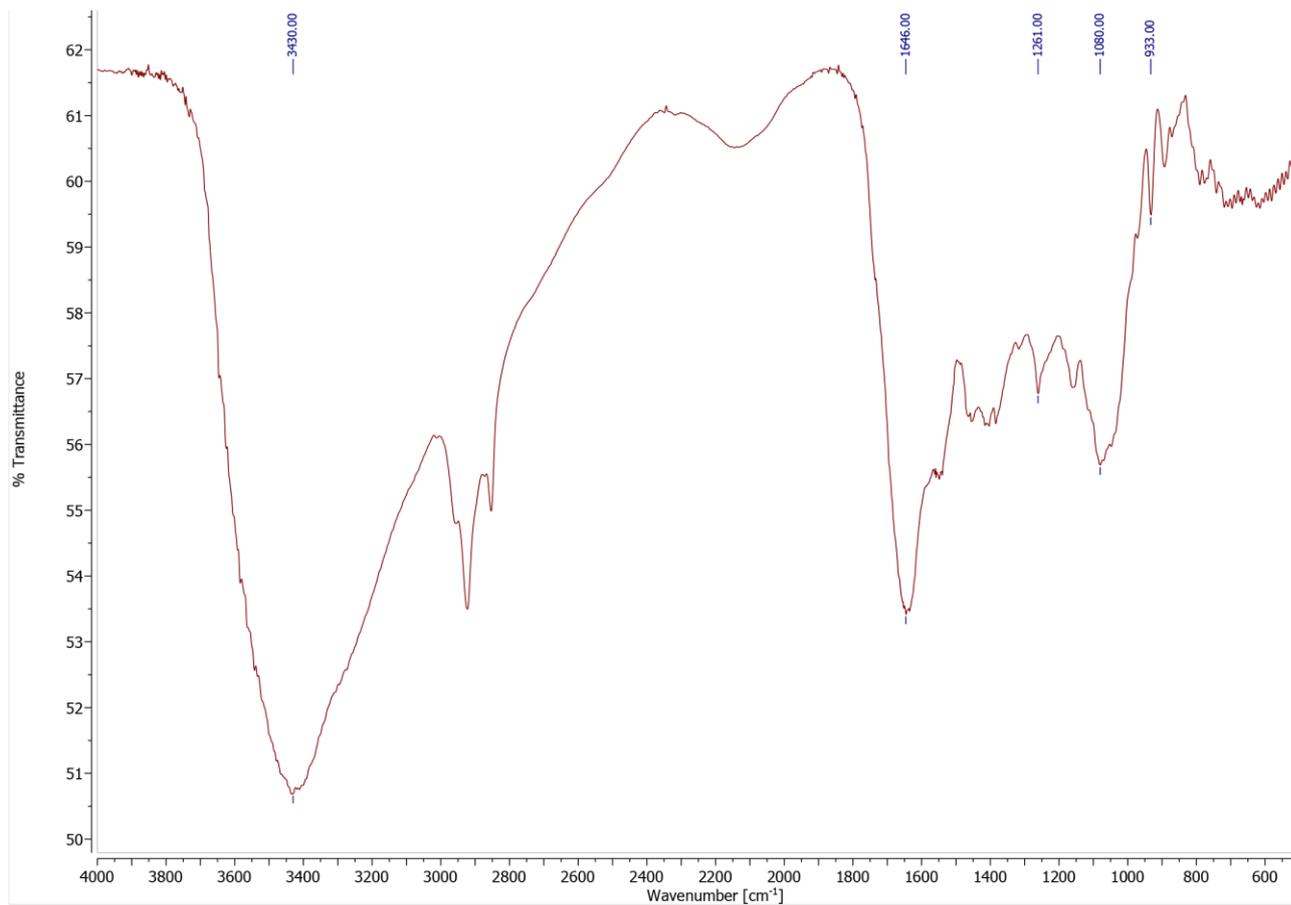


Figura 36 Spettro FT-IR campione pretrattato con US, estrazione con 4% LI (III)

FT-IR (cm⁻²): 3430 (idrossile C-OH), 1261 (solfato S=O), 1080 (legame glicosidico C-O-C), 933 (3,6-anidrogalattosio legame C-O-C).

3-4%NaOH, LI (III)

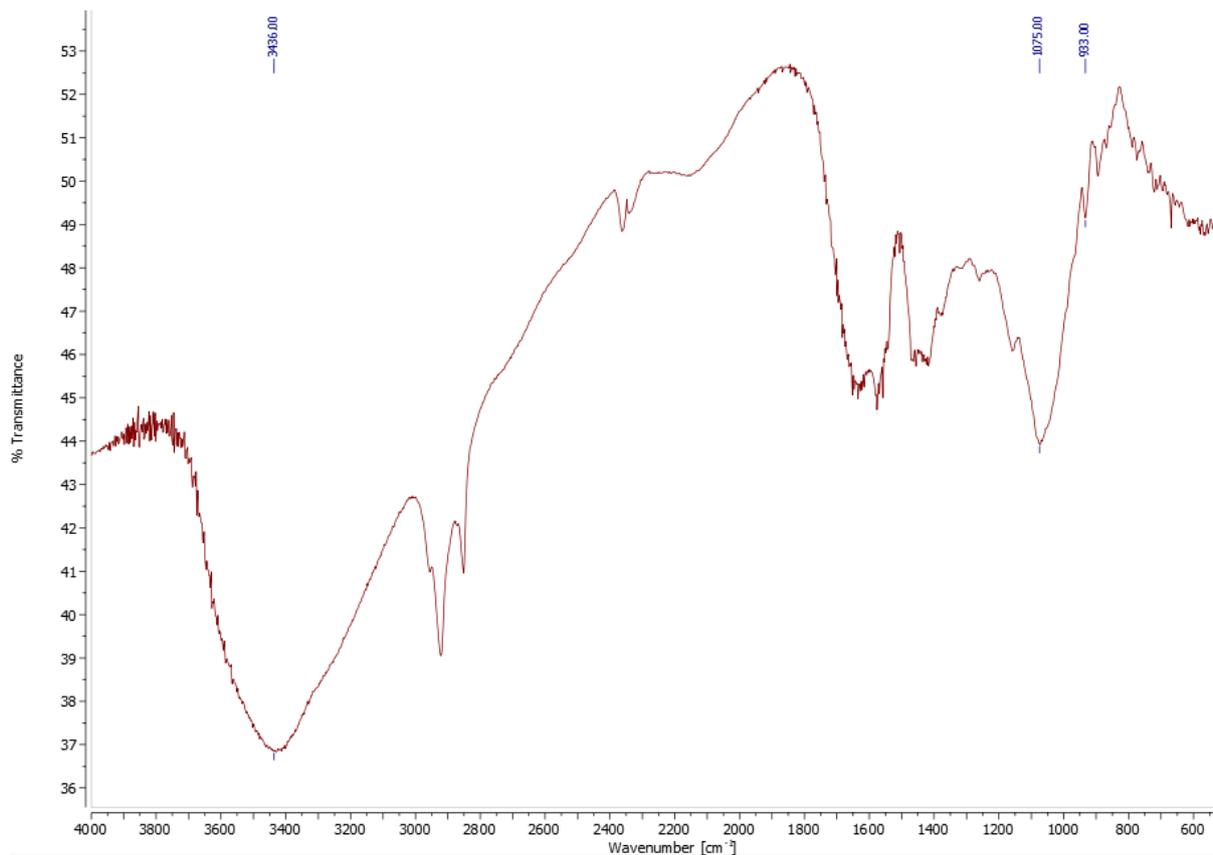


Figura 37 Spettro FT-IR campione pretrattato con NaOH, estrazione con 4% LI (III)

FT-IR (cm⁻²): 3436 (idrossile C-OH), 1075 (legame glicosidico C-O-C), 933 (3,6-anidrogalattosio legame C-O-C).

1-3%NaOH, LI (I)

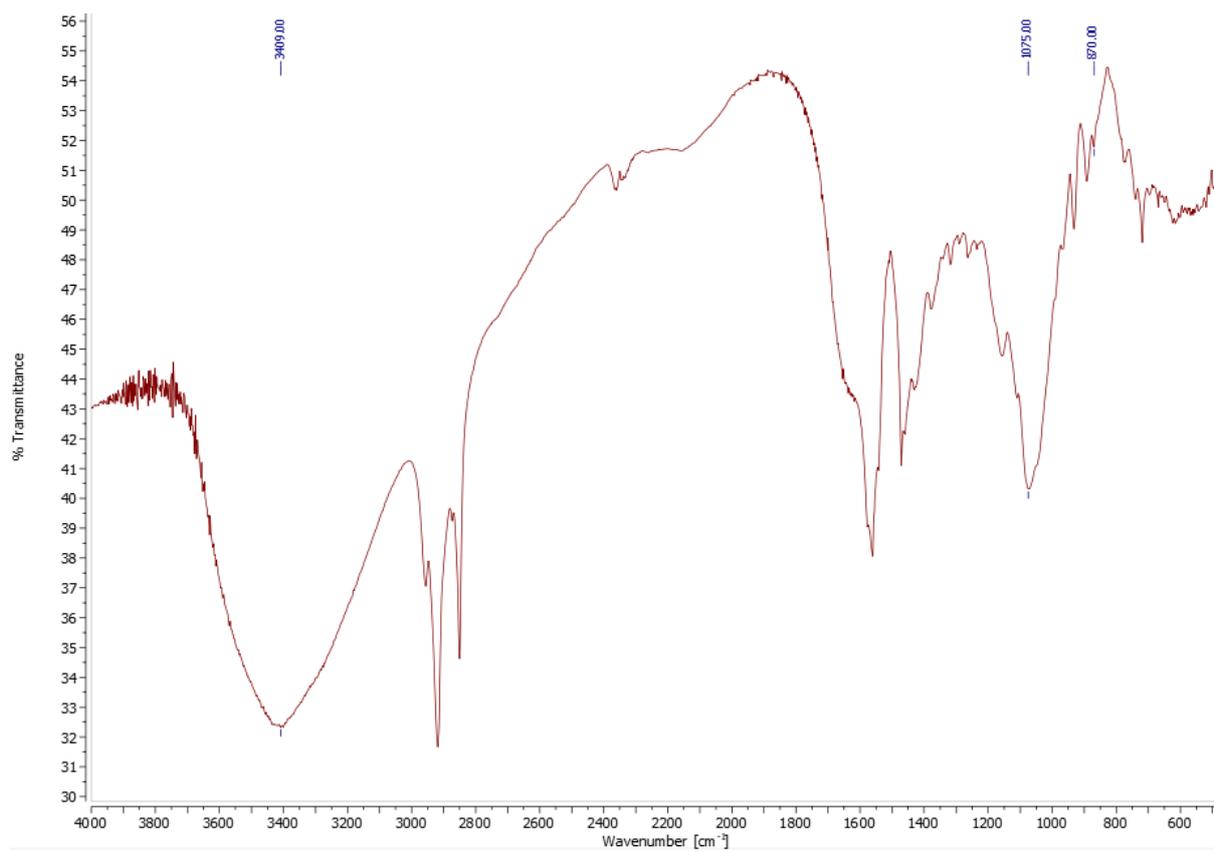


Figura 38 Spettro FT-IR campione pretrattato con NaOH, estrazione con 3% LI (I)

FT-IR (cm⁻²): 3409 (idrossile C-OH), 1075 (legame glicosidico C-O-C), 870 (3,6-anidrogallattosio legame C-O-C).

4-r LI (II)

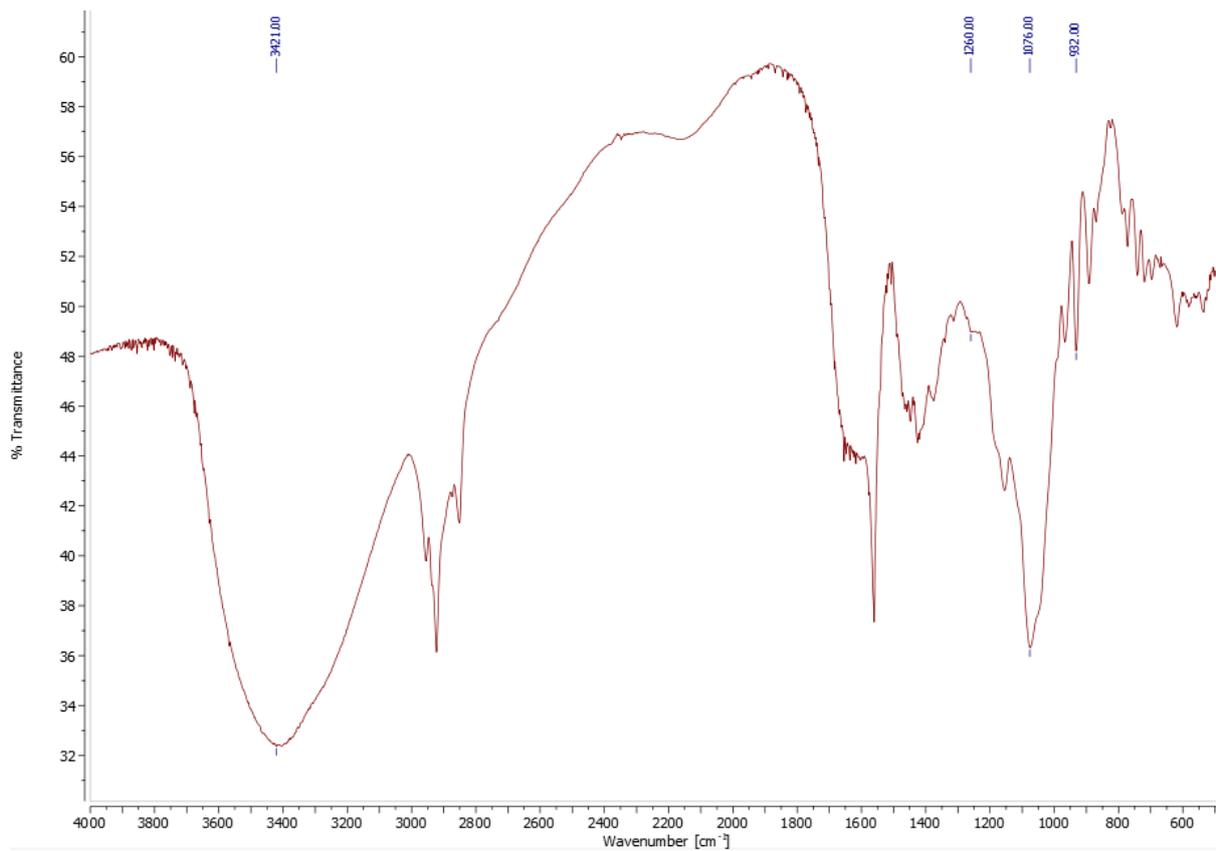


Figura 39 Spettro FT-IR campione pretrattato con rNaOH, estrazione con 4% LI (II)

FT-IR (cm⁻²): 3421 (idrossile C-OH), 1260 (solfato S=O), 1076 (legame glicosidico C-O-C), 932 (3,6-anidrogallattosio legame C-O-C).

Campione 10, US+IL (I)

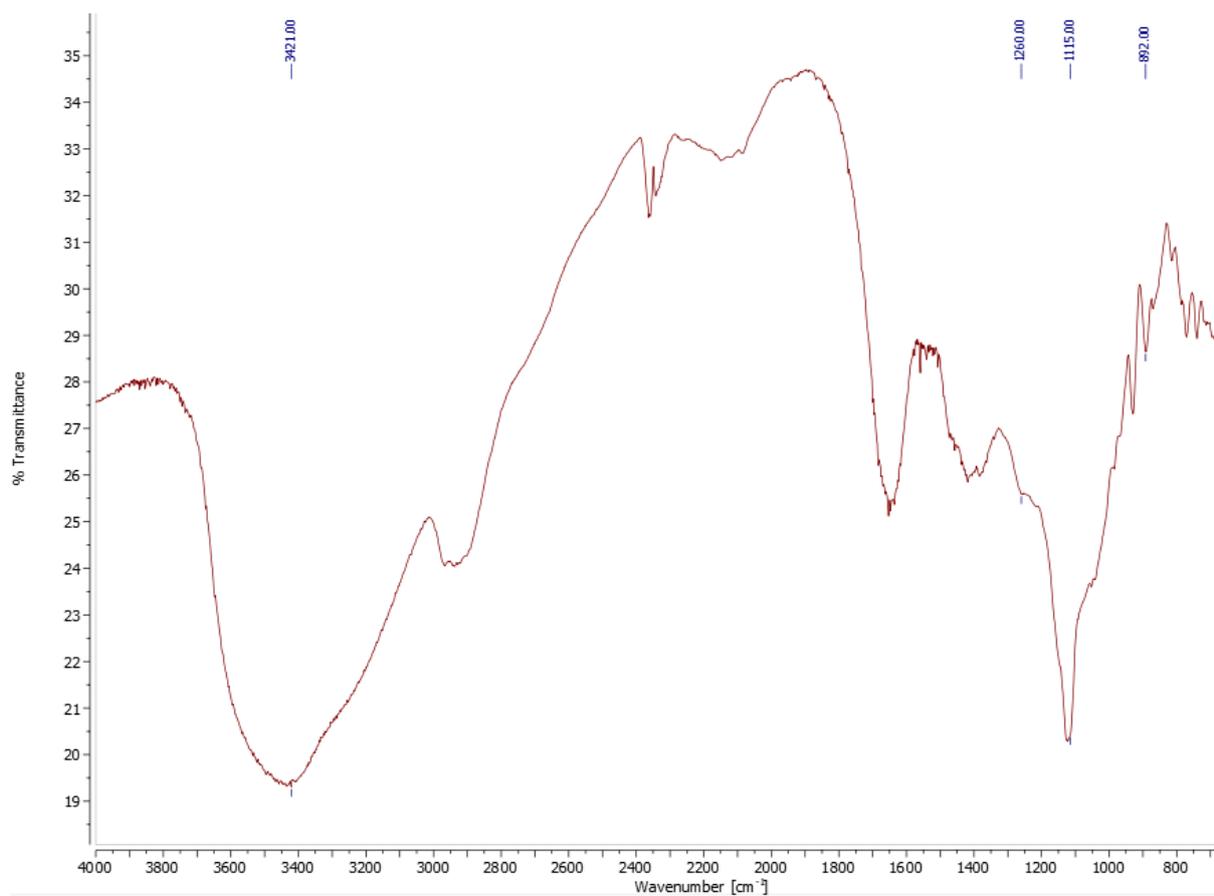


Figura 40 Spettro FT-IR campione 10 da estrazione combinata US + IL (I)

FT-IR (cm^{-2}): 3421 (idrossile C-OH), 1260 (solfato S=O), 1115 (legame glicosidico C-O-C), 892 (3,6-anidrogallattosio legame C-O-C).

8. BIBLIOGRAFIA

- Albuquerque, J. C. S., Araújo, M. L. H., Rocha, M. V. P., De Souza, B. W. S., De Castro, G. M. C., Cordeiro, E. M. S., Silva, J. D. S., & Benevides, N. M. B. (2021). Acid hydrolysis conditions for the production of fine chemicals from *Gracilaria birdiae* alga biomass. *Algal Research*, 53, 102139. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102139>
- Angelica Mognato, T. (s.d.). *Sintesi di additivi flussanti per l'asfalto a partire da olio di frittura esausto*.
- Burkholder, J. M., & Shumway, S. E. (2011). Bivalve Shellfish Aquaculture and Eutrophication. In S. E. Shumway (A c. Di), *Shellfish Aquaculture and the Environment* (1^a ed., pp. 155–215). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470960967.ch7>
- Chen, H., Xiao, Q., Weng, H., Zhang, Y., Yang, Q., & Xiao, A. (2020). Extraction of sulfated agar from *Gracilaria lemaneiformis* using hydrogen peroxide-assisted enzymatic method. *Carbohydrate Polymers*, 232, 115790. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115790>
- Chew, K. W., Juan, J. C., Phang, S. M., Ling, T. C., & Show, P. L. (2018). An overview on the development of conventional and alternative extractive methods for the purification of agarose from seaweed. *Separation Science and Technology*, 53(3), 467–480. <https://doi.org/10.1080/01496395.2017.1394881>
- Da Costa Lopes, A. M., João, K. G., Morais, A. R. C., Bogel-Lukasik, E., & Bogel-Lukasik, R. (2013). Ionic liquids as a tool for lignocellulosic biomass fractionation. *Sustainable Chemical Processes*, 1(1), 3. <https://doi.org/10.1186/2043-7129-1-3>
- Eleonora Fabris, T. (s.d.). *Sintesi di additivi flussanti e ringiovanenti per l'asfalto a partire dall'olio di frittura esausto*.
- Fidelis, G., Camara, R., Queiroz, M., Costa, M., Santos, P., Rocha, H., & Costa, L. (2014). Proteolysis, NaOH and Ultrasound-Enhanced Extraction of Anticoagulant and

- Antioxidant Sulfated Polysaccharides from the Edible Seaweed, *Gracilaria birdiae*. *Molecules*, *19*(11), 18511–18526. <https://doi.org/10.3390/molecules191118511>
- Francavilla, M., Franchi, M., Monteleone, M., & Caroppo, C. (2013). The Red Seaweed *Gracilaria gracilis* as a Multi Products Source. *Marine Drugs*, *11*(10), 3754–3776. <https://doi.org/10.3390/md11103754>
- Francavilla, M., Manara, P., Kamaterou, P., Monteleone, M., & Zabaniotou, A. (2015). Cascade approach of red macroalgae *Gracilaria gracilis* sustainable valorization by extraction of phycobiliproteins and pyrolysis of residue. *Bioresource Technology*, *184*, 305–313. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.147>
- Freile-Pelegri, Y., & Robledo, D. (s.d.-a). *Influence of alkali treatment on agar from Gracilaria cornea from Yucata'n, Me'xico*.
- Freile-Pelegri, Y., & Robledo, D. (s.d.-b). *Influence of alkali treatment on agar from Gracilaria cornea from Yucata'n, Me'xico*.
- Gómez Barrio, L. P., Cabral, E. M., Zhao, M., Álvarez García, C., SenthamaraiKannan, R., Padamati, R. B., Tiwari, U., Curtin, J. F., & Tiwari, B. K. (2022). Comparison Study of an Optimized Ultrasound-Based Method versus an Optimized Conventional Method for Agar Extraction, and Protein Co-Extraction, from *Gelidium sesquipedale*. *Foods*, *11*(6), 805. <https://doi.org/10.3390/foods11060805>
- Gondi, R., Akila, Ravi, Y. K., Kavitha, S., Al-Qaradawi, S. Y., Challabathula, D., Kumar, G., & Rajesh Banu, J. (2023). Cost-effective bio-methanation via oxalic acid coupled sonication pretreatment of *Gracilaria salicornia*. *Biomass and Bioenergy*, *175*, 106876. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2023.106876>
- Hernández-Carmona, G., Freile-Pelegri, Y., & Hernández-Garibay, E. (2013). Conventional and alternative technologies for the extraction of algal polysaccharides. In *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals* (pp. 475–516). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857098689.3.475>

- Kumar, V., & Fotedar, R. (2009). Agar extraction process for *Gracilaria cliftonii* (Withell, Millar, & Kraft, 1994). *Carbohydrate Polymers*, 78(4), 813–819.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.001>
- Liu, Y., Friesen, J. B., McAlpine, J. B., Lankin, D. C., Chen, S.-N., & Pauli, G. F. (2018). Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *Journal of Natural Products*, 81(3), 679–690. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00945>
- Marinho-Soriano, E., & Bourret, E. (2003). Effects of season on the yield and quality of agar from *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Bioresource Technology*, 90(3), 329–333. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00112-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00112-3)
- Martínez-Sanz, M., Gomez-Barrio, L. P., Zhao, M., Tiwari, B., Knutsen, S. H., Ballance, S., Zobel, H. K., Nilsson, A. E., Krewer, C., Östergren, K., & López-Rubio, A. (2021). Alternative protocols for the production of more sustainable agar-based extracts from *Gelidium sesquipedale*. *Algal Research*, 55, 102254.
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102254>
- Meena, R., Siddhanta, A. K., Prasad, K., Ramavat, B. K., Eswaran, K., Thiruppathi, S., Ganesan, M., Mantri, V. A., & Rao, P. V. S. (2007). Preparation, characterization and benchmarking of agarose from *Gracilaria dura* of Indian waters. *Carbohydrate Polymers*, 69(1), 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.09.020>
- Mohibbullah, Md., Talha, Md. A., Baten, Md. A., Newaz, A. W., & Choi, J. (2023). Yield optimization, physicochemical characterizations, and antioxidant properties of food grade agar from *Gracilaria tenuistipitata* of Cox's Bazar coast, Bangladesh. *Food Science & Nutrition*, 11(6), 2852–2863. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3265>
- Mouedden, R., Abdellaoui, S., El Madani, F., El Ouamari, N., Slimani, D., Kasmi, K., Taibi, M., Zahir, I., & Chaabane, K. (2024). *Gracilaria Gracilis* – A Review of Ecological Knowledge, Chemical Composition, Cultivation, and Applications. *Ecological*

Engineering & Environmental Technology, 25(1), 276–287.

<https://doi.org/10.12912/27197050/175506>

Nielsen, S. S. (2010). Phenol-Sulfuric Acid Method for Total Carbohydrates. In S. S. Nielsen (A c. Di), *Food Analysis Laboratory Manual* (pp. 47–53). Springer US.

https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1463-7_6

Öğretmen, Ö. Y., & Duyar, H. A. (2018). The effect of different extraction methods and pre-treatments on agar yield and physico-chemical properties of *Gelidium latifolium* (Gelidiaceae, Rhodophyta) from Sinop Peninsula Coast of Black Sea, Turkey. *Journal of Applied Phycology*, 30(2), 1355–1360. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1292-2>

Petkovic, M., Ferguson, J. L., Gunaratne, H. Q. N., Ferreira, R., Leitão, M. C., Seddon, K. R., Rebelo, L. P. N., & Pereira, C. S. (2010). Novel biocompatible cholinium-based ionic liquids—Toxicity and biodegradability. *Green Chemistry*, 12(4), 643.

<https://doi.org/10.1039/b922247b>

Plotka-Wasyłka, J., De La Guardia, M., Andruch, V., & Vilková, M. (2020). Deep eutectic solvents vs ionic liquids: Similarities and differences. *Microchemical Journal*, 159, 105539. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105539>

Rodrigues, D., Freitas, A. C., Pereira, L., Rocha-Santos, T. A. P., Vasconcelos, M. W., Roriz, M., Rodríguez-Alcalá, L. M., Gomes, A. M. P., & Duarte, A. C. (2015). Chemical composition of red, brown and green macroalgae from Buarcos bay in Central West Coast of Portugal. *Food Chemistry*, 183, 197–207.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.057>

Romero-Vargas, A., Muñoz, I., Marzo, C., Díaz, A. B., Romero-García, L. I., & Blandino, A. (2023). Ultrasound pretreatment to enhance the enzymatic hydrolysis of *Dictyota dichotoma* for sugars production. *Algal Research*, 71, 103083.

<https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103083>

- Satmalee, P., Pantoa, T., Saah, S., Paopun, Y., Tamtin, M., Kosawatpat, P., & Thongdang, B. (2023). Effects of pretreatment and drying methods on physical properties and bioactivity of sea lettuce (*Ulva rigida*). *Food Science and Technology*, *43*, e113622. <https://doi.org/10.1590/fst.113622>
- Sharma, M., Prakash Chaudhary, J., Mondal, D., Meena, R., & Prasad, K. (2015a). A green and sustainable approach to utilize bio-ionic liquids for the selective precipitation of high purity agarose from an agarophyte extract. *Green Chemistry*, *17*(5), 2867–2873. <https://doi.org/10.1039/C4GC02498B>
- Sharma, M., Prakash Chaudhary, J., Mondal, D., Meena, R., & Prasad, K. (2015b). A green and sustainable approach to utilize bio-ionic liquids for the selective precipitation of high purity agarose from an agarophyte extract. *Green Chemistry*, *17*(5), 2867–2873. <https://doi.org/10.1039/C4GC02498B>
- Sharma, M., Prakash Chaudhary, J., Mondal, D., Meena, R., & Prasad, K. (2015c). A green and sustainable approach to utilize bio-ionic liquids for the selective precipitation of high purity agarose from an agarophyte extract. *Green Chemistry*, *17*(5), 2867–2873. <https://doi.org/10.1039/C4GC02498B>
- Sneha, M., Sowmya, S., Premalatha, M., Mathivanan, K., Muthukumar, K., & Mathimani, T. (2023). Multifarious extraction methodologies for ameliorating lipid recovery from algae. *Environmental Research*, *218*, 114978. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114978>
- Suarez Garcia, E., Miranda, C. F., Cesario, M. T., Wijffels, R. H., Van Den Berg, C., & Eppink, M. H. M. (2023). Ionic Liquid-Assisted Selective Extraction and Partitioning of Biomolecules from Macroalgae. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, *11*(5), 1752–1762. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.2c05823>

- Trivedi, T. J., & Kumar, A. (2014). Efficient Extraction of Agarose from Red Algae Using Ionic Liquids. *Green and Sustainable Chemistry*, 04(04), 190–201.
<https://doi.org/10.4236/gsc.2014.44025>
- Vinatoru, M., Mason, T. J., & Calinescu, I. (2017). Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 97, 159–178.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.002>
- Wang, L., Shen, Z., Mu, H., Lin, Y., Zhang, J., & Jiang, X. (2017). Impact of alkali pretreatment on yield, physico-chemical and gelling properties of high quality agar from *Gracilaria tenuistipitata*. *Food Hydrocolloids*, 70, 356–362.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.11.042>
- Wang, T.-P., Chang, L.-L., Chang, S.-N., Wang, E.-C., Hwang, L.-C., Chen, Y.-H., & Wang, Y.-M. (2012). Successful preparation and characterization of biotechnological grade agarose from indigenous *Gelidium amansii* of Taiwan. *Process Biochemistry*, 47(3), 550–554. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.12.015>
- WEB CEAS 6ante08.alghe.2020.1.pdf*. (s.d.).
- Xiao, Q., Wang, X., Zhang, J., Zhang, Y., Chen, J., Chen, F., & Xiao, A. (2021a). Pretreatment Techniques and Green Extraction Technologies for Agar from *Gracilaria lemaneiformis*. *Marine Drugs*, 19(11), 617. <https://doi.org/10.3390/md19110617>
- Xiao, Q., Wang, X., Zhang, J., Zhang, Y., Chen, J., Chen, F., & Xiao, A. (2021b). Pretreatment Techniques and Green Extraction Technologies for Agar from *Gracilaria lemaneiformis*. *Marine Drugs*, 19(11), 617. <https://doi.org/10.3390/md19110617>
- Xiao, Q., Weng, H., Ni, H., Hong, Q., Lin, K., & Xiao, A. (2019). Physicochemical and gel properties of agar extracted by enzyme and enzyme-assisted methods. *Food Hydrocolloids*, 87, 530–540. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.041>

- Xiao, Q., Yin, X., An, D., Chen, J., Chen, F., Zhang, Y., Weng, H., & Xiao, A. (2023). Development of a novel agar extraction method using calcium hydroxide and carbon dioxide. *Algal Research*, 69, 102933. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102933>
- Yanagawa T. (1938). The influence of sodium hydroxide on mucilagenous extracts of red-algae. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 247–276.
- Zhang, J., Yin, X., Chen, F., & Xiao, A. (2023a). An ecofriendly agar extraction strategy using KOH for boiling extraction and MgCl₂ for alkali neutralization. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 31, 100909. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100909>
- Zhang, J., Yin, X., Chen, F., & Xiao, A. (2023b). An ecofriendly agar extraction strategy using KOH for boiling extraction and MgCl₂ for alkali neutralization. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 31, 100909. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2022.100909>
- Zhang, R., Wang, Q., Shen, H., Yang, Y., Liu, P., & Dong, Y. (2024). Environmental benefits of macroalgae products: A case study of agar based on life cycle assessment. *Algal Research*, 78, 103384. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103384>