



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

DIPARTIMENTO DI

SCIENZE CHIMICHE, BIOLOGICHE, FARMACEUTICHE ED AMBIENTALI

CORSO DI DOTTORATO IN SCIENZE CHIMICHE XXXV CICLO CHIM/10-11

Valorizzazione di scarti alimentari tramite tecniche analitiche e fermentative per la produzione di *health food*, probiotici e biocarburanti.

Tesi di dottorato di:

Giovanna Lo Vecchio

Giovanna Lo Vecchio

Relatore:

Chiar.mo Prof. Giacomo Dugo

Anno Accademico 2022/2023

Sommario

Premessa	9
1. Introduzione	10
2. Gli scarti nelle filiere produttive	15
2.1. La filiera lattiero-casearia.....	15
2.2. La filiera ittica	20
2.3. La filiera delle carni.....	24
3. La filiera agroalimentare	29
3.1. Gli scarti della filiera agroalimentare.....	32
3.2. Scarti di frutta e verdura.....	33
3.2.1. Scarti di agrumi.....	34
3.3. Biomasse lignocellulosiche	37
3.3.1. Cibi funzionali da biomasse lignocellulosiche	40
3.3.2. Bioetanolo da scarti lignocellulosici.....	42
4. Bibliografia.....	44
5. Scopo della tesi	48
6. Parte sperimentale.....	50
6.1. Riciclaggio dei rifiuti di potatura di <i>Opuntia-ficus indica</i>: Recupero e Caratterizzazione delle Mucillagini da Cladodi... 51	
6.1.1. Introduzione	51
6.1.2. Materiali e metodi.....	52
6.1.2.1. Sostanze chimiche e reagenti	53
6.1.2.2. Analisi fisiche e chimiche	53
6.1.2.3. Analisi DART-MS	56

6.1.2.4. Analisi statistica	57
6.1.3. Risultati e discussioni	57
6.1.3.1. Caratterizzazione fisica dell'idrocolloide	58
6.1.3.2. Composizione chimica	60
6.1.3.3. Identificazione dei composti organici mediante DART-MS	64
6.1.4. Mucillagine: potenziali applicazioni industriali	69
6.1.5. Bibliografia	71
6.2. Caratterizzazione chimica del nopal secco siciliano	
[Opuntia ficus-indica (L.) Mill.]	75
6.2.1. Introduzione	75
6.2.2. Materiali e metodi	76
6.2.2.1. Materiali e reagenti	78
6.2.2.2. Composizione prossimale	79
6.2.2.3. Composizione di acidi grassi (FA)	80
6.2.2.4. Elementi minerali	82
6.2.2.5. Polifenoli	84
6.2.2.6. Zuccheri	86
6.2.2.7. Analisi statistica	87
6.2.3. Risultati e discussioni	87
6.2.3.1. Composizione prossimale	88
6.2.3.2. Acidi grassi (FA)	90
6.2.3.3. Zuccheri	94
6.2.3.4. Elementi minerali	95
6.2.3.5. Polifenoli	99

6.2.4. Conclusioni	103
6.2.5. Bibliografia	104
6.3. Caratterizzazione chimica di diversi prodotti di <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill. Tunisino	108
6.3.1. Introduzione	108
6.3.2. Materiali e metodi	111
6.3.2.1. Campioni	111
6.3.2.2. Reagenti	113
6.3.2.3. Composizione prossimale	113
6.3.2.4. Acidi grassi (FA)	115
6.3.2.5. Elementi minerali	117
6.3.2.6. Zuccheri	118
6.3.2.7. Polifenoli totali e singoli	119
6.3.2.8. Analisi statistica	122
6.3.3. Risultati e discussioni	123
6.3.3.1. Composizione prossimale	123
6.3.3.2. Acidi grassi	126
6.3.3.3. Elementi minerali	131
6.3.3.4. Zuccheri	135
6.3.3.5. Polifenoli	137
6.3.4. Conclusioni	141
6.3.5. Bibliografia	142
6.4. Cladodi di <i>Opuntia ficus indica</i> come substrato di fermentazione di <i>Lactobacillus acidophilus</i> La5 per la produzione di acido lattico	150

6.4.1. Introduzione	150
6.4.2. Materiali e metodi	152
6.4.2.1. Matrice	152
6.4.2.2. Pretrattamento della biomassa	153
6.4.2.3. Condizioni di crescita del ceppo batterico	153
6.4.2.4. Test di fermentazione	154
6.4.2.5. Composizione prossimale	155
6.4.2.6. Elementi minerali	156
6.4.2.7. Zuccheri riducenti	157
6.4.2.8. Determinazione dell'acido lattico	157
6.4.2.9. Parametri cinetici	158
6.4.2.10. Analisi statistica	159
6.4.3. Risultati	159
6.4.3.1. Composizione prossimale	159
6.4.3.2. Elementi minerali	159
6.4.3.3. Zuccheri totali e riducenti	160
6.4.3.4. Crescita di <i>Lactobacillus acidophilus</i> La 5	161
6.4.4. Discussioni	162
6.4.5. Conclusioni	166
6.4.6. Bibliografia	167
6.5. Da sottoprodotto ad alimento funzionale: la sopravvivenza di <i>L. casei shirota</i>, <i>L. casei immunitas</i> e <i>L. acidophilus johnsonii</i>, durante l'essiccazione a spruzzo in succo d'arancia utilizzando una miscela maltodestrina/pectina come vettore	170

6.5.1. Introduzione	170
6.5.2. Materiali e metodi	174
6.5.2.1. Ceppi batterici	174
6.5.2.2. Succo di arancia e pectine	174
6.5.2.3. Preparazione della soluzione e <i>spray drying</i>	176
6.5.2.4. Test di dissoluzione	177
6.5.2.5. Determinazione della vitamina C.....	177
6.5.2.6. Enumerazione dei batteri lattici vitali	177
6.5.2.7. Analisi statistica	178
6.5.3. Risultati e discussioni	178
6.5.4. Bibliografia	184
6.6. Caratterizzazione chimica, attività antibatterica e tossicità embrionale acuta di <i>Rhus coriaria L.</i> Genotipo della Sicilia (Italia).....	186
6.6.1. Introduzione	186
6.6.2. Materiali e metodi	189
6.6.2.1. Reagenti e prodotti chimici	189
6.6.2.2. Materiale vegetale	190
6.6.2.3. Composizione prossimale	190
6.6.2.4. Determinazione degli antociani e fenoli totali	191
6.6.2.5. Determinazione degli elementi minerali.....	192
6.6.2.6. Preparazione dell'estratto.....	193
6.6.2.7. Determinazione del contenuto dei polifenoli nell'estratto in metanolo (SM)	194
6.6.2.8. Attività antimicrobica.....	196

6.6.2.8.1. Ceppi batterici	196
6.6.2.8.2. Test di sensibilità antimicrobica.....	196
6.6.2.8.3. Determinazione dell'attività antibatterica degli estratti mediante tecnica di diffusione su disco.....	197
6.6.2.8.4. Determinazione della concentrazione minima inibente (MIC) dell'estratto SM	198
6.6.2.9. Test di tossicità acuta dell'embrione	199
6.6.2.10. Analisi statistica	200
6.6.3. Risultati e discussioni	201
6.6.3.1. Composizione prossimale	201
6.6.3.2. Attività antimicrobica.....	204
6.6.3.3. Tossicità acuta dell'embrione di pesce (FET)	209
6.6.4. Conclusioni	211
6.6.5. Bibliografia	212
6.7. Produzione di bioetanolo da scarti di agrumi	216
6.7.1. Introduzione	216
6.7.2. Materiali e metodi.....	219
6.7.2.1. Campioni	219
6.7.2.2. Reagenti.....	220
6.7.2.3. Substrato di fermentazione.....	220
6.7.2.4. Microrganismi impiegati nella fermentazione.....	221
6.7.2.5. Composizione prossimale	221
6.7.2.6. Zuccheri insolubili	222
6.7.2.7. Idrolisi con trattamenti termomeccanici	224
6.7.2.8. Idrolisi enzimatica.....	224

6.7.2.9. Processo di fermentazione	225
6.7.2.10. Determinazione dell'etanolo prodotto	226
6.7.3. Risultati e discussioni	227
6.7.3.1. Composizione prossimale	227
6.7.3.2. Identificazione dei migliori ceppi per la produzione di etanolo	227
6.7.3.3. Fermentazione	228
6.7.4. Conclusioni	229
6.7.5. Bibliografia	230
7. Conclusioni finali e prospettive future	232
8. Ringraziamenti.....	234

Premessa

Durante il triennio del dottorato di ricerca in Scienze Chimiche, presso l'Università degli Studi di Messina, l'interesse è stato quello di individuare delle tecniche di valorizzazione di alcune tipologie di biomasse inquinanti, caratterizzate, tuttavia, da un elevato potenziale energetico. Partendo da tali presupposti, quindi, si è scelto di articolare il testo inserendo una parte introduttiva relativa alla definizione di rifiuti e di economia circolare, seguita da un secondo capitolo dedicato alla descrizione delle varie tipologie di scarti provenienti dalle filiere produttive con particolare riferimento agli scarti della filiera agroalimentare. Successivamente, è stato inserito un quinto capitolo dedicato allo scopo del lavoro. Dal sesto capitolo si passa alla parte sperimentale della seguente tesi di Dottorato, focalizzata sulla valorizzazione di prodotti di scarto. Tutti i risultati ottenuti sono successivamente stati oggetto di pubblicazione scientifica in riviste indicizzate.

1. Introduzione

L'Unione Europea, attraverso le sue politiche e piani di azione si è posta come scopo la promozione dell'innovazione industriale dei prodotti e dei processi, in modo da poter ridurre gli impatti ambientali ad essi associati. I 194 stati membri dell'ONU nel 2015 hanno firmato e sottoscritto l'agenda 2030 che è un programma d'azione costituito da 17 obiettivi tutti incentrati sullo sviluppo sostenibile su tre dimensioni (economico, sociale ed ecologico). Un argomento chiave per la riduzione degli impatti ambientali è il riciclo degli scarti che derivano dai processi produttivi animali e vegetali definiti come *scarti alimentari (FW)*. *L'Organizzazione per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO)*, fornisce due definizioni di “*spreco alimentare*”, una associata ad una perdita involontaria che si riferisce, quindi, agli scarti di produzione delle varie filiere produttive, l'altra associata allo spreco di cibo idoneo al consumo umano ma che non viene consumato perché scartato (FAO, 2011). La stessa FAO ha deciso di valutare successivamente e in maniera più accurata e precisa la quantità di cibo persa nella catena di produzione e di approvvigionamento prima di raggiungere la fase di vendita attraverso l'indice *FLI (Food Loss Index)*, producendo in merito, nel 2019, un dettagliato rapporto. La stima accurata del FLI consente di affermare che il 14% del cibo mondiale viene perso nelle fasi che vanno dalla produzione alla vendita.

L'Unione Europea (UE) con la Direttiva 2018/815 definisce i rifiuti organici o alimentari come "*i rifiuti biodegradabili di giardini e parchi, rifiuti alimentari e di cucina prodotti da nuclei domestici, uffici, ristoranti, attività all'in- grosso, mense, servizi di ristorazione e punti vendita al dettaglio e rifiuti equiparabili prodotti dagli impianti dell'industria alimentare*"

L'articolo 7, comma 1 del *D.lgs. 22/97* e successive modifiche e integrazioni, prevede la classificazione dei rifiuti, secondo l'origine, in rifiuti urbani e rifiuti speciali e, secondo le caratteristiche di pericolosità, in rifiuti pericolosi e rifiuti non pericolosi.

Dal punto di vista normativo il rifiuto è definito, secondo *l'articolo 183*, come "*qualsiasi sostanza od oggetto di cui il detentore si disfi o abbia l'intenzione o abbia l'obbligo di disfarsi*". *L'articolo 184 bis TUA* invece recita che un sottoprodotto - e non un rifiuto - "*è qualsiasi sostanza od oggetto che soddisfa tutte le seguenti condizioni*":

- a) la sostanza o l'oggetto è originato da un processo di produzione, di cui costituisce parte integrante, e il cui scopo primario non è la produzione di tale sostanza od oggetto;
- b) è certo che la sostanza o l'oggetto sarà utilizzato, nel corso dello stesso o di un successivo processo di produzione o di utilizzazione, da parte del produttore o di terzi;

c) la sostanza o l'oggetto può essere utilizzato direttamente senza alcun ulteriore trattamento diverso dalla normale pratica industriale;

d) l'ulteriore utilizzo è legale, ossia la sostanza o l'oggetto soddisfa, per l'utilizzo specifico, tutti i requisiti pertinenti riguardanti i prodotti e la protezione della salute e dell'ambiente e non porterà a impatti complessivi negativi sull'ambiente o la salute umana.

Il residuo di produzione, invece, non acquisisce né il significato di rifiuto, né di sottoprodotto, bensì subisce una legislazione differente che era di complicata gestione per le aziende fino alla pubblicazione del *Decreto 164/2016* riportante i criteri indicativi per agevolare la dimostrazione della sussistenza dei requisiti per la qualifica dei residui di produzione come sottoprodotti e non come rifiuti. Le Camere di Commercio competenti istituiscono degli elenchi in cui si iscrivono i produttori e gli utilizzatori di sottoprodotti. Oltre alle generalità e ai contatti dei soggetti iscritti, nell'elenco viene indicata la tipologia dei sottoprodotti oggetto di attività. La gestione di un residuo non deve in alcun modo causare, attraverso la sua trasformazione, un impatto ambientale negativo. I processi idonei alla trasformazione dei sottoprodotti devono far parte del ciclo produttivo e non rappresentare una minaccia per l'ambiente e il consumatore (*Cassa. Pen. 32207/2007*). In particolare, per il settore delle biomasse impiegate a fini energetici, è consentito l'utilizzo di sottoprodotti provenienti da attività

alimentari ed agroindustriali che subiscono processi di lavaggio, essiccazione, insufflazione di aria, raffinazione, triturazione, omogeneizzazione, fermentazione naturale, centrifugazione, disidratazione, disgregazione fisico-meccanica. Tali attività, infatti, per loro natura, alle medesime condizioni, potrebbero essere qualificate come normale pratica industriale anche con riferimento a settori e materiali diversi da quello delle biomasse destinate ad uso energetico.

L'aumento demografico e la moltiplicazione dei beni consumati hanno provocato nell'ambiente flussi e concentrazioni superiori alle capacità naturali di assorbimento e degradazione degli scarti. Le recenti strategie finalizzate alla riduzione dei rifiuti e al loro riutilizzo, acquistano un ruolo prioritario non solo nelle politiche ambientali, ma anche in quelle economiche. Ormai è riconosciuto che i rifiuti sono una fonte di ricchezza se trasformati da “scarto” a “risorsa”.

La *bioeconomia* o “*Circular economy*” è il concetto cardine sul quale si fonda il riutilizzo degli scarti. Secondo la definizione dell'Unione Europea, l'economia circolare è un modello di produzione e consumi che ha l'obiettivo di ridurre al minimo gli sprechi di risorse (energia e materiali). Terminata la produzione del bene i materiali con cui è composto vengono recuperati e riutilizzati contribuendo a ridurre i rifiuti generati al minimo. Questi materiali, infatti, diventeranno nuove materie prime e

potranno essere riutilizzati diverse volte all'interno dei cicli produttivi generando ulteriore valore" (Fig 1).



Figura 1: Rappresentazione dell'economia circolare secondo UE

I rifiuti biodegradabili contengono un ampio gruppo di rifiuti: non solo una parte dei rifiuti solidi urbani (a volte chiamati *BMW*, *rifiuti urbani biodegradabili*) o rifiuti verdi, rifiuti alimentari, carta, cartone e plastica biodegradabile, ma anche rifiuti umani, letame, fanghi di depurazione, e rifiuti di macellazione. Rigorosamente, rifiuti organici significano rifiuti biodegradabili di giardini e parchi, rifiuti alimentari e di cucina provenienti da famiglie, ristoranti, ristoratori e locali di vendita al dettaglio e

rifiuti simili provenienti da impianti di trasformazione alimentare e rifiuti agricoli. Le tendenze nella produzione di rifiuti biodegradabili mostrano che nella maggior parte dei paesi i volumi di tali rifiuti prodotti aumentano ed è chiaro che la tendenza continuerà. A ciò dovrebbe seguire una corretta gestione di tale frazione in termini di qualità e quantità del flusso raccolto e selezione di modelli gestionali sostenibili. Richiede un nuovo approccio alla gestione e allo smaltimento, che includa non solo l'identificazione di flussi o nuove tecnologie, ma anche la sicurezza ambientale o l'analisi LCA.

2. Gli scarti nelle filiere produttive

2.1. La filiera lattiero-casearia

Secondo i dati ISTAT, nel 2021 In Italia, il settore lattiero-caseario ha registrato un fatturato di circa 17 miliardi di cui 11 solo di produzione di formaggio divisi tra i 5 miliardi delle Dop e i 6 miliardi dei formaggi non di origine. In tabella 1 sono riportati i dati ISTAT relativi alla produzione tra il 2020 e il 2021 in Italia.

Italia		
Quantità di prodotti lattiero caseari		
Tipo di prodotto lattiero caseario	2020	2021
totale latte raccolto in quintali	132822276	137677268
materia grassa complessiva del latte raccolto in quintali	5339579	5461442
latte alimentare totale (latte trattato igienicamente) in quintali	24488850	24883147
crema o panna da consumo in quintali	1454916	1483426
latte fermentato (yogurt ed altri) in quintali	2787644	2804941
burro totale in quintali	922474	929986
formaggi totale in quintali	13446944	13742484
formaggi a pasta dura in quintali	4931901	5024407
formaggi a pasta semidura in quintali	906883	963416
formaggi a pasta molle in quintali	1876887	1927713
formaggi freschi (a pasta filata, a pasta non filata, a base di crema) in quintali	5731273	5826948
formaggi fusi in quintali	540712	551810

Tabella 1: Produzione di lattiero-caseari. (dati in quintali annui). ISTAT 2021

Per formaggio si intende “*il prodotto che si ricava dal latte intero ovvero parzialmente o totalmente scremato, oppure dalla crema, in seguito a coagulazione acida o presamica, anche facendo uso di fermenti e di sale di cucina*”. (Decr. 15 ott. 1925, n. 2033, art. 32)

Gli unici ingredienti ammessi per la produzione del formaggio sono il latte, il caglio, (i fermenti) e il sale. Il *flavour* e le caratteristiche del prodotto finito dipendono fortemente dalle caratteristiche del latte utilizzato per il processo.

La produzione di formaggio deriva principalmente da due eventi: uno enzimatico (da parte del caglio) e uno fermentativo (da parte dei microrganismi lattici).

Nonostante le innumerevoli varietà di formaggi, il processo di caseificazione è costituito dalle seguenti fasi:

- preparazione del latte (pastorizzazione, stagionatura, correzione della sostanza grassa)
- coagulazione presamica (ad opera del caglio) o acida
- rottura della cagliata
- cottura (i tempi e le temperature variano in base al tipo di formaggio da produrre)
- estrazione della cagliata
- messa in forma
- salagione (a secco o per immersione)
- maturazione (da qualche giorno a più di due anni)

Il latte che esce sterile dalla mammella viene contaminato dai microrganismi presenti nell'ambiente, per tale motivo, deve essere opportunamente trattato (pastorizzazione, trattamento a freddo) per garantire la salubrità del prodotto. In particolare, nei formaggi freschi è necessario il processo di pastorizzazione, in quelli stagionati è sufficiente lavorare in condizioni rigorosamente igieniche. Il primo passo verso produzione vera e propria del formaggio è la correzione della frazione grassa con l'aggiunta di crema (parte grassa del latte ottenuta dal latte fresco per affioramento spontaneo o centrifugazione). I formaggi denominati

“grassi”, devono avere almeno il 3,4% di grassi, mentre i “semi-magri” intorno al 2,5%. La coagulazione può essere *presamica*, quando avviene ad opera degli enzimi presenti nel caglio in particolare le chimosine, o *acida*, quando la coagulazione avviene per precipitazione acida della caseina.

Durante la rottura della cagliata viene spurgato il siero che rappresenta il principale sottoprodotto di tale filiera. Infine, il prodotto verrà cotto, salato e fatto maturare in base al tipo di formaggio che si vuole ottenere.

Il siero da latte è il principale sottoprodotto ottenuto, esso viene utilizzato a scopo mangimistico e zootecnico nell'allevamento dei suini. Non meno importante è il suo utilizzo per la produzione della ricotta, ottenuta mediante un secondo trattamento termico del siero. Il processo di coagulazione in questa fase avviene ad alte temperature (80-90°C) e le proteine interessate sono soprattutto l'albumina e la globulina. A causa della continua crescita dell'industria lattiero-casearia, vengono prodotte grandi quantità di siero di latte, il quale può rappresentare un rischio per l'ambiente se non gestito correttamente. La domanda chimica di ossigeno (COD) del siero di latte può variare da 50 a 80 g/L, mentre la domanda biochimica di ossigeno (BOD) varia da 40 a 60 g/L (1).

Il carico organico del siero di latte è dato principalmente da lattosio (70%), proteine (14%) e grassi (3%) (Blažić *et al.*, 2018).

Lo smaltimento del siero di latte, oltre a rappresentare un problema di inquinamento ambientale, genera una notevole perdita di

nutrienti in esso contenuti; pertanto, l'interesse della comunità scientifica è volto allo sviluppo di prodotti dal valore aggiunto a partire da tale sottoprodotto. Esistono diversi metodi per la gestione sostenibile del siero di latte che sono per lo più orientati alle applicazioni biotecnologiche e alimentari come: siero di latte in polvere, alimenti e bevande funzionali, acido lattico, bioetanolo, bioplastiche, biogas, ecc. Grandi quantità di siero di latte possono essere trasformate in bioetanolo, mentre per quantità minori è più economico produrre bevande a base di siero di latte fermentate o non fermentate (Papademas *et al.*, 2019).

La produzione di siero di latte in polvere è uno dei metodi maggiormente utilizzati e prevede le seguenti fasi:

- *chiarificazione*: chiarifica del siero di latte.
- *separazione* della panna e *pastorizzazione*.
- *concentrazione* dei solidi totali (40-60% mediante evaporazione).
- *crystallizzazione* del lattosio.
- *essiccazione* del siero di latte

Se la cristallizzazione del lattosio non viene eseguita, la massa solida della polvere sfusa formata è adatta solo per l'alimentazione animale come fonte economica di proteine e carboidrati di alta qualità (Papademas *et al.*, 2019).

L'uso dei processi di digestione, per la produzione di energie sostenibili, è diventato un'alternativa abbastanza comune nel trattamento dei residui agroindustriali. Inoltre, il biogas prodotto

può essere utilizzato nella produzione di energia, con conseguenti vantaggi sia ambientali che economici. La digestione anaerobica del siero di latte, per l'elevato carico organico, porta a una rapida evoluzione acida e quindi, ad una bassa produzione di biogas, per rendere il processo più efficiente, il siero di latte dovrebbe essere miscelato con altri tipi di rifiuti e/o letame (Çelik *et al.*, 2016). Quando il siero di latte viene digerito utilizzando, ad esempio, le acque reflue dei suini come inoculo si ha una riduzione di solidi volatili e una maggiore resa di biogas (Antonelli *et al.*, 2016). Il siero di latte può essere utilizzato anche per la produzione di acido lattico attraverso processi fermentativi. L'acido lattico esiste in due forme o isomeri l (+) e d (-), solo il primo può essere utilizzato nell'industria alimentare in quanto il secondo risulta essere dannoso per l'uomo (FAO/WHO, 1967). Il lattosio contenuto nel siero può essere convertito in acido lattico tramite processi di fermentazione ad opera di batteri, funghi e lieviti (Idler *et al.*, 2015).

2.2. La filiera ittica

Secondo il Rapporto 2022 dell'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO) su “*The State of World Fishing and Aquaculture*” (SOFIA), la produzione ittica globale totale è diminuita a causa del COVID-19. Nel 2020, la produzione mondiale totale di cattura e acquacoltura è salita a 214 milioni di tonnellate (MT), ma la produzione ittica globale effettiva è

leggermente diminuita a 178 milioni di tonnellate, la restante produzione di alghe ha fornito 36 milioni di tonnellate.

Nella filiera ittica gli scarti sono stimati tra 30% e l'85% (Al Khawli *et al.*, 2019) questo ampio intervallo dipende dalle varietà di pesce e dal tipo di pesca impiegato. Una particolarità di tale produzione è che non tutto il pescato viene poi commercializzato, si stima che una notevole percentuale del pescato non venga distribuito per la vendita. Inoltre, gli allevamenti generano un accumulo di deiezioni che rappresentano un importante problema ambientale. È importante notare che, di solito, gli scarti del pesce (testa, pelle, viscere e ossa) vengono smaltiti nei mari e negli oceani determinando un consumo di ossigeno da parte dei microrganismi aerobi che comporta, in seguito alla diminuzione del pH e del contenuto di ossigeno nell'acqua, ad un sovraccarico di azoto, fosforo e ammoniaca, ad un aumento della torbidità e, quindi, alla decomposizione delle alghe. Gli scarti della filiera ittica sono eterogenei (tabella 2), costituiti da diverse componenti; pertanto, possono generare la produzione di diverse tipologie di prodotti dal valore aggiunto come collagene marino, acidi grassi della serie omega-3 e numerose altre sostanze di interesse per l'industria cosmetica, farmaceutica e nutraceutica e per la produzione di biodiesel. La frazione proteica rappresenta una fonte nutritiva preziosa sia per l'uomo sia per gli animali per la completezza del suo profilo amminoacidico.

Nutrienti	
Proteine (%)	57.92± 5.26
Lipidi (%)	19.10 ± 6.06
Fibre (%)	1.19 ± 1.21
Ceneri (%)	21.79 ± 3.52
Calcio (%)	5.80 ± 1.35
Fosforo (%)	2.04 ± 0.64
Potassio (%)	0.68 ± 0.11
Sodio (%)	0.61 ± 0.08
Magnesio (%)	0.17 ± 0.04
Ferro (mg/Kg)	100.00 ± 42.00
Zinco (mg/Kg)	62.00 ± 12.00
Manganese (mg/Kg)	6.00 ± 7.00
Rame (mg/Kg)	1.00 ± 1.00

Tabella 2: Composizione chimica media di scarti ittici. (Brooks *et al.*, 2013)

Le componenti degli scarti sono costituite da:

❖ **Composti azotati**

- Proteine e aminoacidi, che hanno un valore nutrizionale maggiore rispetto alle proteine vegetali, alcuni peptidi bioattivi hanno trovato largo impiego nell'industria farmaceutica, cosmetica, nutraceutica ed alimentare (Aspevik *et al.*, 2017).

- Enzimi come pepsina, chimotripsina e tripsina, principalmente estratti dalle viscere risultano avere una potente attività catalica (Ghaly *et al.*, 2013).
- Collagene di tipo I, II, III, IV e V che possiede una stabilità termica inferiore rispetto all'analogo estratto da scarti animali ma a differenza di quest'ultimo non desta preoccupazioni di tipo sanitario (come la BSE bovina) né di tipo etico (Silva *et al.*, 2014)
- Gelatina di tipo A (da idrolisi acida) e di tipo B (idrolisi alcalina). La gelatina estratta dalla pelle di pesce risulta avere proprietà antiossidanti e antipertensive maggiori della gelatina di origine bovina (Ghaly *et al.*, 2013).

❖ **Composti lipidici**

- Olio, costituito principalmente da acido eicosapentaenoico (EPA) e acido docosaesaenoico (DHA) che, tra le altre attività, contribuiscono al normale funzionamento del cuore.
- Fosfolipidi, che contengono acidi grassi poli-insaturi (PUFA) omega-3 utilizzati come emulsionanti nell'industria alimentare e cosmetica.
- Squalene, intermedio nella sintesi di colesterolo, ormoni steroidei e della vitamina D. Trova largo impiego sia nell'industria cosmetica per le sue capacità *antiaging* e idratanti (Korkina *et al.*, 2018) che nell'industria

alimentare e farmaceutica per la stabilizzazione di emulsioni.

- Vitamina A e Vitamina D, in particolare la vitamina D è presente soprattutto in pesci grassi come aringa, tonno, sardina e salmone.

❖ **Chitina e chitosano**

La chitina è il secondo polimero naturale più abbondante, è costituita chimicamente da più unità di glucosammina e N-acetilglucosammina legate tra loro da un legame di tipo β -1,4. La deacetilazione parziale della chitina porta alla formazione del chitosano. Le possibili applicazioni della chitina e dei suoi derivati spaziano dall'utilizzo in prodotti alimentari a valore aggiunto (es. ingrediente di integratori alimentari), alla conservazione degli alimenti, alla formazione di pellicole biodegradabili (Bofei *et al.*, 2021)

❖ **Pigmenti naturali** come Luteina, Beta-carotene, Alfa- e Beta-doradexantine, Zeaxantina, Cantaxantina, Astaxantina. I carotenoidi hanno importanti proprietà antiossidanti, inoltre nell'industria cosmetica sono impiegati come additivi in creme e lozioni solari (Ashraf *et al.*, 2020)

2.3. La filiera delle carni

La filiera della carne è quella che produce più scarti rispetto alle altre filiere alimentari. La FAO (Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura) ha stimato che circa

1,3 miliardi di tonnellate annue di cibo potenzialmente disponibile per il consumo viene scartato e buttato durante le varie fasi di lavorazione. La tabella 3 riporta i dati ISTAT relativi alle macellazioni (in quintali) in Italia relativi gli anni 2020/ 2021.

Tipo allevamento	2020	2021
totale bovini	2590724	2666586
totale bufalini	103566	107949
totale equini	20163	21251
totale ovini	2838689	2757909
totale caprini	149948	149350
totale suini	10607632	10943687

Tabella 3: Macellazioni (in quintali) di diversi tipi di allevamenti in Italia

La produzione di bestiame ha un impatto considerevole sull'ambiente in quanto richiede ingenti quantità di beni come acqua e suolo, è necessario, quindi, rendere maggiormente sostenibile la produzione con il recupero degli scarti della filiera. Nonostante la ricerca in corso ed i diversi sviluppi commerciali per nuove fonti proteiche, le proteine animali sono ancora ampiamente utilizzate, infatti, forniscono una fonte ricca e completa di proteine contenenti tutti gli aminoacidi essenziali necessari. Resta il fatto, tuttavia, che gran parte del peso vivo

degli animali macellati è composto da parti non consumabili, che l'industria chiama spesso il “*quinto quarto*”.

Il quinto quarto comprende parti commestibili e non commestibili e può rappresentare rispettivamente il 55% e il 48% del peso vivo di bovini e suini (Mullen *et al.*, 2015)

I regolamenti dell'Unione Europea definiscono specificamente i sottoprodotti di origine animale come “*qualsiasi parte della carcassa animale o qualsiasi materiale di origine animale non destinato per il consumo umano*”. Ciò esclude categoricamente tali materiali dalla catena alimentare umana e include parti dell'animale che possono presentare un rischio per la sicurezza, materiale non commestibile o materiale che l'operatore ha deciso di indirizzare a scopi diversi dal consumo umano. Tale decisione, una volta presa, sarà irreversibile (Regolamento CE, 1069/2009). Nei regolamenti sono definite tre categorie di sottoprodotti di origine animale, in base al livello di rischio presentato per la salute pubblica e animale:

- **Categoria 1** è la categoria di rischio più elevata e comprende, ad esempio, materiali specifici a rischio associati a malattie trasmissibili come l'encefalopatia spongiforme bovina (BSE); nonché sottoprodotti di origine animale contenenti residui di alcune sostanze specificate e contaminanti ambientali;
- **Categoria 2** è considerata ad alto rischio e comprende materiali animali come carcasse infette o contaminate nonché

materiali dichiarati non idonei al consumo umano per la presenza di corpi estranei;

- **Categoria 3** è considerata a basso rischio e comprende, ad esempio, materiali di carcasse non commestibili e privi di infezioni, come pellami e pelli, nonché materiali animali idonei ma non destinati al consumo umano per motivi commerciali.

Le proteine, contenute nei sottoprodotti della filiera, delle carni sono sicuramente la componente più richiesta.

Tali scarti possiedono un'ampia varietà di proprietà biotecnologiche per le formulazioni di prodotti alimentari, ad esempio come schiumogeni ed emulsionanti da impiegare nelle formulazioni alimentari. D'altra parte, il collagene, che è il componente principale del tessuto connettivo e dei tendini, è una proteina molto resistente alla solubilizzazione e di solito rimane come frazione insolubile dopo l'estrazione, quando non si utilizzano estrazioni idrolitiche. Il collagene, se opportunamente lavorato, è un'ottima fonte di gelatina, molto utilizzata nell'industria alimentare per le sue proprietà gelificanti. Infine, sia le proteine solubili che il collagene sono potenziali fonti di peptidi bioattivi di interesse per applicazioni nutraceutiche, biomediche e cosmetiche (Gómez-Guillén *et al.*, 2011; Lafarga *et al.*, 2017).

La pelle e i tendini dei suini e dei bovini sono una buona fonte di collagene fibroso di tipo I, mentre il collagene di tipo II può essere ottenuto dalle cartilagini articolari. Questi tipi di collagene fibroso

sono utilizzati in biomedicina per la produzione di una varietà di materiali (fibre, spugne, film, ecc.) (Mullen *et al.*, 2017).

Dopo l'estrazione, il collagene può subire un'idrolisi acido/alcalina controllata o un processo enzimatico, per generare rispettivamente gelatina o peptidi. Sebbene la pelle/pelli e le ossa di suini e bovini siano la principale fonte di collagene per la produzione di gelatina, molti altri sottoprodotti di carne ricchi di tessuto connettivo potrebbero essere impiegati per la produzione di gelatina o come fonti di collagene idrolizzato, come ad esempio i polmoni (Gómez-Guillén *et al.*, 2011; Roy *et al.*, 2017).

Dall'abomaso di bovini, capre da latte si può produrre un caglio per la formulazione di formaggi costituito da enzimi quali chimosina (EC 3.4.23.4), pepsina A (EC 3.4.23.1) e triacilglicerolo lipasi (triacilglicerolo acilidrolasi, EC 3.1.1.3), tale sottoprodotto è stato verificato per la salubrità dall'EFSA in un rapporto pubblicato nel 2021 (EFSA 2021).

3. La filiera agroalimentare

L' Italia è un paese caratterizzato da caratteristiche pedoclimatiche eterogenee, ciò si traduce nello sviluppo di sistemi colturali molto diversificati che generano prodotti agroalimentari a elevata specializzazione. Il cibo non è più considerato solamente come un bene di prima necessità ma la vocazione in tale settore è influenzata da diversi fattori, tra i quali psicologici, edonistici e culturali. Circa il 50% della superficie del territorio è destinata ad uso colturale (Figura 2) (Tabella 4).

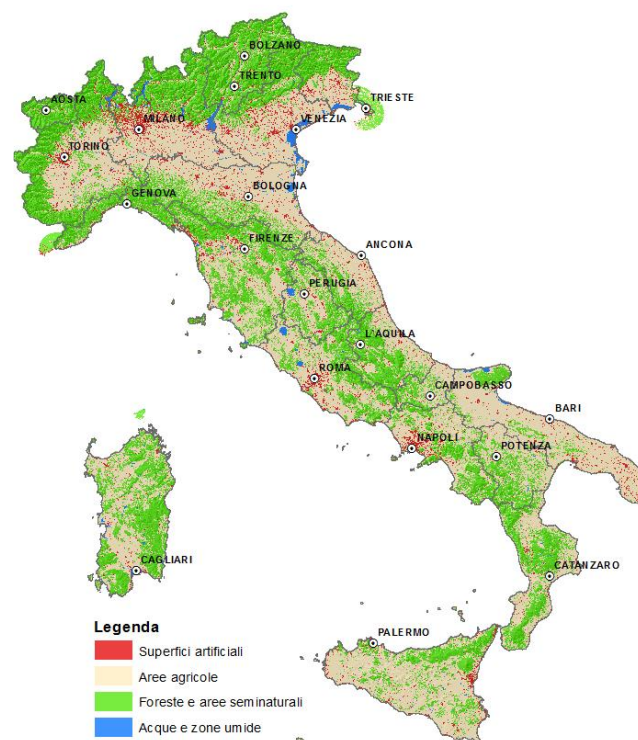


Figura 2: Copertura e uso del territorio italiano (ISPRA)

IT: Italia				
Periodo	2020		2021	
	Produzione totale- quintali	<u>Produzione raccolta - quintali</u>	Produzione totale - quintali	<u>Produzione raccolta - quintali</u>
Tipo di coltivazione				
COMMEAT: frumento tenero	26871402	26686443	30722016	30532650
WHEATD: frumento duro	39966919	38852168	41373262	40650069
RICE: riso	15130575	15130575	14647000	14647000
CEREAOG: altri cereali	1077252	1070296	943272	937902
BEANK: fagiolo secco	134009	132011	125571	124235
LENTIL: lenticchia	49779	48945	50858	50084
CHICS: cece	334984	331697	310522	304394
POTA: patata comune	11316784	11103469	10875014	10669249
TOBAC: tabacco	378306	378306	410117	410117
HEMP: canapa	47460	46694	48042	47097
FIG: fico	127416	121806	133166	127616
LOTU: loti o kaki	481146	462666	474284	455373
POMETES: melograno	157179	152261	192485	186972
PRICKLYPEAR: fichi d'india	1511824	1503865	1547280	1533445
ALMO: mandorla	846672	805164	756468	716211
PISTS: pistacchi	40717	40496	40840	40729
WINEES: uva da vino	72315423	71539749	71947263	71061274
TABLEGRAPES: uva da tavola	10635933	10398417	10410319	10146567
OLIVTAB_OIL: olive da tavola e da olio	23041308	22071547	23657511	22706277
ORANGE: arancia	17995714	17727697	17934681	17709096
LEMON: limone	4790130	4726763	4727469	4663926

Tabella4: Produzione in quintali in Italia nel 2020 e 2021

La filiera agroalimentare estesa rappresenta il primo settore economico in Italia, con un fatturato di oltre 500 miliardi di euro e quasi 4 milioni di occupati. Concentrando l'analisi sulla filiera agroalimentare core (comparto agricolo e industria di

trasformazione), l'Italia è uno dei leader europei per valore aggiunto. Nel 2019, infatti, nel nostro Paese l'agroalimentare ha generato quasi 71 miliardi di dollari in valore aggiunto reale, pari a oltre il 4% del totale nazionale, posizionandosi nel gruppo di testa tra le economie europee: Germania (quasi 76 miliardi di dollari) Francia (75 miliardi di dollari); Spagna (75 miliardi di dollari) (Oxford Economics, 2021). L'elevata produzione di prodotti si traduce in altrettanti rifiuti. Il 18 settembre 2021 QU Dongyu, Direttore Generale della FAO, ha sottolineato l'importanza dell'innovazione per accelerare la trasformazione dei sistemi agroalimentari a livello nazionale. Il 14% circa del cibo prodotto in tutto il mondo va perso tra il momento della raccolta e quello della vendita al dettaglio. Il che equivale ad una perdita di 400 miliardi di dollari all'anno in valore alimentare, mentre va sprecato un 17% stimato della produzione alimentare globale. Una riduzione delle perdite e degli sprechi alimentari si tradurrebbe in un uso più efficiente del suolo e in una migliore gestione delle risorse idriche, con effetti positivi sui cambiamenti climatici e sui mezzi di sussistenza.

La FAO distingue tra *Food loss* e *Food waste*, il primo termine indica la perdita in quantità/qualità di alimenti risultante da decisioni ed azioni degli operatori alimentari ad esclusione della vendita e dei consumatori; il secondo, invece, la perdita in quantità/qualità di alimenti risultante da decisioni ed azioni degli

operatori alla vendita, alla ristorazione ed ai consumatori. La dislocazione della filiera determina che ci siano perdite di prodotti ad ogni livello produttivo dalla raccolta alla vendita e infine, al consumatore.

3.1. Gli scarti della filiera agroalimentare

Non esiste una vera definizione del termine “*rifiuto*” in ambito agroalimentare, in generale, secondo l’articolo 3 della *Waste Framework Directive* (Direttiva 2008/98/EC) è: “*qualsiasi sostanza od oggetto di cui il detentore si disfi o abbia l’intenzione o l’obbligo di disfarsi*”. Secondo la direttiva 2009/28/EC la “*biomassa*” proveniente dal settore agroalimentare è “*la frazione biodegradabile di prodotti, rifiuti e residui di origine biologica provenienti dall’agricoltura, silvicoltura e industrie correlate, comprese la pesca e l’acquacoltura, nonché la frazione biodegradabile dei rifiuti industriali e urbani.*”

Le biomasse derivate dal settore agroalimentare sono eterogenee ma tutte hanno la caratteristica di essere ricche in sostanze organiche; quindi, gli approcci tradizionali di smaltimento in discarica e dell’incenerimento potrebbero causare la generazione di gas tossici che si tradurrebbero in gravi rischi per l’ambiente e la salute umana. È ormai noto come le biomasse possono essere trasformate in prodotti dal valore aggiunto come *health food*, probiotici o biocarburanti.

3.2. Scarti di frutta e verdura

Frutta e verdura sono alimenti caratterizzati da un ricco profilo nutritivo costituito da carboidrati solubili (glucosio, fruttosio), vitamine, minerali, fibre, polifenoli e altri composti bioattivi (Schieber *et al.*, 2017). Frutta e verdura sono classificate nella categoria dei rifiuti solo quando il grado di accettazione è diminuito. Ciò può verificarsi a causa di diversi fattori come reazioni biochimiche (enzimi, antiossidanti, composti fenolici e ossigeno), trattamento termico, attacco microbico (marciume, rammollimento e crescita superficiale) e grado di maturazione. L'amido, la cellulosa e/o le emicellulose dei rifiuti di frutta e verdura vengono idrolizzati a zuccheri solubili e ulteriormente fermentati da microrganismi per produrre etanolo e idrogeno (Dìaz *et al.*, 2017). La fermentazione microbica di scarti di frutta e verdura ha aperto nuovi orizzonti per lo sviluppo di prodotti dal valore aggiunto e utilizzare i “food waste” (FW) come bevande fermentate, proteine unicellulari (*Saccharomyces* sp., *Candida utilis*, *Endomycopsis fibuligera* e *Pichia burtonii*), oli cellulari, polisaccaridi, fibre alimentari, polifenoli, biopigmenti (carotenoidi), fragranze, aromi (vanillina), oli essenziali, biopesticidi, fitoregolatori, enzimi (cellulasi, amilasi, proteasi, fitasi, ecc.), bioidrogeno, bioetanolo e biogas (Panda *et al.*, 2016; Schieber *et al.*, 2017). La fermentazione acidogenica dei rifiuti di frutta e verdura produce acido lattico (Wu *et al.*, 2015).

3.2.1. Scarti di agrumi

Gli agrumi sono consumati, principalmente, allo stato fresco o trasformati in succo. Dopo l'estrazione del succo, circa la metà la massa di frutta viene miscelata con la polpa essiccata e venduta come foraggio per mucche (Damian, 2018; Mahato *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2017). I rifiuti di agrumi (CW), che includono bucce, succo e polpa, sono composti principalmente da pectine e fibre alimentari (Dimopoulou *et al.*, 2019), la composizione fisico-chimica delle scorze di agrumi varia in base al metodo di coltivazione dei frutti, alla fase di maturazione e al tempo di raccolta. (Sharma *et al.*, 2017). I rifiuti generati dagli agrumi sono una risorsa praticamente inesauribile dai quali possono essere prodotti composti fenolici, oli essenziali, metanolo, etanolo e gas di sintesi (Rivas *et al.*, 2013).

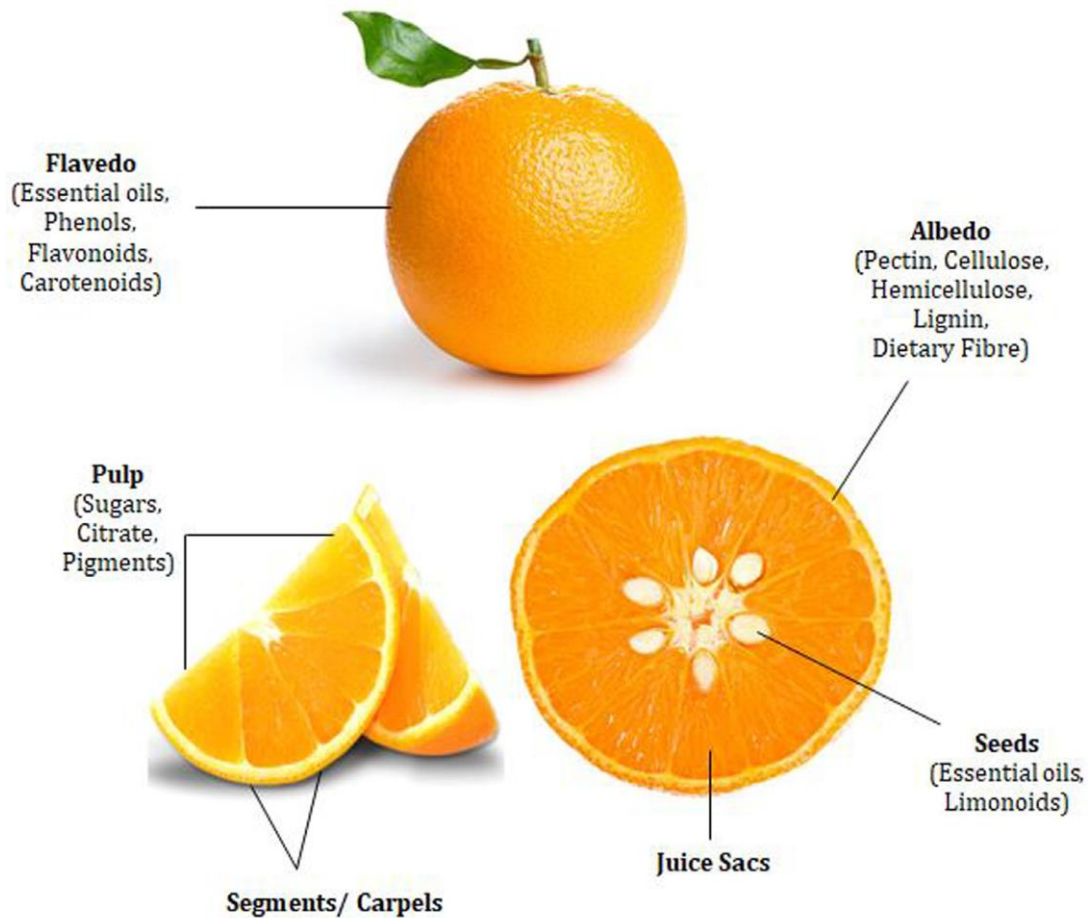


Figura 3: Anatomia degli agrumi (Shweta et al., 2022).

Questi rifiuti includono bucce (50–55% della massa totale del frutto), semi (20–40% della massa totale del frutto), polpa e acque di vegetazione. La lavorazione globale degli agrumi genera circa 10 milioni di tonnellate di rifiuti ogni anno (Zema *et al.*, 2018), creando un serio problema ecologico. Le bucce di agrumi contengono circa l'80% di acqua che favorisce lo sviluppo di batteri, parassiti, muffe che possono produrre micotossine, ecc. Il corretto smaltimento dei rifiuti di agrumi richiede investimenti significativi poiché lo smaltimento non autorizzato porta all'inquinamento del suolo e dell'acqua, distruggendo ulteriormente

l'ecosistema acquatico (Zema *et al.*, 2018). Al contrario, gli scarti di agrumi, le bucce (flavedo e albedo), i semi e le vinacce sono potenziali risorse biotecnologiche, infatti, i componenti bioattivi possono essere impiegati nelle industrie alimentari come additivi, nella preparazione di prodotti canditi per le industrie dolciarie/panetteria o come fonte di pectine, coloranti e aromatizzanti. Le bucce contengono alte concentrazioni di oli essenziali con proprietà antiossidanti, antimicrobiche e fitotossiche. Gli usi non alimentari dei rifiuti di agrumi includono il loro utilizzo come substrato per la produzione di bio-adsorbente, bio-carburante, bio-fertilizzante, materiale da imballaggio e carbone attivo (Sharma *et al.*, 2017).

I carboidrati rappresentano la proporzione maggiore (fino al 70 %, p/p) di composti CW e quindi fungono da principale fonte di zuccheri per i processi di fermentazione (Jeong *et al.*, 2021). Cellulosa, emicellulosa e pectina, che sono principalmente presenti nelle frazioni di buccia e polpa, sono i principali componenti della parete cellulare degli agrumi (Negro *et al.*, 2017). Sebbene vi siano variazioni a seconda della cultivar, l'ordine generale del contenuto di carboidrati (p/p) in CW è il seguente: pectina (13–42,5%) > cellulosa (9,21–37,08%) > emicellulosa (4,28–31,13%) (Jeong *et al.*, 2021). Uno dei vantaggi nell'utilizzo degli scarti di agrumi è il basso contenuto di lignina (da 0,8 a 8,6%), rispetto a quello della maggior parte dei mangimi cellulosici, compresi i residui agricoli e forestali, che contengono dal 15 al 30% di lignina e pectina

limitata. La lignina è una grande molecola recalcitrante che conferisce rigidità alla parete cellulare e, quindi, deve essere degradata per idrolizzare efficacemente e utilizzare il complesso polisaccaridico (Pocan *et al.*, 2018). Nel caso di CW, il basso contenuto di lignina consente un pretrattamento delicato come l'esplosione di vapore, che utilizza il 74% in meno di energia rispetto al pretrattamento acido/alcali (Coral Medina *et al.*, 2018). La pectina è principalmente composta da acido galatturonico (60%–70%) e L-arabinosio (6%–16%), che non vengono fermentati da microrganismi industriali come *S. cerevisiae* (Jeong *et al.*, 2020; Sabater *et al.*, 2021). Pertanto, i recenti sforzi di ricerca si concentrano sullo sviluppo di ceppi di lievito ingegnerizzati in grado di fermentare gli zuccheri della pectina. I trattamenti enzimatici consentono di scindere i carboidrati complessi presenti nei CW in zuccheri fermentescibili, utilizzabili dai microrganismi impiegati per la produzione di biocarburanti e bioetanolo.

3.3. Biomasse lignocellulosiche

La produzione globale di biomassa vegetale, di cui oltre il 90% è lignocellulosa, ammonta a circa 200×10^9 tonnellate/anno, dove rimangono potenzialmente accessibili circa $8\text{--}20 \times 10^9$ tonnellate di biomassa primaria. Negli ultimi anni un crescente interesse è stato rivolto allo sviluppo di nuovi processi per la produzione di energia utilizzando fonti rinnovabili, come le biomasse

lignocellulosiche (BLC). Le BLC, derivanti da coltivazioni dedicate, scarti agricoli e rifiuti organici, sono la più versatile tra le fonti rinnovabili; ricoprono un ruolo chiave per una transizione energetica sostenibile e sono in linea con un modello di “economia circolare” basato sulla valorizzazione dei prodotti di scarto e rifiuti ed il loro reintegro nel ciclo produttivo. Nell’analisi della composizione organica delle matrici vegetali i carboidrati risultano i componenti quantitativamente più abbondanti e di maggiore interesse nei processi di trasformazione biochimica perché altamente degradabili, ma un rilievo importante ha anche la presenza di lignina che complessa parte di tali carboidrati rendendoli indisponibili nei processi fermentativi.

I carboidrati presenti nelle matrici vegetali sono principalmente: amido, cellulosa, emicellulosa e pectina.

L’amido è costituito da due unità polisaccaridiche, amilosio e amilopectina. L’amilosio è un polisaccaride con una struttura lineare derivante dall’unione di centinaia di molecole (da 300 a 3000) di α -D (+) -glucosio che si legano con legami glicosidici α (1→4). L’amilopectina è, invece, un polimero del glucosio altamente ramificato costituito da α -D-glucosio. I glicosidi sono legati in modo lineare tra loro per mezzo di legami di tipo α (1→4); le ramificazioni avvengono con legami di tipo α (1→6). La formazione dell’amido, cioè l’unione dell’amilosio e dell’amilopectina, è catalizzata da un enzima chiamato amido sintetasi.

La cellulosa è un polisaccaride molto abbondante in natura, essendo il componente principale del tessuto fibroso delle pareti cellulari vegetali. Strutturalmente è un polimero di unità di D-glucosio unite con legami di tipo β -1,4 in cui le catene polimeriche sono disposte fianco a fianco mediante un numero elevatissimo di legami idrogeno formando fibrille, catene molto lunghe, ordinate che formano una parte cristallina idrofoba.

Le emicellulose sono polisaccaridi ramificati di varia struttura, strettamente associati alla formazione delle fibre ma in contrapposizione alla cellulosa, la cui molecola lineare è formata da unità di solo glucosio, le emicellulose sono costituite da zuccheri differenti, in particolare zuccheri a cinque atomi di carbonio (pentosi come l'arabinosio e lo xilosio) e zuccheri a sei atomi di carbonio (oltre al glucosio anche mannosio e galattosio). L'emicellulosa maggiormente presente nelle pareti cellulari vegetali è lo xiloglucano; altre emicellulose sono il glucuronoxilano, l'arabinoxilano, il glucomannano e il galattomannano.

La pectina è un eteropolisaccaride composta dall'unione, tramite legami glicosidici, di diversi monosaccaridi ed è costituita essenzialmente da unità di acido galatturonico unite da legami α (1-4) esterificata in prevalenza da gruppi metossi $-\text{OCH}_3$. La pectina ha proprietà gelificanti ovvero, forma con lo zucchero, un reticolo tridimensionale stabile.

La lignina è il polimero più abbondante in natura dopo la cellulosa (Crawford *et al.*,1981) ed è costituito da diversi monomeri fenolici strettamente condensati che la rendono piuttosto complesso dal punto di vista molecolare. I monomeri principali costituenti la lignina sono 3 (alcol p-cumarilico, alcol coniferilico (alcol 4-idrossi-3-metossicinnamilico), alcol sinapilico (alcol 4-idrossi-3,5-dimetossicinnamilico). La lignina costituisce la parete secondaria delle cellule vegetali, la quale si sviluppa sopra la parete cellulare primaria dopo che la cellula si è completamente distesa.

3.3.1. Cibi funzionali da biomasse lignocellulosiche

Le biomasse provenienti dagli scarti agroalimentari oltre a contenere un'altissima concentrazione di carboidrati complessi, sono ricche di sostanze bioattive come polifenoli, oli essenziali, vitamine e proteine, acidi grassi o probiotici che rappresentano delle risorse per la produzione di cibi destinati al consumo animale o umano. Obiettivo al centro di numerosi studi scientifici è quello di recuperare e sfruttare al meglio queste tipologie di scarti alimentari producendo categorie di alimenti dal valore aggiunto chiamati appunto *functional foods* (alimenti funzionali). Negli anni, sono stati molteplici i modi per esprimere il concetto di “*alimento funzionale*”; bensì quello che lo riassume meglio, riconosciuto tutt'oggi, risale al 1999, frutto del lavoro di una commissione esperta in nutrizione e medicina per l'European Food Information Council (EUFIC): “*un alimento può essere*

considerato funzionale se dimostra in maniera soddisfacente di avere effetti positivi su una o più funzioni specifiche dell'organismo, che vadano oltre gli effetti nutrizionali normali, in modo tale che sia rilevante per il miglioramento dello stato di salute e di benessere e/o per la riduzione del rischio di malattia. Gli alimenti funzionali devono comunque restare "alimenti" e dimostrare la loro efficacia nelle quantità normalmente consumate nella dieta. Gli alimenti funzionali non sono pillole o pastiglie, ma prodotti che rientrano nelle normali abitudini alimentari". (EUFIC, 1999) In particolare, la produzione di prodotti che migliorano la qualità del metabolismo degli alimenti è uno degli ambiti di maggior interesse. Dagli scarti agricoli, ad esempio, è possibile produrre acque fermentate che possono essere impiegate nella panificazione dando vita a panificati con ricchissime caratteristiche organolettiche. Esistono però altri modi per impiegare le parti inutilizzate dei vegetali, uno di questi è la produzione di farine destinate al consumo umano ricche di acidi grassi, fibre e antiossidanti. Gli scarti dai residui agricoli possono essere utilizzati come substrato di fermentazione per la produzione di probiotici da microrganismi come i Lattobacilli.

3.3.2. Bioetanolo da scarti lignocellulosici

Le biomasse lignocellulosiche rappresentano una risorsa che può sostituire l'utilizzo di combustibili fossili (Manikandan *et al.*, 2021). Ad oggi le biomasse che meglio si prestano alla produzione di etanolo sono quelle ricche di amido e carboidrati, ma queste sono le stesse che possono trovare un utilizzo nell'alimentazione umana e animale. Pertanto, il focus della ricerca è stato spostato sulla trasformazione della biomassa lignocellulosica come paglia, foglie e altri rifiuti agricoli o forestali con enormi rese ogni anno (Boshoff *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2021). Poiché la fonte è abbondante, rinnovabile e non commestibile, la biomassa lignocellulosica è una delle potenziali materie prime per la produzione di bioetanolo (Xu *et al.*, 2021; Baeyens *et al.*, 2015).

La procedura convenzionale di produzione di bioetanolo lignocellulosico può essere suddivisa in quattro fasi e ciascuna fase è cruciale per l'efficienza finale e il costo della conversione. Il pretrattamento è il primo passo che mira a distruggere la struttura recalcitrante della biomassa lignocellulosica e ad aumentare la superficie della cellulosa, nonché a diminuire la cristallinità della cellulosa e il contenuto di lignina (Kim *et al.*, 2016).

Dopo il pretrattamento, la cellulosa viene trattenuta il più possibile mentre l'emicellulosa e la lignina vengono eliminate, il che aumenta la disponibilità di cellulosa e garantisce il regolare svolgimento delle fasi a valle (Huang *et al.*, 2019). L'idrolisi enzimatica e la fermentazione del lievito sono le due fasi

successive, possono essere condotte simultaneamente o separatamente per convertire la lignocellulosa pretrattata in zucchero fermentabile, quindi in bioetanolo. I lieviti impiegati durante la conversione degli zuccheri fermentescibili in bioetanolo possono essere svariati, la diversità delle specie di lievito è determinata dalla loro capacità di utilizzare diverse fonti di carbonio e dalla loro selettività nutrizionale (Phaff *et al.*, 1987). Alcuni ceppi di lievito come *Pichia stipitis* (NRRL-Y-7124), *S. cerevisiae* (RL-11) e *Kluyveromyces fragilis* (Kf1) sono stati segnalati come buoni produttori di etanolo da diversi tipi di zuccheri (Mussato *et al.*, 2012)

La distillazione è la fase finale della produzione di bioetanolo e lo scopo della distillazione è separare e purificare il bioetanolo dal brodo di fermentazione. Le fasi per la produzione di etanolo sono tutte caratterizzate da un consumo energetico elevato, ciò crea dei limiti nella loro applicazione in quanto i costi potrebbero essere troppo elevati. Fortunatamente possono essere applicate delle tecniche di riciclaggio per ridurre i costi di produzione. Il riciclaggio può avvenire nelle diverse fasi come mostrato nella figura 3; ad esempio, riciclare gli additivi ad alto costo, come gli enzimi, i microrganismi di fermentazione e le costose sostanze chimiche utilizzate nel pretrattamento o il riciclaggio delle acque reflue. Ad esempio, il liquido di scarto dopo il pretrattamento può essere riciclato per un nuovo lotto di pretrattamento.

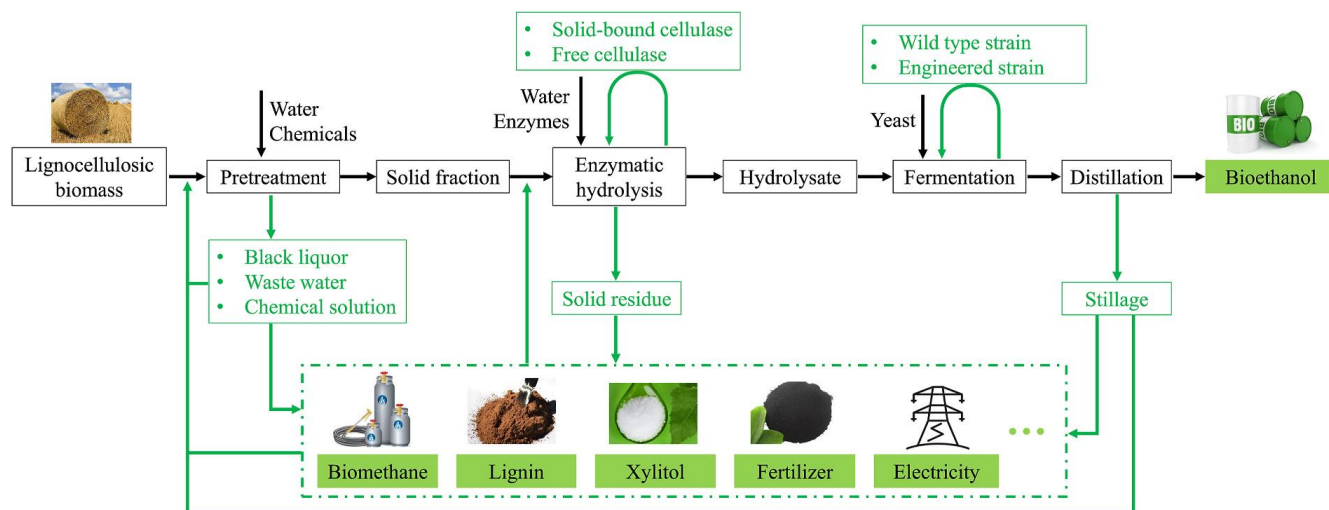


Figura 3: Processi di riciclo nelle fasi del processo di conversione delle biomasse lignocellulosiche in etanolo (Chen *et al.*, 2021).

4. Bibliografia

- Al Khawli, Fadila, Mirian Pateiro, Rubén Domínguez, José M. Lorenzo, Patricia Gullón, Katerina Kousoulaki, Emilia Ferrer, Houada Berrada, e Francisco J. Barba. 2019. «Innovative Green Technologies of Intensification for Valorization of Seafood and Their By-Products». *Marine Drugs* 17 (12): 689. <https://doi.org/10.3390/md17120689>
- Antonelli J, Lindino CA, de Azevedo JCR, de Souza SNM, Cremonez PA, Rossi E. ;2016. Biogas production by the anaerobic digestion of whey. *Rev Cienc Agric.*39(3):463–7. 10.19084/RCA15087
- Ashraf, Syed Amir, Mohd Adnan, Mitesh Patel, Arif Jamal Siddiqui, Manojkumar Sachidanandan, Mejdi Snoussi, e Sibte Hadi. 2020. «Fish-Based Bioactives as Potent Nutraceuticals: Exploring the Therapeutic Perspective of Sustainable Food from the Sea». *Marine Drugs* 18 (5): 265. <https://doi.org/10.3390/md18050265>.
- Aspevik, T.; Oterhals, Å.; Rønning, S.B.; Altintzoglou, T.; Wubshet, S.G.; Gildberg, A.; Afseth, N.K.; Whitaker, R.D.; Diana Lindberg, D. 2017. Valorization of proteins from co- and by-products from the fish and meat industry. In *Chemistry and Chemical Technologies in Waste Valorization*; Springer: Cham, Switzerland. pp. 123–150
- Baeyens J, Qian K, Appels L, Dewil R, Tan T.2015. Challenges and opportunities in improving the production of bioethanol. *Prog Energy Combust Sci.* 47:60–88.
- Blažić M, Zavadlav S, Kralj E, Šarić G. 2018. Production of whey protein as nutritional valuable foods. *Croat J Food Sci Technol.*10(2):255–60. 10.17508/CJFST.2018.10.2.09
- Bofei Fu, Shanshan Mei, Xianjie Su, Hongbin Chen, Junqiu Zhu, Zongping Zheng, Hetong Lin, Congjie Dai, Rafael Luque, Da-Peng Yang. 2021. Integrating waste

fish scale-derived gelatin and chitosan into edible nanocomposite film for perishable fruits. *International Journal of Biological Macromolecules*. 191, 1164-1174. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.171>.

- Boshoff S, Gottumukkala LD, van Rensburg E, Gorgens J. 2016. Paper sludge (PS) to bioethanol: evaluation of virgin and recycle mill sludge for low enzyme, highsolids fermentation. *Bioresour Technol*. 203:103–11.
- Brooks MS, Ramakrishnan VV. 2013. «Fish Processing Wastes as a Potential Source of Proteins, Amino Acids and Oils: A Critical Review». *Journal of Microbial & Biochemical Technology* 05.
- Çelik K, Önür ZY, 2016. *Whey every aspect*. Istanbul, Turkey: Tudás Alapítvány.
- Chen J, Wang X, Zhang B, Yang Y, Song Y, Zhang F. 2021. Integrating enzymatic hydrolysis into subcritical water pretreatment optimization for bioethanol production from wheat straw. *Sci Total Environ*. 770:145321
- Chen J., Zhang B., Luo L., Zhang F., Yi Y., Shan Y., Liu B., Zhou Y., Wang X., Lü X. 2021. A review on recycling techniques for bioethanol production from lignocellulosic biomass, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 149, 111370, ISSN 1364-0321, <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111370>
- Coral Medina J.D., Woiciechowski A.L., Filho A.Z., Brar S.K., Magalhães Júnior A.I., Soccol C.R. 2018. Energetic and economic analysis of ethanol, xylitol and lignin production using oil palm empty fruit bunches from a Brazilian factory *J. Clean Prod.*, 195. pp. 44-55.
- Crawford D.L. 1981. *Lignin biodegradation and transformation*. Wiley-Interscience, New York.
- Damian, C., 2018. Antioxidant activity of citrus peel and seeds extracts, in: *International Multidisciplinary Scientific GeoConference Surveying Geology and Mining Ecology Management, SGEM*. 10.5593/sgem2018/6.2/S25.003
- Díaz, A.I., Laca, A., Laca, A., Díaz, M., 2017. Treatment of supermarket vegetable wastes to be used as alternative substrates in bioprocesses. *Waste Manage.* 67, 59–66
- Dimopoulou M., Alba K., Campbell G., Kontogiorgos V. 2019. Pectin recovery and characterization from lemon juice waste streams *J. Sci. Food Agric*. 10.1002/jsfa.9891.
- EFSA CEF Panel (EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids), Lambré, C, Barat Baviera, JM, Bolognesi, C, Cocconcelli, PS, Crebelli, R, Gott, DM, Grob, K, Lampi, E, Mengelers, M, Mortensen, A, Rivière, G, Steffensen, I-L, Tlustos, C, Van Loveren, H, Vernis, L, Zorn, H, Glandorf, B, Herman, L, Aguilera, J, Andryszkiewicz, M, Kovalkovičová, N, Liu, Y and Chesson, A, 2021. Scientific Opinion on the safety evaluation of the food enzyme rennet paste from the abomasum of suckling goats, lambs and calves. *EFSA Journal* 2021; 19(12):7006, 11 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.7006>
- FAO, 2011. *Global Food Losses and Food Waste e Extent, Causes and Prevention*. Rome
- FAO/WHO food additives series 29: Specifications for the identity and purity of food additives and their toxicological evaluation: some flavouring substances and non-nutritive sweetening agents. Eleventh report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Geneva, Switzerland: World Health

Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations. (FAO/WHO); 1967.

- Ghaly AE, Ramakrishnan VV, Brooks MS, Budge SM, Dave D, 2013. Fish Processing Wastes as a Potential Source of Proteins, Aminoacids and Oils: A Critical Review. *J Microb Biochem Technol* 5: 107-129. doi:10.4172/1948-5948.1000110
- Gómez-Guillén, M.C., Giménez, B., López-Caballero, M.A., Montero, M.P., 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: a review. *Food Hydrocolloids* 25 (8), 1813e1827.
- Huang J, Zhu Y, Liu T, Sun S, Ren J, Wu A. 2019. A novel wet-mechanochemical pretreatment for the efficient enzymatic saccharification of lignocelluloses: small dosage dilute alkali assisted ball milling. *Energy Convers Manag.* 194:46–54.
- Idler C, Venus J, Kamm B. 2015. Microorganisms for the production of lactic acid and organic lactates. In: Kamm B, editor. *Microorganisms in biorefineries. Microbiology Monographs*, vol. 26. Berlin, Heidelberg: Springer. pp. 225–73. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45209-7_9.
- ISPRA. Rapporto rifiuti speciali 367/2022. ISBN: 978-88-448-1116-7.
- Jeong D., Ye S., Park H., Kim S.R. 2020. Simultaneous fermentation of galacturonic acid and five-carbon sugars by engineered *Saccharomyces cerevisiae* *Bioresour. Technol.*, 295.
- Jeong, D., Park, H., Jang, B.K., Ju, Y. Bin, Shin, M.H., Oh, E.J., Lee, E.J., Kim, S.R., 2021. Recent advances in the biological valorization of citrus peel waste into fuels and chemicals. *Bioresour. Technol.* 323, 124603. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124603>.
- Kim JS, Lee YY, Kim TH. 2016. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol.* 199:42–8.
- Korkina, L.; Kostyuk, V.; Potapovich, A.; Mayer, W.; Talib, N.; de Luca, C. 2018. Secondary plant metabolites for sun protective cosmetics: From pre-selection to product formulation. *Cosmetics*, 5, 32.
- Lafarga, T., Hayes, M., 2017. Bioactive protein hydrolysates in the functional food ingredient industry: overcoming current challenges. *Food Reviews International* 33 (3), 217e246.].
- Mahato N., Sharma K., Sinha M., Cho M. H. 2018. Citrus waste derived nutra-/pharmaceuticals for health benefits: Current trends and future perspectives *J. Funct. Foods*. 10.1016/j.jff.2017.11.015.
- Manikandan S., Subbaiya R., Biruntha M., Krishnan R.Y., Muthusamy G., Karmegam N.J.F. 2021. Recent development patterns, utilization and prospective of biofuel production *Emerg. nanotechnological Interv. Environ. Sustain. Rev.* 10.1016/j.fuel.2021.122757.
- Mullen, A.M., Álvarez, C., Pojic, M., Hadnadev, T.D., Papageorgiou, M., 2015. Classification and target compounds. In: Galanakis, C. (Ed.), *Food Waste Recovery*. Academic Press, pp. 25e57
- Mullen, A.M., Álvarez, C., Zeugolis, D.I., Henchion, M., O'Neill, E., Drummond, L., 2017. Alternative uses for coproducts: harnessing the potential of valuable compounds from meat processing chains. *Meat Science* 132, 90e98.

- Mussato S.I., Machado E.M.S., Carneiro L.M., Teixeira J.A. 2012. Sugar metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates, *Appl. Energy* 92, 763–768
- Negro, V., Ruggeri, B., Fino, D., Tonini, D., 2017. Life cycle assessment of orange peel waste management. *Resour. Conserv. Recycl.* 127, 148–158. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.08.014>.
- Panda, S.K., Mishra, S.S., Kayitesi, E., Ray, R.C., 2016. Microbial-processing of fruit and vegetable wastes for production of vital enzymes and organic acids: Biotechnology and scopes. *Environ. Res.* 146, 161–172.
- Papademas P, Kotsaki 2019.P. Technological utilization of whey towards sustainable exploitation. *J Adv Dairy Res.*7(4):231. 10.35248/2329-888X.19.7.231
- Phaff H.J., Starmer W.T..1987. Yeasts associated with plants, insects and soil, in: A.H. Rose, J.S. Harrison (Eds.), *The Yeasts Biology*, Academic Press, London, 1987, pp. 123–180.
- Pohan P, Bahcegul E., Oztop M.H., Hamamci H. 2018. Enzymatic hydrolysis of fruit peels and other lignocellulosic biomass as a source of sugar *Waste Biomass Valori.*, 9 (6) pp. 929-937.
- Rivas, Raul & Jones, Kim & Mills, Patrick.2013. A citrus waste-based biorefinery as a source of renewable energy: Technical advances and analysis of engineering challenges. *Waste management & research: the journal of the International Solid Wastes and Public Cleansing Association, ISWA.* 31. 10.1177/0734242X13479432.
- Roy, B.C., Omana, D.A., Betti, M., Bruce, H.L., 2017. Extraction and characterization of gelatin from bovine lung. *Food Science and Technology Research* 23 (2), 255e266.
- Sabater C., Blanco-Doval A., Montilla A., Corzo N. 2021. Optimisation of an enzymatic method to obtain modified artichoke pectin and pectic oligosaccharides using artificial neural network tools. In silico and in vitro assessment of the antioxidant activity. *Food Hydrocolloids*, 110
- Schieber, A., 2017. Side streams of plant food processing as a source of valuable compounds: Selected examples. *Annual review of food science and technology* 8, 97–112.
- Sharma K., Mahato N., Cho M.H., Lee Y.R. 2017 Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environmently friendly approaches *Nutrition.* 10.1016/j.nut.2016.09.006.
- Shweta Suri, Anupama Singh, Prabhat K. Nema. 2022 Current applications of citrus fruit processing waste: A scientific outlook, *Applied Food Research*, Volume 2, Issue 1, 2022, 100050, ISSN 2772-5022, <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100050>.
- Silva, T.; Moreira-Silva, J.; Marques, A.; Domingues, A.; Bayon, Y.; Reis, R.2014. Marine Origin Collagens and Its Potential Applications. *Marine Drugs*, 12 (12), 5881– 5901. <https://doi.org/10.3390/md12125881>.
- Stenmarck, Å., Jensen, C., Quested, T., Moates, G., 2016. Estimates of European Food Waste Levels. Stockholm.
- Wu, Y., Ma, H., Zheng, M., Wang, K., 2015. Lactic acid production from acidogenic fermentation of fruit and vegetable wastes. *Bioresour. Technol.* 191, 53–58.

- Xu YJ, Zhang M, Roozeboom K, Wang DH.2018. Integrated bioethanol production to boost low-concentrated cellulosic ethanol without sacrificing ethanol yield. *Bioresour Technol.* 250:299–305.
- Zema, D. A., Calabro, P. S., Folino, A., Tamburino, Vincenzo., Zappia, G., & Zimbone, S. M. 2018. Valorisation of citrus processing waste: A review. *Waste Management*, 80, 252–273. 10.1016/j.wasman.2018.09.024

5. Scopo della tesi

Secondo l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO), circa un terzo di tutti gli alimenti prodotti nel mondo va perso o sprecato in una qualche fase della filiera alimentare, fra il produttore e il consumatore. Nell'UE ciò corrisponde a circa 87,6 milioni di tonnellate di alimenti l'anno. In Italia, si stima una perdita di circa il 14% del cibo prodotto e uno spreco del 17% della produzione alimentare (11% nelle famiglie, 5% nei servizi di ristorazione e 2% nella vendita al dettaglio), due fattori che stanno contribuendo ad aumentare la fame nel mondo. Inoltre, la ricerca di energie sostenibili risulta essere di maggiore interesse soprattutto in periodi come questo, in cui il costo dei combustibili fossili rischia di mettere in ginocchio l'intera economia mondiale. L'obiettivo, pertanto, alla base del lavoro del mio Dottorato di ricerca è stato volto alla caratterizzazione e valorizzazione di scarti, animali e vegetali, e specie endemiche diffuse nel Mediterraneo con particolare attenzione a quelle siciliane, per lo sviluppo di prodotti dal valore aggiunto. Le tecniche analitiche impiegate sono state:

- Gas cromatografia con rivelatore a ionizzazione di fiamma (GC-FID) per la determinazione degli acidi grassi e la quantificazione dell'etanolo e dell'acido lattico prodotto dai substrati derivati dalle matrici oggetto di studio;
- Cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiata alla spettrometria di massa (HPLC-MS) per l'analisi quali-quantitativa dei polifenoli e degli zuccheri presenti nelle matrici;
- Spettrometria di massa con ionizzazione DART Direct Analysis Real Time per le analisi dei composti organici;
- Spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) per l'analisi del contenuto in minerali.

Le tecniche utilizzate per la valorizzazione degli scarti:

- Fermentazione per la produzione di etanolo e acido lattico
- Liofilizzazione per la produzione di estratti con attività antimicrobica

6. Parte sperimentale

Le matrici utilizzate per il progetto di dottorato sono state principalmente:

- Cladodi di *Opuntia ficus indica*, siciliani e tunisini, provenienti da scarti di potatura.
- Pastazzo e succo di agrumi.
- *Rhus coriaria* o sommacco.



6.1. Riciclaggio dei rifiuti di potatura di Opuntia-ficus indica: Recupero e Caratterizzazione delle Mucillagini da Cladodi

6.1.1. Introduzione

Il mercato globale degli idrocolloidi è cresciuto notevolmente negli ultimi anni, raggiungendo 7,9 miliardi di dollari nel 2019 con un valore previsto di 8,5 miliardi di dollari entro il 2022 (Market and Market, 2018). La mucillagine di *Opuntia ficus-indica* (OFI) è un polimero naturale prodotto nelle cellule della mucillagine del parenchima, all'interno dei tessuti di diversi organi (frutti e cladodi) con il ruolo principale di trattenere l'acqua. La mucillagine OFI è un eteropolisaccaride ad alto peso molecolare ($2,3 \times 10^4 - 3 \times 10^6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) costituito principalmente da sei zuccheri (arabinosio, galattosio, ramnosio, xilosio, acido uronico e acido galatturonico), proteine e biomolecole. Recentemente Salehi *et al.*, (2019) hanno descritto alcune applicazioni attuali dell'idrocolloide OFI nell'industria alimentare, come l'uso di mucillagini come rivestimento e film commestibile per prolungare la durata di conservazione dei prodotti agricoli. Altri studi hanno dimostrato il suo utilizzo come nuovo idrocolloide naturale in applicazioni industriali multiuso (Sáenz *et al.*, 1998; El-Samahy *et al.*, 2009; Sáenz *et al.*, 2004; Inglese *et al.*, 2017). Il nostro obiettivo principale era caratterizzare la qualità e le proprietà della

mucillagine OFI come sottoprodotto da utilizzare in applicazioni alimentari/cosmetiche/farmaceutiche.

6.1.2. Materiali e metodi

I cladodi di *Opuntia-ficus indica* sono stati raccolti nel febbraio 2019 presso l'azienda agricola, ad agricoltura biologica e specializzata, Bubbonia, L'azienda di circa 120 ettari si trova nel comune di Mazzarino (Sicilia). Dopo la raccolta, i cladodi sono stati lavati e igienizzati con acqua e Sanilyte®, un disinfettante a base di acido ipocloroso alla concentrazione finale di $95 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e un potenziale di riduzione dell'ossido (ORP) di +850 mV, attraverso una linea di lavaggio meccanica, per eliminare le impurità e ridurre la carica batterica. La concentrazione finale di cloro libero e l'ORP dell'acqua di lavaggio sono state misurate rispettivamente utilizzando il fotometro Hanna Instruments HI 83399 con il kit HI 93701-01 e il pHmetro Hanna Instruments HI 98121. Seguendo i limiti normativi stabiliti dalla Food and Drug Administration (FDA), le concentrazioni di cloro libero e ORP nell'acqua di lavaggio erano rispettivamente di $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a pH 6,5 e 830 mV. Dopo la fase di lavaggio, i cladodi sono stati lavorati nella linea di estrazione, dotata di un tritratore industriale con adattamenti specifici da parte di partner industriali. La linea di estrazione è stata precedentemente igienizzata spruzzando Sanilyte a $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ per evitare processi di contaminazione delle mucillagini. La mucillagine è stata ottenuta attraverso un processo

meccanico-fisico che permette l'estrusione della mucillagine dai cladodi e il suo stoccaggio in cisterne da 1000 litri. Cinque litri del campione sono stati imbottigliati e spediti tramite corriere al Laboratorio di Bioprodotti e Bioprocessi dell'ENEA (PROBIO) in Centro Casaccia (RM). Il campione è stato quindi aliquotato in provette Falcon da 50 mL e conservato a -20°C, mentre una parte è stata liofilizzata (LIO SPDGT 5PASCAL, 230 volt, 1ph, 50H2) fino a peso stabile.

6.1.2.1. Sostanze chimiche e reagenti

Tutti i prodotti chimici sono stati acquistati da R&M Chemicals (Essex, Regno Unito). 2,4,6-tris (2-piridil) -s-triazina (TPTZ) e 2,2-difenil-1-picrylidrazil (DPPH. 90%), albumina sierica bovina e trolox (6-idrossi-2,5 ,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico) sono stati acquistati dalla società Fluka (Svizzera). Tutti gli standard sono stati forniti da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

6.1.2.2. Analisi fisiche e chimiche

Il pH è stato determinato utilizzando Hanna Instruments-HI5000 e l'acidità libera è stata determinata mediante titolazione automatica con NaOH 0,5 N (pH Burette 24 CRISON). La densità è stata stimata con un picnometro di vetro. La viscosità dei campioni (soluzione al 10% in acqua) è stata misurata con un viscosimetro capillare in vetro Cannon-Fenske calibrato (Cannon Instrument Co., State College, PA, USA). È stato seguito il metodo dell'acido

fenolo-solforico per il contenuto totale di carboidrati, misurato a 480 nm (Monrroy *et al.*,2017). In breve, 100 mg di polvere di mucillagine di estratto e 5 mL di HC1 2,5 N sono stati miscelati in una provetta e posti a bagnomaria a 95°C per 3 ore. La soluzione è stata neutralizzata con carbonato di sodio, diluita con 5 mL di acqua e centrifugata. Il surnatante è stato portato ad un volume di 100 ml. Quindi, una porzione del campione (0,1 mL) è stata aggiunta a 1 mL di fenolo al 5% e 5 mL di acido solforico concentrato e posta in un bagno d'acqua a 30°C per 20 minuti. Infine, il contenuto totale di carboidrati è stato determinato mediante spettrofotometro UV Vis a una lunghezza d'onda di 480 nm e quantificato rispetto a una curva di calibrazione utilizzando lo xilosio come standard. Gli acidi uronici totali sono stati determinati seguendo il metodo descritto da Bacchetta *et al.* (2019). Il metodo Lowry (1951) con lievi modifiche è stato utilizzato per determinare le proteine totali. Il contenuto totale di polifenoli è stato determinato utilizzando il metodo Folin-Ciocalteu (Proestos *et al.*, 2013). Un'aliquota di 250 µl dell'estratto (40 mg in 1 ml di metanolo 80%) è stata miscelata con 250 µl di reattivo Folin-Ciocalteu, precedentemente diluito con acqua bidistillata (1:10). La miscela è stata lasciata a riposo per 7 minuti; quindi, alla miscela sono stati aggiunti 500 µL di carbonato di sodio (20% p/v). Infine, la miscela è stata lasciata riposare al buio per circa 40 minuti e l'assorbanza (Abs) è stata misurata a 725 nm contro una soluzione in bianco (250 µL di acqua + reagente) utilizzando uno

spettrofotometro UV/Visibile. Tutte le misurazioni sono state eseguite in triplicato e i risultati sono stati espressi come milligrammi di acido gallico equivalente per grammo di peso secco (mg GAE g dw⁻¹). La capacità antiossidante è stata determinata mediante il metodo DPPH: 100 µL di campione sono stati aggiunti a 2,9 mL di soluzione DPPH 0,06 mM. I campioni triplicati sono stati agitati in un vortice e tenuti al buio per 60 minuti, prima di leggere l'assorbanza a 517 nm. I risultati sono stati espressi come milligrammi di Trolox equivalente per grammo di peso secco (µmoli TE g dw⁻¹). La percentuale di inibizione è stata ottenuta per interpolazione di una curva di calibrazione (Abs vs µM Trolox). Per massa secca si intende la massa di residuo presente dopo l'essiccamento in stufa a 105°C fino a quando la massa rimane invariata (24 h) mentre la % di ceneri è stata determinata mediante incenerimento a secco in una muffola Heraeus a 550°C per 8 h. La determinazione del contenuto relativo di Ca, K, P, Mg e S è stata eseguita in una scansione al microscopio (SEM) (JEOL, Giappone; modello JSM6390LV/LGS; software INCA® Suite 4.08) dotata di una sonda elettronica a dispersione di energia X-sistema a raggi (EDX) (LK-IE250 Oxford INCA Energy 250) per microanalisi qualitativa e quantitativa. In breve, sono stati pesati 2,5 mg di estratto di mucillagine liofilizzato; la polvere è stata accuratamente montata su un moncone di metallo utilizzando del nastro di carbonio biadesivo prima dell'analisi mediante SEM-EDX. Il tempo di scansione EDX è stato impostato su 70 secondi,

la superficie di scansione copriva un'area di 3,01 mm × 2,32 mm e l'energia di scansione era di circa 20 Kv.

6.1.2.3. Analisi DART-MS

Gli zuccheri neutri puri (saccarosio, glucosio, galattosio, mannosio, arabinosio, xilosio e ramnosio), gli acidi uronici (galaturonico e glucoronico), gli antiossidanti polifenolici (acido p-cumarico, isorhamnetina, isoquercetina e iperoside), gli aminoacidi e l'idrocolloide naturale OFI sono stati analizzati come solidi. Per ogni campione, un tubo capillare è stato immerso negli standard e/o nella mucillagine liofilizzata e quindi il tubo capillare è stato posizionato tra il flusso di elio della sorgente ionica DART e l'interfaccia del vuoto per ottenere spettri di massa (MS). Ogni campione è stato rilevato almeno da tre a cinque volte per 1 min. L'analisi di massa è stata eseguita su uno spettrometro AccuTOF LC-PLUS JMS-T100LP (JEOL, Tokyo, Giappone) con una sorgente ionica DART SVP100, (Ionsense, Saugus, MA, USA). La sorgente di ioni DART è stata utilizzata con elio per l'analisi e azoto per la modalità standard, la temperatura del gas era di 300 °C, la pressione di ingresso era di 0,55 MPa e la tensione era di ±600 V è stata utilizzata per la modalità di ioni negativi. L'acquisizione degli spettri di massa è stata registrata con il software Mass Center System versione 1.5.0k un range di massa di m/z 50 - 1000 Da in modalità negativa.

6.1.2.4. Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state utilizzate per confrontare i risultati ottenuti nei replicati e i dati sono stati espressi come media \pm deviazione standard (DS). Tutte le analisi sono state eseguite dal software SPSS. Utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA), le differenze tra le medie sono state determinate per la significatività a $P < 0,05$. La microanalisi EDX è stata valutata mediante analisi della varianza unidirezionale (Sigma Plot ver. 12.0, Software). Tutti i test sono stati eseguiti in triplicato.

6.1.3. Risultati e discussioni

I cladodi come materia prima sono regolarmente consumati come ortaggi o foraggi (rispettivamente il 16% o il 22% delle terre produttive) in Messico, mentre negli Stati Uniti e in Canada è stata documentata una crescente domanda di consumo (Bacchetta et al., 2019). In altri paesi come l'Italia, il riutilizzo e il riciclaggio degli assorbenti possono essere considerati una diversificazione del reddito per gli agricoltori. La potatura nei frutteti specializzati italiani, compresa la “scozzolatura” per l'induzione di produzioni frutticole aggiuntive, mettono a disposizione cladodi o frutti immaturi, che possono essere materia prima preziosa per bioprodotto di alto valore. *Opuntia ficus-indica* colloide naturale può essere ottenuto dalla matrice (cladodi o bucce di frutta), mediante macerazione in acqua (Bacchetta *et al.*, 2019) o utilizzando diversi solventi (Sáenz *et al.*, 2004), tuttavia si possono

adottare altre tecniche come la pressatura meccanica o la macinazione (Sepúlveda *et al.*, 2007). In generale, le rese di estrazione sono basse ($\leq 2\%$) in peso fresco e vicine al 19% in peso secco (Salehi *et al.*, 2019). Nel nostro lavoro, il processo di lavorazione, che si basa su un metodo meccanico, aumenta notevolmente l'efficienza nell'estrazione delle mucillagini OFI, con una resa di oltre il 30% in peso secco. Inoltre, la capacità di lavoro effettiva dei processi di estrazione meccanica era di 0,5 - 0,6 ton/h. Monrroy *et al.* (2017) hanno riportato una resa di circa il $24\% \pm 1\%$ da cladodi freschi di *Opuntia cochenillifera* trattati con processo termico (80°C e 44°C). Tuttavia, l'alta temperatura influisce sulle proprietà dell'idrocolloide come le prestazioni reologiche, come riportato da diversi autori (Bacchetta *et al.*, 2019). Pertanto, un'estrazione meccanica che lavora a bassa temperatura offre alcuni vantaggi, tra cui la riduzione dei tempi di lavorazione e dei consumi energetici, inoltre questo processo evita l'utilizzo di solventi dannosi e costosi e aumenta le rese di estrazione.

6.1.3.1. Caratterizzazione fisica dell'idrocolloide

La tabella 1 riporta le proprietà fisiche della mucillagine OFI estratta dai cladodi. Come previsto, il pH era subacido ($4,50 \pm 0,30$), come conseguenza del ritmo diurno e stagionale basato sulla CAM che caratterizza questa specie. Il valore di pH riscontrato nei nostri campioni era inferiore a quello riportato da Gebresamuel *et*

al. (2012) per *O. ficus-indica* (5,5 - 6), ma paragonabile a quelli riportati per la gomma arabica (4,5 - 5,6), che è il tipo di gomma più utilizzato negli alimenti e in altre applicazioni industriali (Daoub *et al.*, 2016). Allo stesso modo l'acidità libera della mucillagine siciliana è stata trovata $1,40 \pm 0,20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ equivalente di acido tartarico. Tuttavia, questi parametri possono variare in base ai diversi tempi di raccolta con l'acidità più alta nei cladodi raccolti durante l'inverno rispetto ai cactus raccolti durante la primavera. Questa differenza può essere spiegata dalla ridotta esposizione alla luce del giorno durante l'inverno, ma sembra anche essere dipendente dal genotipo (Stintzing *et al.*, 2001). Tra le proprietà fisiche, la viscosità è uno dei parametri di qualità desiderati degli eccipienti per applicazioni sia in formulazioni alimentari che farmaceutiche, in particolare per preparazioni liquide. La viscosità è stata trovata $4,84 \pm 0,20 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ in una soluzione al 10% in acqua; risultati simili sono stati riportati per una soluzione al 4% di gomma arabica. La densità dei campioni sperimentali è stata stimata $1,01 \pm 0,01 \text{ (g}\cdot\text{cm}^{-3})$, in accordo con altri autori (Gebresamuel *et al.*, 2012).

Parametri	Risultati
Colore	Giallo senza clorofilla
pH	4.50 ± 0.30
Acidità libera (g·L ⁻¹ eq. acido tartarico)	1.40 ± 0.20
Viscosità mPa s	4.84 ± 0.20
Densità (g·cm ⁻³)	1.01 ± 0.01

Tabella 1: Colore, pH, acidità libera, viscosità e densità della mucillagine di *Opuntia ficus-indica*. I dati sono riportati come media ± deviazione standard (n = 3).

6.1.3.2. Composizione chimica

I carboidrati sono i componenti più tipici della mucillagine naturale di *Opuntia ficus-indica* in un intervallo compreso tra il 13% e il 64% (Gebresamuel *et al.*, 2012). Abbiamo trovato un valore del 53% di carboidrati totali (Tabella 2). Elnaz Salehi *et al.*, (2019) hanno suggerito una quantità approssimativa del 90% di carboidrati totali con una composizione strutturale di zucchero in arabinosio, ramnosio, xilosio e galattosio (in rapporti di 1,0:1,7:2,5:4,1) (Matsuhira *et al.*, 2006). A causa dell'elevata quantità di galattosio e xilosio, il polisaccaride ramnogalatturonano è classificato nella classe della gomma di galattossilano (Salehi *et al.*, 2019). L'ampia gamma nella determinazione dei carboidrati è probabilmente dovuta ai diversi metodi di estrazione, in particolare alla bassa efficienza e precisione della fase di idrolisi che potrebbero influenzare negativamente i risultati finali. Tuttavia, i tipi e il contenuto di carboidrati possono variare con la stagione e l'età dei cladodi; Ribeiro *et al.* (2010) hanno trovato campioni raccolti in estate

caratterizzati da un maggior contenuto di carboidrati in particolare glucosio, fruttosio, galattosio, xilosio e arabinosio, con il cladode terziario (vecchio cladode) caratterizzato da un doppio contenuto di zuccheri rispetto ai cladodi quaternari (giovani cladodi). Tra i componenti polisaccaridi più reattivi, gli acidi uronici sono in grado di determinare alcune importanti caratteristiche delle mucillagini come la viscosità, la capacità di incorporare acqua nei tessuti, la chelazione degli ioni Ca_{2+} nonché le condizioni di pH. La loro quantità in polimeri naturali è comunemente considerata una misura della loro natura polielettrolitica, essendo un fattore critico nei processi di coagulazione/flocculazione. Il contenuto di acidi uronici determinato spettrofotometricamente nei campioni siciliani è risultato pari a $2,1 \pm 0,6 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ con una quantità inferiore a quella riportata da altri autori (Goycoolea *et al.*, 2003; Madjdoub *et al.*, 2001). Forse il processo di decarbossilazione durante l'idrolisi potrebbe aver influito negativamente su questa determinazione analitica; d'altra parte, il processo meccanico potrebbe non essere così efficiente per estrarre i componenti della pectina dal tessuto di clenchima verde dei cuscinetti. In accordo con gli autori precedenti (Salehi *et al.*, 2019; Espino-Díaz *et al.*, 2010), abbiamo trovato il valore medio del contenuto proteico totale $24,54 \pm 15,00 \text{ mg di ABS g}^{-1}\text{dw}$. Il contenuto proteico è un altro fattore importante per determinare le proprietà funzionali delle mucillagini. Le interazioni che avvengono tra proteine e specifici gruppi funzionali idrofili di polisaccaridi possono infatti

influenzare la capacità filmogena, emulsionante e stabilizzante, nonché le proprietà schiumogene. Lecaros *et al.* (1997) ha trovato principalmente glutammina, leucina e lisina come componenti principali delle proteine. La tabella 2 riporta anche il contenuto totale di polifenoli e l'attività antiossidante dei campioni di mucillagine. Nel complesso, i risultati attuali hanno mostrato che OFI è una specie di preziosa fonte di molecole antiossidanti con proprietà che promuovono la salute (Inglese *et al.*, 2017; Rocchetti *et al.*, 2018). Recentemente Boutakiout *et al.* (2018) hanno analizzato il succo dei cladodi centrifugati e hanno confermato il contenuto totale di polifenoli come fattore dipendente dalla stagione, in ogni caso hanno documentato una quantità in molecole antiossidanti superiore a quelle riportate per mela ($296,3 \pm 6,4 \mu\text{g GAE}$), banana ($90,4 \pm 3,2 \mu\text{g GAE}$), ananas ($94,3 \pm 1,5 \mu\text{g GAE}$) o fragola ($160,0 \pm 1,2 \mu\text{g GAE}$). Il contenuto totale di polifenoli è fortemente correlato alla capacità antiossidante contro i radicali liberi. Nel presente studio il contenuto totale di polifenoli è stato trovato di circa $19,40 \pm 0,02 \text{ mg GAE g}^{-1}$ di peso secco e la capacità antiossidante di $22,5 \pm 0,5 \mu\text{mol TE g}^{-1}$. Rocchetti *et al.* (2018) hanno riscontrato un valore del contenuto totale di polifenoli intorno a 2600 mg GAE/kg di peso fresco nei cladodi di pera cactus di San Cono (Italia), che era paragonabile a quello di altri autori; gli stessi campioni possedevano valori GAE di 1040 mg/kg di peso fresco considerando lo *scavenging* dei radicali DPPH. Pertanto, i composti antiossidanti principalmente legati nei

globuli verdi esterni dei cuscinetti (clorenchima) (Bensadòn *et al.*, 2010), sono inferiori nella mucillagine che appartiene dalla parte interna (cellule mucillaginose del parenchima); questo è il motivo per cui i metodi di estrazione, o l'uso dell'estrazione assistita (Bacchetta *et al.*, 2019), possono contribuire attivamente a migliorare la qualità del sottoprodotto. La materia organica totale, ceneri e sedimenti (massa secca), erano rispettivamente $3,30\% \pm 0,20\%$ fw e $29,30\% \pm 4,00\%$ fw. Questo valore è considerevolmente alto rispetto a quelli riportati per gomme commerciali come la gomma di semi di locus (0,7% - 1,5%), la gomma di xantano (1,5%) e la gomma di acacia (1,2%) (Salehi *et al.*, 2019), con interessanti implicazioni sull'*Opuntia* come fonte importante di nutrienti minerali che potrebbero essere riciclati e riutilizzati (Do Nascimento *et al.*, 2016).

In questo lavoro, la composizione minerale della polvere di mucillagine OFI è stata determinata utilizzando la spettroscopia a raggi X a dispersione di energia, come riportato nella Tabella 3. L'alto contenuto di carbonio e ossigeno indica una composizione principalmente organica dei campioni.

In percentuale, il calcio (Ca, $4,85\% \pm 0,13\%$) era il minerale più abbondante nelle mucillagini, seguito dal potassio (K, $3,84\% \pm 1,22\%$). Questi risultati sono in accordo con quelli riportati per le comuni gomme commerciali e con quelli riportati per la mucillagine liofilizzata di *Opuntia* spp (Dick *et al.*, 2019) o la farina di cladodi (Dick *et al.*, 2020) Si trovano anche

macrominerali di magnesio, fosforo e zolfo, anche se in quantità minore (Tabella 3).

Composizione chimica	Risultati
Carboidrati totali (mg eq xilosio g ⁻¹ dw)	532.06 ± 0.33
Acidi uronici totali (mg acidi uronici g ⁻¹ dw)	2.1 ± 0.6
Proteine totali (mg eq ABS g ⁻¹ dw)	24.54 ± 15.00
Polifenoli totali (mg GAE g ⁻¹ dw)	19.40 ± 0.02
Capacità antiossidante (µmol TE g ⁻¹ dw)	22.5 ± 0.5
Massa secca (% fw)	3.30 ± 0.20
Cenere (% dw)	29.30 ± 4.00

Tabella 2: Caratterizzazione chimica dell'idrocolloide di *Opuntia ficus-indica*. I dati sono riportati come media ± deviazione standard (n = 3).

Elementi (%)	Risultati
Carbonio	39.4 ± 1.6
Ossigeno	48.46 ± 3.10
Calcio	4.85 ± 0.13
Potassio	3.84 ± 1.22
Magnesio	0.88 ± 0.05
Zolfo	0.27 ± 0.03
Fosforo	0.22 ± 0.03

Tabella 3: Microanalisi minerale mediante spettroscopia a raggi X a dispersione di energia. I dati sono riportati come media ± deviazione standard (n = 3).

6.1.3.3. Identificazione dei composti organici mediante DART-MS

L'analisi diretta in tempo reale (DART) consente la valutazione rapida (da 10 a 15 secondi) di campioni o oggetti nel loro stato nativo in ambiente aperto. Campioni o grandi molecole possono scomporsi in piccoli frammenti caratteristici nella sorgente

DART tramite pirolisi e i prodotti vengono quindi rilevati mediante spettrometria di massa (MS) ad alta risoluzione (Hajslova *et al.* 2011). Qui abbiamo applicato DART-AccuTOF LC-PLUS per studiare diversi tipi di monosaccaridi e altre molecole naturali nella mucillagine di *Opuntia* liofilizzata senza pretrattamento del campione. Gli ioni molecolari (addotti) degli standard sono presentati nella Tabella 4. Lo spettro di massa DART della mucillagine OFI a 300°C in modalità ionica negativa è mostrato nella Tabella 5 e nella Figura 1. L'addotto di arabinosio o xilosio, a causa della perdita di una molecola d'acqua, $[M-H_2O]^-$ – ione con m/z 132, era lo ione molecolare più abbondante e l'addotto esoso deprotonato, $[M-H]^-$ – ione con m/z 179 era lo ione più debole nello spettro del dardo in modalità negativa. Altri ioni molecolari ad alta intensità erano m/z 214 e m/z 215, che corrispondono all'addotto esoso $[M-H + Cl]^-$ e $[M + Cl]^-$ che si formano legando uno ione cloro agli esosi come menzionato da Gross *et al.*, (2014). Altri addotti monosaccaridici presenti nello spettro DART-MS sono gli ioni molecolari m/z 114 e m/z 89. Questi ioni molecolari corrispondono all'addotto monosaccaridico di peso molecolare 150 (arabinosio e xilosio) che perdono due molecole d'acqua $[M-2H_2O]^-$, così come l'addotto deprotonato di esosi senza cinque molecole di H₂O $[M-H-5H_2O]$, rispettivamente. In MS-DART, i polisaccaridi subiscono una decomposizione termica durante la ionizzazione ambientale, generando impronte o

profili caratteristici, costituiti da frammenti più piccoli (Ma *et al.*, 2018). Molte impronte digitali corrispondenti a mono e oligosaccaridi sono state riportate per standard ed estratti di ginseng (Wang *et al.*, 2014), estratti di erbe della medicina tradizionale cinese (Yang *et al.*, 2017) e glicosidi di piante con attività di importanza biologica (Ma *et al.*, 2018). Questi profili o impronte digitali di saccaridi sono stati acquisiti in modalità ionica negativa e positiva in DART. L'analisi in modalità positiva consente di identificare facilmente i monosaccaridi come addotti di ammonio (NH_4^+) negli spettri DART (Wang *et al.*, 2014); tuttavia, queste molecole ammoniacali (addotti) sono deboli o assenti negli estratti vegetali ricchi di oligosaccaridi. Al contrario, gli ioni monosaccaridi o oligosaccaridi (deprotonazione) e gli ioni molecolari (ioni radicali) sono stati facilmente rilevati negli spettri di massa DART negativi (Wang *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2017); come l'impronta digitale del monosaccaride del nostro idrocolloide naturale (Figura 1) (Huang *et al.*, 2019; Zeng *et al.*, 2012).

Standard sample	Adduct ion	m/z value
Disaccharides		
Sucrose [Glu+Fruc-H ₂ O]	[Hex-H-5H ₂ O]	89
MW: 342	[Hex-H-H ₂ O]	161
	[Hex-H]	179*
Sucrose = M	[M-H]	341
Glu or Fruc = Hex	[2Hex-H]	359
	[3Hex-H-H ₂ O]	521
Monosaccharides		
Glucose, mannose, galactose	[M-H-5H ₂ O]	89
MW: 180	[M-H-H ₂ O]	161
	[M-H]	179
	[M+Cl]	215
	[2M-H]	359*
	[3M-H]	539
Rhamnose	[M-H]	163
MW: 164	[2M-H-CH ₃ -CHO-CH ₂ O]	353*
	[2M-H]	327
Xylose, arabinose	[M-H]	149
MW: 150	[2M-H]	399*
	[3M-H]	449
Uronic acids		
Galacturonic, glucuronic	[M-H-H ₂ O]	175
MW: 194	[M-H]	193
	[2M-H]	387*
Amino acids		
Glutamic acid	[M-H-H ₂ O]	128
MW: 147	[M-H]	146*
	[2M-H-H ₂ O-NH ₃] or [2M-H-2H ₂ O]	357
	[2M-H-H ₂ O]	275
	[2M-H]	293
Polyphenolic antioxidants		
p-coumaric acid	[M-H]	163*
MW: 164	[2M-H]	327
Isorhamnetin	[M-3H]	313
MW: 316	[M-2H]	314
	[M-H]	315*
	[2M-H]	631
Isoquercetin ISOQ	[Glu-H-H ₂ O]	161
ISOQ = M	[Q-H]	301*
Quercetin + glucose - H ₂ O	[Q-H+O]	317
[Q+Glu-H ₂ O]	[M-2H-OH]	445
MW: 464	[M-3H]	461
	[2Q-H]	603
	[2Q-H-O]	619
Hyperoside Hyp	[Gal-H-H ₂ O]	161
Hyp = M	[Gal-H]	179
Quercetin + galactose - H ₂ O	[Q-H]	301*
[Q+Gal-H ₂ O]	[M-3H+O]	477
MW: 464	[2Q-H]	603

* Most abundant ion.

Tabella 4: Elenco dei monomeri negativi osservati e degli ioni cluster rilevati negli standard analizzati in modalità negativa da DART-MS.

Identification	[M-H]	[M-H + Cl]	[M-H ₂ O]	[M-2H ₂ O]	[M-5H ₂ O]
Six-carbon	179.0099	214.9824*			89.0010
Five-carbon			132.9862*	114.9734	

*Most abundant ion

Tabella 5: Frammenti principali per monosaccaridi generati nell'estratto di mucillagine OFI (liofilizzato) da DART-MS e formule chimiche proposte.

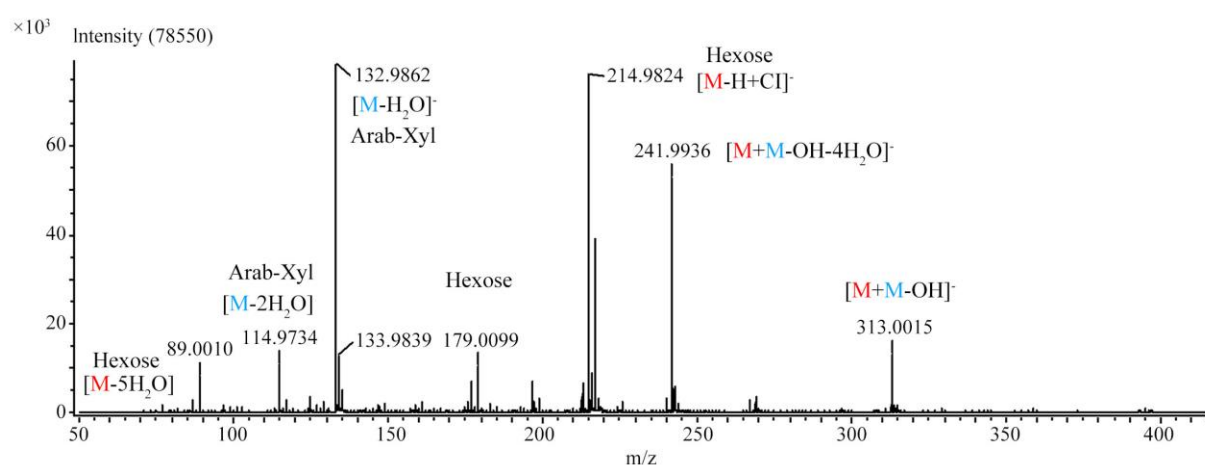


Figura 1: Spettri di massa DART dell'estratto di mucillagine di *Opuntia ficus-indica* con una temperatura del gas argon riscaldato di 300 °C in modalità di ioni negativi. I principali ioni molecolari per i monosaccaridi a cinque atomi di carbonio (M in blu) e sei di carbonio (M in rosso) sono rappresentati come addotti $[M-nH_2O]^-$, $[M-H]^-$, $[M-OH]^-$, $[M-H + Cl]^-$ o $[M + Cl]^-$. Il rapporto massa/carica (m/z) di ciascun anione è rappresentato dal valore dei picchi.

6.1.4. Mucillagine: potenziali applicazioni industriali

La mucillagine di cactus è un interessante biopolimero funzionale che può essere utilizzato nell'industria alimentare, cosmetica e farmaceutica grazie alle sue caratteristiche fisiche e funzionali, quali: viscoelasticità (rivestimento edibile), capacità di formare una rete molecolare (trattengono l'acqua), capacità di formare film (filtrazione), ecc. Nella tabella 6 è riportato un elenco di possibili applicazioni industriali dell'idrocolloide, che ne evidenzia la multifunzionalità. Oltre agli usi discussi nelle industrie cosmetiche/farmaceutiche/alimentari, possono essere esplorate altre filiere produttive. Ad esempio, nell'ambito del Programma di cooperazione bilaterale tra Italia e Messico, ENEA e Collegio di Michoacán, Colmich ha studiato l'applicazione della mucillagine come consolidante di vernici a strati sottili e additivi organici per migliorare le proprietà delle biomalte per il restauro dei beni culturali. I risultati incoraggianti suggeriscono sue possibili applicazioni anche in questo settore economico di nicchia (Persia *et al.*, 2016). Tra le ricerche in corso le plastiche biodegradabili e compostabili. Pertanto, una sfida tecnologica futura è la capacità di ottimizzare le tecniche di estrazione e purificazione, l'essiccazione e altre condizioni di lavorazione per ottenere bioprodotto di diverse applicazioni.

Settore industriale	Applicazione	Riferimento
	pellicola edibile per aumentare la shelf-life di frutta e vegetali/film edibile.	
Cibo	agente incapsulante per preservare i composti bioattivi, colorante naturale (tecnica di spray-drying). addensante, stabilizzante, gelificante. Ingrediente gluten-free	
Trattamento delle acque reflue	Flocculante per rimuovere la contaminazione batterica, membrane utilizzate per la rimozione di diversi metalli pesanti (spin nano- o microfibre)	
Industria cosmetica e farmaceutica	effetto gastroprotettivo, idratante, cicatrizzante, antiossidante eccipiente farmaceutico: agente gelificante per la somministrazione di farmaci a rilascio prolungato	
Beni culturali/edilizia	Consolidante per vernici a strati sottili e additivi organici per migliorare le proprietà delle biomalte	
Agricoltura	Ammendante del suolo	

Tabella 6: Applicazioni industriali della mucillagine di *Opuntia-ficus indica*.

6.1.5. Bibliografia

- Adjeroud, N., Elabbas, S., Merzouk, B. 2018 Effect of *Opuntia ficus -indica* Mucilage on Copper Removal from Water by Electrocoagulation-Electroflotation Technique. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 811, 26-36. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.12.081>
- Asha, S., Tabitha, C., Himabindu, N. and Kumar, R.B. 2014 Efficiency of *Opuntia ficus -indica* (L) Mill. in Removal of Chromium from Synthetic Solution. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5, 1244-1251.
- Bacchetta, L., Maccioni, O., Martina, V., Bojorquez-Quintal, E., Persia, F., Procacci, S. and Zaza, F. 2019. Quality by Design Approach to Optimize *Cladodes Soluble Fiber Processing Extraction in Opuntia ficus-indica* (L.) Miller. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 3627-3634. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03794-7>
- Bensadòn, S., Hervet-Hernández, D., Sàyo-Ayerdi, S. and Goni, I. 2010 By-Products of *Opuntia ficus -indica* as Sources of Antioxidant Dietary Fiber. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65, 210-216. <https://doi.org/10.1007/s11130-010-0176-2>
- Boutakiout, A., Elothmani, D., Hanine, H., Mostafa, M., Le Meurlay, D. and Hmid, I. 2018 Effects of Different Harvesting Seasons on Antioxidant Activity and Phenolic Content of Prickly Pear *Cladode Juice*. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17, 471-480. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2016.11.005>
- Chowdhury, M., Sengupta, A., Datta, L. and Chatterjee, S. 2017 Role of Mucilage as Pharmaceutical Additives and Cytoprotective Agent. *Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Sciences*, 4, 46-52.
- Ciriminna, R., Chavarria-Hernandez, N., Rodriguez Hernandez, A.I. and Pagliaro, M. 2018 Toward Unfolding Bioeconomy of Nopal (*Opuntia* spp.). <https://doi.org/10.31226/osf.io/c89h3>
- Cork 2.0 Declaration 2016—A Better Life in Rural Areas. Publications Office of the European Union, Luxembourg.
- Daoub, R.M.A., Elmubarak, A.H., Misran, M., Hassan, E.A. and Osmá, M.E. 2016 Characterization and Functional Properties of Some Natural Acacia Gums. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17, 241-249. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2016.05.002>
- De Oliveira Ribeiro, E.M., Da Silva, N.H., De Lima Filho, J.L., De Brito, J.Z. and Da Paz Carvalho da Silva, M. 2010 Study of Carbohydrates Present in the *Cladodes of Opuntia ficus -indica* (Fodder Palm), According to Age and Season. *Food Science and Technology*, 30, 933-939. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000400015>
- Del Valle, V., Hernandez-Munoz, P., Guarda, A. and Galotto, M. 2005 Development of a Cactus-Mucilage Edible Coating (*Opuntia ficus -indica*) and Its Application to Extend Strawberry (*Fragaria ananassa*) Shelf-Life. *Food Chemistry*, 91, 751-756. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.07.002>

- Dick, M., Limberger, C., Silveira Thys, R.C., De Oliveira Rios, A. and Hickmann Flôres, S. 2020 Mucilage and Cladode Flour from Cactus (*Opuntia monacantha*) as Alternative Ingredients in Gluten-Free Crackers. *Food Chemistry*, 314, Article ID: 126178. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126178>
- Dick, M., Magro, L.D., Rodrigues, R.C., De Oliveira Rios, A. and Hickmann Flôres, S. 2019 Valorization of *Opuntia monacantha* (Willd.) Haw. Cladodes to Obtain a Mucilage with Hydrocolloid Features: Physicochemical and Functional Performance. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 900-909. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.126>
- Do Nascimento, T., Damilano, E., Gomes, A., Bezerra, F.C., Rodrigues, R.F., Cordeiro, D., et al. 2016 Potential for Biofuels from the Biomass of Prickly Pear Cladodes: Challenges for Bioethanol and Biogas Production in Dry Areas. *Biomass Bioenergy*, 85, 215-222. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.12.005>
- El-Samahy, S.K., Youssef, K.M. and Moussa-Ayoub, T.E. 2009 Producing Ice Cream with Concentrated Cactus Pear Pulp: A Preliminary Study. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 11, 1-12.
- Espino-Díaz, M., De Jesús Ornelas-Paz, J., Martínez-Téllez, M.A., et al. 2010 Development and Characterization of Edible Films Based on Mucilage of *Opuntia ficus -indica* (L.). *Journal of Food Science*, 75, 347-352. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01661.x>
- Gebresamuel, N. and Gebre-Mariam, T. 2012 Comparative Physicochemical Characterization of the Mucilages of Two Cactus Pears (*Opuntia* spp.) Obtained from Mekelle, Northern Ethiopia. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 3, 79-86. <https://doi.org/10.4236/jbnb.2012.31010>
- Ginestra, G., Parker, M.L., Bennett, R.N., Robertson, J., Mandalari, G., Narbad, A., et al. 2009 Anatomical, Chemical, and Biochemical Characterization of Cladodes from Prickly Pear (*Opuntia ficus -indica* (L.) Mill.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10323-10330. <https://doi.org/10.1021/jf9022096>
- Gonzalez Sandoval, D.C., Luna Sosa, B., Guadalupe Martinez-Avila, G.C., Rodriguez Fuentes, H., Avendano Abarca, V.H. and Rojas, R. 2019 Formulation and Characterization of Edible Films Based on Organic Mucilage from Mexican *Opuntia ficus-indica*. *Coatings*, 9, 506. <https://doi.org/10.3390/coatings9080506>
- Goycoolea, F.M. and Cardenas, A. 2003 Pectins from *Opuntia* spp.: A Short Review. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 5, 17-29.
- Gross, J.H. 2014 Direct Analysis in Real Time—A Critical Review on DART-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, 63-80. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7316-0>
- Gutierrez, M.C., Utrilla-Coello, R.G. and Soto-Castro, D. 2018 Effect of *Opuntia ficus -indica* Mucilage in the Ecological Extraction, Drying, and Storage of Eggplant Anthocyanins. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42, 1343-1349. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13439>
- Hajslova, J., et al. 2011 Challenging Applications Offered by Direct Analysis in Real Time (DART) in Food-Quality and Safety Analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 30, 204-218. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.11.001>

- Honarmand, E., Mostaanazadeh, H., Motaghedifard, M., Hadi, M. and Khayadkashani, M. 2017 Inhibition Effect of Opuntia Stem Extract on Corrosion of Mild Steel: A Quantum Computational Assisted Electrochemical Study to Determine the Most Effective Components in Inhibition. *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces*, 53, 560-572. <https://doi.org/10.1134/S207020511703008X>
- Huang, Y., Huang, Z., Watanabe, C. and Wang, L. 2019 Combined Direct Analysis in Real-Time Mass Spectrometry (DART-MS) with Analytical Pyrolysis for Characterization of Chinese Crude Propolis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 137, 227-236. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2018.11.030>
- Inglese, P., Mondragon, C., Nefzaoui, A., Saenz, C., Louhaichi, M., Makkar, H. and Taguchi, M. 2017 Crop Ecology, Cultivation and Uses of Cactus Pear. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Lecaros, M. 1997 Caracterizacion De Harina De Cladodio De Nopal (*Opuntia ficus indica*). Memoria para optar al titulo de Ingeniero Agronomo, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronomicas, Santiago, 61 p.
- Lowry, O.H., Rosebrough, S., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951 Protein Measurement with the Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Ma, H., Jiang, Q., Dai, D., Li, H., Bi, W. and Che, D.D.Y. 2018 Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry for Characterization of Large Saccharides. *Analytical Chemistry*, 90, 3628-3636. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00242>
- Madjdoub, H., Roudesli, S., Picton, L., Le Cerf, D., Muller, G. and Grisel, M. 2001 Prickly Pear Nopals Pectin from *Opuntia ficus Indica*. *Physicochemical Study in Dilute and Semidilute Solutions*. *Carbohydrate Polymers*, 46, 69-79. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00284-8](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00284-8)
- Market and Market 2018 Hydrocolloids Market by Type, Function, Source, Application, & by Region Global Forecast to 2020. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/hydrocolloid-market-1231.html>
- Matsuhira, B., Lillo, L.E., Saenz, C., Urzua, C.C. and Zarate, O. 2006 Chemical Characterization of the Mucilage from Fruits of *Opuntia ficus indica*. *Carbohydr Polym*, 63, 263-267. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.08.062>
- Molina, M.W., Torres-Acosta, A.A., Martinez-Pena's, G.E.I. and Alonso-Guzman, E.M. 2014 Cement-Based Materials Enhanced Durability from *Opuntia Ficus -Indica* Mucilage Additions. *ACI Materials Journal*, 112, 165-172. <https://doi.org/10.14359/51687225>
- Monroy, M., Garcia, E., Rios, K. and Garcia, J.R. 2017 Extraction and Physicochemical Characterization of Mucilage from *Opuntia cochenillifera* (L.) Miller. *Journal of Chemistry*, 2017, Article ID: 4301901. <https://doi.org/10.1155/2017/4301901>
- Munoz Bojorges, J.C., Quintero Lizaola, R., Perez Nieto, J., Valdes Velarde, E., Garcia Favela, B. and Rojas Acosta, M. 2015 Comportamiento de la actividad enzimatica del suelo al aplicar mucilago de nopal (*Opuntia* spp.). *Terra Latinoamericana*, 33, 161-167.

- Nharingo, T. and Moyo, M. 2016 Application of *Opuntia ficus -indica* in Bioremediation of Wastewaters. A Critical Review. *Journal of Environmental Management* 166, 55-72. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.10.005>
- Otalora, M.C., Carriazo, J.G., Iturriaga, L., et al. 2015 Microencapsulation of Betalains Obtained from Cactus Fruit (*Opuntia ficus -indica*) by Spray Drying Using Cactus Cladode Mucilage and Maltodextrin as Encapsulating Agents. *Food Chemistry*. 187, 174-181. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.090>
- Persia, F., Alisi, C., Bacchetta, L., Bojorquez, E., Colantonio, C., Falconieri, M., Insaurralde, M., Meza Orozco, A., Sprocati, A.R. and Tati, A. 2016 Nopal as Organic Additive for Bio-Compatible and Eco-Sustainable Lime Mortars. 7th Conference Diagnosis, Conservation and Valorization of Cultural Heritage, Naples, 15-16 December 2016, 245-251.
- Prasertsan, P., Prasertsan, S. and H-Kittikun, A. 2011 *Biotechnology Vol. X Recycling of Agro-Industrial Wastes through Cleaner Technology. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS) UNESCO.*
- Proestos, C., Lytoudi, K., Mavromelanidou, O.K., Zoumpoulakis, P. and Sinanoglou, V.J. 2013 Antioxidant Capacity of Selected Plant Extracts and Their Essential Oils. *Antioxidants*, 2, 11-22. <https://doi.org/10.3390/antiox2010011>
- Rocchetti, G., Pellizzoni, M., Montesano, D. and Lucini, L. 2018 Italian *Opuntia ficus -indica* Cladodes as Rich Source of Bioactive Compounds with Health Promoting Properties. *Foods*, 7, 24. <https://doi.org/10.3390/foods7020024>
- Saenz, C., Estevez, A.M., Sepulveda, E. and Mecklenburg, P. 1998 Cactus Pear Fruit: A New Source for a Natural Sweetener. *Plant Foods for Human Nutrition*, 52,141-149. <https://doi.org/10.1023/A:1008033704523>
- Saenz, C., Sepulveda, E. and Matsuhira, B. 2004 *Opuntia* Spp Mucilage's: A Functional Component with Industrial Perspectives. *Journal of Arid Environments* , 57, 275-290. [https://doi.org/10.1016/S0140-1963\(03\)00106-X](https://doi.org/10.1016/S0140-1963(03)00106-X).
- Salehi, E., Emam-Djomeh, Z., Fathi, M. and Askari, G. 2019 *Opuntia ficus -indica* Mucilage. In: Razavi, S.M.A., Ed., *Emerging Natural Hydrocolloids*, Wiley, Hoboken, Chapter 17, 425-444. <https://doi.org/10.1002/9781119418511.ch17>.
- Sepulveda, E., Saenz, C., Aliaga, E. and Aceituno, C. 2007 Extraction and Characterization of Mucilage in *Opuntia* spp. *Journal of Arid Environments* , 68, 534-545. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2006.08.001>
- Stintzing, F.C., Schieber, A. and Carle, R. 2001 Phytochemical and Nutritional Significance of Cactus Pear. *European Food Research and Technology*, 212, 396-407. <https://doi.org/10.1007/s002170000219>
- Vecino, X., Devesa-Rey, R., de Lima Stebbins, D., et al. 2016 Evaluation of a Cactus Mucilage Biocomposite to Remove Total Arsenic from Water. *Environmental Technology & Innovation*, 6, 69-79. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2016.07.001>
- Wang, Y., Liu, L., Ma, L. and Liu, S. 2014. Identification of Saccharides by Using Direct Analysis in Real Time (DART) Mass Spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 357, 51-57. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2013.09.008>

- Yang, H., Gao, G., Wang, Y., Liu, J., Li, Z., Su, R., et al. 2017 Ionization Characteristics of Glycosides by Direct Analysis in Real Time Quadrupole-Time of Flight Mass Spectrometry. *New Journal of Chemistry*, 41, 1103-1109. <https://doi.org/10.1039/C6NJ02683D>
- Yew, J.Y. 2019 Natural Product Discovery by Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry. *Mass Spectrometry*, 8, 1-8. <https://doi.org/10.5702/massspectrometry.S0081>
- Zeng, S., Wang, L., Chen, T., Wang, Y., Mo, H. and Qu, H. 2012 Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry and Multivariate Data Analysis: A Novel Approach to Rapid Identification of Analytical Markers for Quality Control of Traditional Chinese Medicine Preparation. *Analytica Chimica Acta*, 733, 38-47. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.04.025>.

6.2. Caratterizzazione chimica del nopal secco siciliano [Opuntia ficus-indica (L.) Mill.]

6.2.1. Introduzione

L'*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill., comunemente nota come fico d'India, è originaria del Messico e si è successivamente diffusa in molte aree del mondo, come il Sud America, il Sud Africa e, non ultimo, il bacino del Mediterraneo. In Italia, la sua diffusione si ha soprattutto nella Sicilia Orientale. In particolare, il territorio di San Cono (Sicilia sud-orientale) possiede i più grandi frutteti italiani, costituiti da tre principali cultivar autoctone e commerciali, come Sanguigna, Surfarina e Muscaredda (Albergamo *et al.*, 2018; Albergamo *et al.*, 2021). L'impatto economico di *Opuntia-ficus indica* ha un ruolo di maggiore rilievo in territori come il Messico dove, oltre alla commercializzazione dei frutti, i cladodi vengono consumati freschi crudi o cotti per l'alimentazione (Andreu *et al.*, 2018; Andreu-Coll *et al.*, 2019; Angulo-Bejarano *et al.*, 2014;

Contreras-Padilla *et al.*, 2011; Figueroa-Perez *et al.*, 2018; Guevara-Figueroa *et al.*, 2010; Hernandez-Urbiola *et al.*, 2010; Lopez-Cervantes *et al.*, 2011; Ramirez-Moreno *et al.*, 2011; Rodriguez-García *et al.*, 2007; Santos-Zea *et al.*, 2011). Ci sono, invece, pochi studi riguardanti l'uso degli scarti di potatura in altre zone, per tale motivo lo scopo del presente studio è stato quello di effettuare per la prima volta una caratterizzazione chimica esauriente del nopal siciliano (*O. ficus-indica*) disidratato mediante un processo di essiccazione solare. Inoltre, il nopal siciliano è stato studiato in relazione alla cultivar (es. Sanguigna, Surfarina e Muscaredda) e alla stagione della potatura (gennaio-febbraio e giugno-luglio 2019) per sfruttarne al meglio le potenzialità in ambito alimentare e nutraceutico.

6.2.2. Materiali e metodi

Cladodi freschi di tre cultivar autoctone di fico d'India (*Opuntia ficus-indica* L., cv. Sanguigna, Surfarina e Muscaredda), sono stati raccolti da piantagioni biologiche situate nel territorio di San Cono (Sicilia, Italia), comprendenti i comuni di San Cono, San Michele di Ganzaria (provincia di Catania), Piazza Armerina (provincia di Enna), e Mazzarino (provincia di Caltanissetta), ad un'altitudine compresa tra 200 e 600 m s.l.m. (Figura 1). L'identificazione tassonomica del fico d'India è stata effettuata dai botanici dell'Università di Messina. Nello specifico, per ogni cultivar sono stati raccolti 12 campioni, ciascuno composto da ~100 kg di

cladodi freschi (lunghezza circa 30-50 cm), comprendenti 6 campioni provenienti dalla potatura effettuata nel periodo gennaio-febbraio 2019 (stagione invernale) e 6 campioni dalla potatura eseguita in giugno-luglio 2019 (stagione estiva). Pertanto, durante lo studio sono stati presi in considerazione un totale di 36 campioni di cladodi. Per ogni campione, i cladodi sono stati lavati, pelati, tagliati a fettine e disidratati da un essiccatore solare installato a San Cono. Come già descritto da Ciriminna *et al.* (2019), il sistema di essiccazione solare composto da sei collettori solari di forma rettangolare (1,05 m × 6,0 m) rivolti direttamente a sud senza ombreggiamento e inclinati di 60 °. Tale sistema è stato posizionato davanti ad un forno di essiccazione convenzionale (De Cloet, Italia) in modo che l'aria calda proveniente dai collettori solari venisse immessa nel forno tramite un unico ventilatore alimentato dall'energia elettrica recuperata dalla rete. La temperatura all'interno del forno era di ~45 °C, mentre la temperatura dell'aria proveniente dai collettori solari durante le ore centrali del giorno solare, e prima della miscelazione con l'aria all'interno del forno, era di ~65 °C. Quindi, la disidratazione si è verificata a ~55 °C per 5 giorni.

L'umidità e le temperature sono state costantemente misurate durante questo periodo fino a quando i valori di umidità relativa sono scesi a ≤10%. Infine, i campioni essiccati sono stati macinati e passati al setaccio da 150 mesh per ottenere polveri fini. Tutte le

polveri di nopal sono state quindi conservate a 18 °C fino a ulteriori analisi.

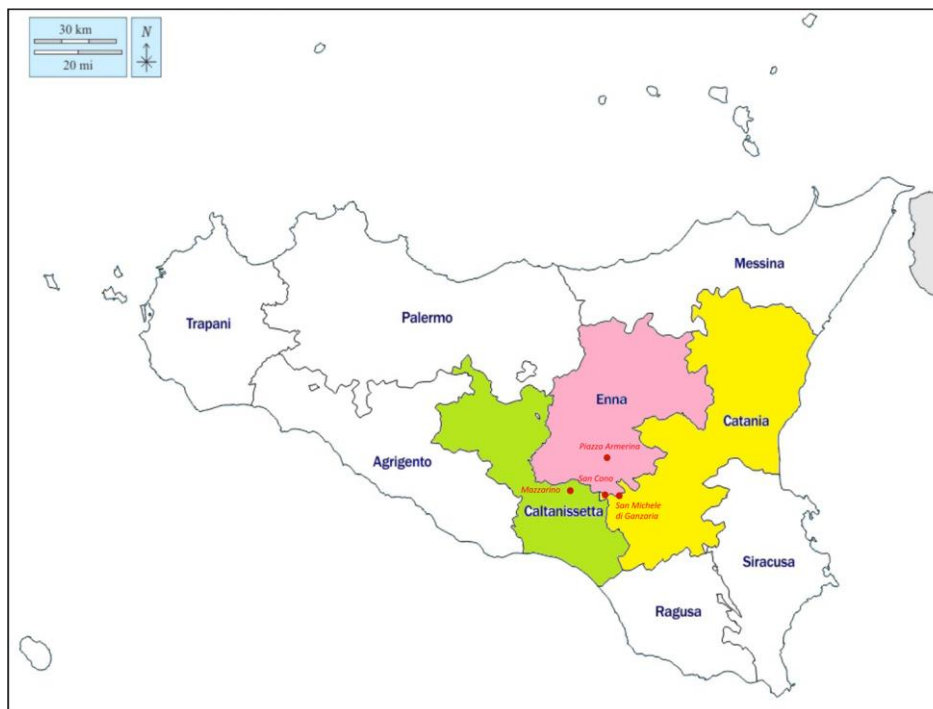


Figura 1: Carta geografica che illustra i siti di campionamento all'interno dell'area di San Cono (Sicilia, Italia) considerati per lo studio

6.2.2.1. Materiali e reagenti

Tutti i solventi (reagente e grado HPLC) sono stati forniti da PanReac AppliChem (Barcellona, Spagna) e J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). L'acqua ultrapura (resistività 18 mΩ cm e TOC <5 ppb) è stata ottenuta da un sistema di purificazione dell'acqua Barnstead Smart2Pure 12 (Thermo Scientific, Milano, Italia). Gli standard di riferimento degli esteri metilici degli acidi grassi (FAME) (C4–C24) e le soluzioni standard di stock degli elementi inorganici studiati (1000 mg/L in 2% HNO₃) sono stati acquistati da Supelco (Bellefonte, USA). Gli standard commerciali

di zuccheri e polifenoli sono stati ottenuti da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) ed Extrasynthese (Genay, Francia). Il catalizzatore Kjeldahl è stato fornito da Carlo Erba (Milano, Italia).

6.2.2.2. Composizione prossimale

i carboidrati e l'umidità sono stati eseguiti su polveri nopali secondo i protocolli di analisi ufficiali dell'AOAC (AOAC, 2012). Il TDF è stato determinato secondo il Metodo Ufficiale AOAC 991.43 e il Metodo AACC 32 07.01. Per ogni campione, il TDF è stato misurato in duplicato utilizzando il kit di analisi Megazyme (International Ireland Ltd., Wicklow, Ireland). In breve, due aliquote di campione (1,0 g ciascuna) sono state gelatinizzate in parallelo a 80 °C da α -amilasi e quindi digerite a 60 °C con proteasi e amiloglicosidasi. Le soluzioni sono state raffreddate a ~40 °C e trattate con 4 vol. di etanolo per precipitare la fibra e rimuovere le proteine depolimerizzate e il D-glucosio (dall'amido). I residui derivati sono stati filtrati, lavati (in sequenza, con etanolo (78 %, v/v), etanolo (95 %, v/v) e acetone), essiccati ed è stato calcolato il peso medio. In questa fase, un residuo è stato incubato a 500 °C fino a peso costante (~12 h) per la determinazione delle ceneri, mentre l'altro residuo è stato analizzato per la proteina grezza. La proteina grezza è stata determinata utilizzando il metodo ufficiale AOAC 976.05. In breve, il residuo è stato digerito con acido solforico (98%), rame (II) selenite diidrato e solfato di potassio mediante SpeedDigester K-439 (Büchi, Svizzera) e quindi

analizzato mediante KjelMaster System K-375 (Büchi, Svizzera) dotato di scrubber di gas e vapori (Scrubber K-415, Büchi, Svizzera). La soluzione risultante è stata trattata con idrossido di sodio (40%), per sviluppare ammoniaca, che è stata successivamente distillata e raccolta in 50 mL di acido borico (1%). Quindi, la quantità di azoto è stata determinata mediante titolazione con acido cloridrico (0,1 N). Per il calcolo della % di proteine, la % di azoto ottenuta è stata moltiplicata per un fattore di conversione di 6,5. Il TDF è stato calcolato come il peso medio del residuo essiccato meno il peso delle proteine e delle ceneri. Per la determinazione del grasso totale è stato utilizzato il metodo AOAC 920.39. In breve, un'aliquota (15,0 g) di ciascun campione è stata estratta con n-eptano per 6 ore, mediante un apparato Soxhlet. Quindi, l'estratto lipidico totale è stato evaporato a secco con un evaporatore rotante, modello P/N Hei-VAP Precision ML/G3 (Heidolph Instruments GmbH & Co., Schwabach, Germania) e la resa di estrazione è stata determinata gravimetricamente. L'umidità è stata determinata dalla perdita di peso del campione dopo l'essiccazione in forno a 110 °C per 4 h (metodo AOAC 925.09); mentre i carboidrati totali sono stati determinati per differenza. Tutte le misurazioni del campione sono state condotte in triplicato.

6.2.2.3. Composizione di acidi grassi (FA)

La composizione degli acidi grassi del Nopal è stata eseguita mediante un protocollo di preparazione e analisi del campione

già riportato in Lo Turco *et al.* (2016). Ogni estratto lipidico essiccato ottenuto dall'apparato Soxhlet è stato recuperato mediante l'aggiunta di 1 mL di n-esano e trasmetilato con acido solforico al 2% in metanolo a 80°C per 10 min. Quindi, lo strato organico contenente FAME è stato decantato e analizzato. La composizione dell'FA è stata chiarita da un gascromatografo (GC) dotato di un iniettore split/splitless e un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) (Dani Master GC1000, Dani Instrument, Milano, Italia). È stata impiegata una colonna capillare Supelco SLB-IL100, 60 m × 0,25 mm ID, spessore del film 0,20 µm, (Supelco, Sigma Aldrich, USA). Sono state utilizzate le seguenti condizioni operative: programma di temperatura del forno da 130 °C a 210 °C (mantenimento 10 min) a 2 °C/min; le temperature dell'iniettore e del rivelatore erano rispettivamente di 220 °C e 240 °C; elio ad una velocità lineare di 30 cm/s (costante). Il volume di iniezione era di 1 µL, con un rapporto di divisione di 1:100. L'acquisizione e la gestione dei dati sono state eseguite utilizzando il software di cromatografia Clarity v4.0.2. Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato insieme a bianchi analitici. Le FAME di interesse nutrizionale sono state individuate mediante confronto diretto con i tempi di ritenzione di riferimento dei composti presenti nella miscela standard. La percentuale di FAME individuale è stata calcolata rispetto all'area totale del cromatogramma.

6.2.2.4. Elementi minerali

Aliquote di polvere di Nopal da 0,5 g ciascuna sono state mineralizzate con 7 mL di HNO₃ e 2 mL di H₂O₂ sfruttando il sistema di digestione a microonde Ethos 1 (Milestone, Bergamo, Italia). Sono stati impiegati un programma di temperatura di 0–200 °C in 10 min (passaggio 1) e 200 °C mantenuto per 15 min (passaggio 2) e una potenza del microonde di 1500 W. Dopo il raffreddamento a temperatura ambiente, i campioni digeriti sono stati diluiti fino a 50 ml con acqua ultrapura. Per l'analisi è stato impiegato un quadrupolo ICP-MS iCAP Q (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Lo screening di minerali (es. Na, Mg, Ca e K), tracce di elementi essenziali (es. Mn, Fe, Cu e Zn) ed elementi potenzialmente tossici (es. Ni, Cr, Al, As, Cd e Pb) è stato eseguito secondo il nostro metodo ottimizzato già utilizzato per diverse matrici alimentari (Di Bella et al., 2015; Lo Turco et al., 2020; Potortì et al., 2013, 2017, 2018, 2020, 2021). I parametri di funzionamento sono stati: radiofrequenza incidente (rf) potenza 1500 W; portata del gas plasma [argon (Ar)] 15 L/min; portata del gas ausiliario (Ar) 0,9 L/min; e portata del gas di trasporto (Ar) 1,10 L/min. Lo strumento è stato utilizzato con elio (He) come gas della cella di collisione (4 ml/min) ed è stato dotato di una camera di nebulizzazione impostata a 2 °C. Il volume di iniezione e la portata di introduzione del campione erano rispettivamente pari a 200 µL e 1 mL/min. L'acquisizione degli spettri è avvenuta in modalità scansione completa (tempo di permanenza 0,5 o 0,1

s/punto, in base all'analita). Tutti i campioni sono stati sottoposti a screening in triplicato insieme ai bianchi analitici e l'acquisizione dei dati è avvenuta tramite Qtegra™ Intelligent Scientific Data Solution (Thermo Scientific™). Per la quantificazione, è stata creata una curva di calibrazione a sei punti per ciascun analita (r^2 compreso tra 0,9991 [Mg] e 0,9998 [Pb]). Le determinazioni di mercurio sono state eseguite mediante analizzatore di mercurio automatico DMA-80 (Milestone S.r.l., Bergamo, Italia), basato sul principio della spettrofotometria ad assorbimento atomico a decomposizione termica (TDA-AAS), secondo il nostro metodo ottimizzato (Di Bella *et al.*, 2016, 2020). Un'aliquota di campione (100 mg) è stata introdotta in una navicella campione, essiccata a 200°C per 3 min e decomposta termicamente a 650°C per 2 min. Il contenuto di Hg è stato determinato misurando l'assorbanza a 253,7 nm e utilizzando una curva di calibrazione a sei punti ($r^2 = 0,9997$). Per ogni campione sono state eseguite misurazioni triplicate insieme a bianchi analitici. Sia le procedure ICP-MS che quelle DMA sono state validate analiticamente in termini di linearità, limite di rilevabilità (LOD) e quantificazione (LOQ), accuratezza, variabilità intra e inter-saggio, come riportato in dettaglio nel nostro recente studio (Ben Amor *et al.*, 2021) (per ulteriori dettagli, vedere il materiale supplementare).

6.2.2.5. Polifenoli

Un'aliquota di polvere di nopal (3,0 g) è stata sospesa in 10 mL di metanolo acquoso (80%) e agitata per una notte in ghiaccio. Quindi, la miscela è stata centrifugata a 10.000 g per 15 minuti a 4 °C e il surnatante risultante è stato raccolto e filtrato consecutivamente attraverso filtri in politetrafluoroetilene (PTFE) da 0,45 µm e 0,20 µm. Ogni estratto è stato analizzato mediante HPLC accoppiato a diode-array detection e spettrometria di massa (HPLC-DAD-MS), seguendo il protocollo già riportato da Albergamo et al. (2020). Le analisi sono state condotte su un apparato LC (sistema Prominence UFLC XR, Shimadzu, Kyoto, Giappone), composto da controller (CBM-20A), pompe binarie (LC-20AD-XR), degasatore (DGU-20A3R), rilevatore PDA (SPD M20), forno a colonna (CTO-20AC) e autocampionatore (SIL-20A XR). Per l'analisi cromatografica è stato utilizzato un Ascentis Express C18 (250 × 4,6 mm di diametro interno × 2,7 µm di diametro delle particelle; Supelco) e le fasi mobili erano acqua/acido formico (99,9:0,1, v/v) (solvente A) e acetonitrile/formico acido (99,9:0,1, v/v) (solvente B). L'eluizione del gradiente era: 0 min, 5% B, 5 min, 5% B, 15 min, 30% B, 40 min, 60% B, 45 min, comprese le fasi di lavaggio e riequilibrio della colonna finale. La velocità di flusso della fase mobile era di 1,0 mL/min, mentre la temperatura del forno e il volume di iniezione sono stati impostati rispettivamente a 30 °C e 5,0 µL. Gli spettri PDA sono stati acquisiti nell'intervallo 190–400 nm e i

cromatogrammi sono stati estratti con lunghezze d'onda comprese tra 280 nm e 370 nm (costante di tempo 0,60 s; frequenza di campionamento 1,5625 Hz). Una sorgente di ionizzazione elettrospray (ESI) ha interfacciato il sistema LC con uno spettrometro di massa (MS) a triplo quadrupolo (LCMS-8040, Shimadzu, Kyoto, Giappone). Un dispositivo di divisione (VICI AG International, Schenkon, Svizzera) assicurava che solo un terzo del flusso totale fosse diretto dal sistema LC all'interfaccia ESI. L'acquisizione MS è stata eseguita utilizzando l'interfaccia ESI in modalità negativa, oltre a operare in modalità full-scan (m/z 100–800) e monitoraggio ionico selezionato (SIM) in base alle condizioni: intervallo, 1,0 s; velocità di scansione, 715 amu/sec; flusso del gas di nebulizzazione (N₂) 1,5 L/min; flusso gas essiccante (N₂) 10 L/min; Temperatura ESI, 350 °C; blocco termico, 300 °C e temperatura della linea di desolvatazione (DL), 300 °C. Ogni misurazione è stata condotta in triplicato insieme a bianchi analitici. La raccolta e la gestione dei dati è stata eseguita da LabSolution, versione 5.53 (Shimadzu). I composti studiati appartenevano alle classi degli acidi fenolici, dei flavoni e dei flavonoli. Sono stati selezionati in base alla disponibilità standard e alla loro peculiare presenza in nopal (Guevara-Figueroa *et al.*, 2010; Lanuzza *et al.*, 2017; Rocchetti *et al.*, 2018). Ai fini della quantificazione, è stata condotta una procedura di calibrazione esterna mediante curve di calibrazione a sei punti (r^2 compreso tra 0,9998 [luteolina] e 0,9959 [acido sinapico]). Il metodo LC-MS è

stato convalidato in termini di linearità, LOD, LOQ, accuratezza, variabilità intra- e intertest.

6.2.2.6. Zuccheri

Gli zuccheri sono stati determinati secondo il metodo ISTISAN 96/34 proposto da Baldini *et al.* (1996). Un'aliquota di polvere di nopal (10,0 g) è stata miscelata con 100 ml di acetonitrile/acqua (60:40, v/v) e agitata, prima, per 30 minuti mediante un bagno ad ultrasuoni e poi, per 3 ore mediante un agitatore magnetico. Il supernatante ottenuto è stato risciacquato in una bottiglia da 100 ml attraverso carta da filtro per rimuovere i solidi sospesi ed è stato successivamente passato attraverso una cartuccia Sep-Pak C18 (Waters, Milford, MA). Ogni estratto è stato analizzato per gli zuccheri mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiata a un rivelatore di indice di rifrazione (HPLC-RI) sfruttando un sistema Shimadzu LC10A (Shimadzu, Kyoto, Giappone) dotato di una colonna a base di propilammina in fase inversa (Supelcosil LC-NH₂, 25 cm × 4,6 mm, 5 µm ID, Supelco, Bellefonte, USA) e accoppiato a un rivelatore RI Shimadzu RID-6A (Shimadzu, Kyoto, Giappone). L'eluizione isocratica è avvenuta con una fase mobile costituita da acetonitrile/acqua (50:50) ad una portata di 1 mL/min; mentre il volume di iniezione e la temperatura del forno della colonna erano rispettivamente di 10 µL e 25 °C. Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato insieme a bianchi analitici. Per la quantificazione, sono state

costruite curve di calibrazione a sei punti per ogni zucchero studiato (r^2 compreso tra 0,993 [arabinosio] e 0,998 [glucosio]).

6.2.2.7. Analisi statistica

I dati sperimentali sono stati espressi come media \pm deviazione standard di tre misurazioni replicate per campione. Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando SYSTAT versione 13 (Systat Software, San Jose, CA, USA). In particolare, è stata eseguita un'analisi della varianza unidirezionale (ANOVA) per determinare il significato delle differenze nelle variabili studiate in dipendenza della cultivar. La differenza onestamente significativa di un Tukey (HSD) è stato applicato il test per un confronto post hoc quando sono state rilevate differenze significative ($p < 0,05$). È stato eseguito un test t di Student a due code per dati spaiati per studiare il significato delle differenze nelle variabili analitiche quando si considerano le diverse stagioni di potatura. La significatività statistica è stata accettata a $p < 0,05$.

6.2.3. Risultati e discussioni

I risultati sulla composizione prossima e fitochimica di tutti i campioni sono stati discussi facendo riferimento anche a variabili quali cultivar (indipendentemente dalla stagione di potatura invernale o estiva) e stagione di potatura (indipendentemente dalla cultivar), nel tentativo di indagare, anche da una statistica base,

quale delle due variabili ha maggiormente influenzato la composizione del nopal secco siciliano.

6.2.3.1. Composizione prossimale

Proteina grezza, lipidi, ceneri, carboidrati, TDF e umidità dei campioni esaminati sono riportati in Tabella 1. Nel complesso, la cultivar ha influenzato significativamente la proteina grezza, presentando rispettivamente i livelli più bassi e più alti nei campioni appartenenti ai cvs Sanguigna e Muscaredda. (1,48 % vs. 2,18 %, $p < 0,05$), TDF e carboidrati, che mostravano il contenuto più basso in Surfarina (rispettivamente, 41,10 % e 25,64 %, $p < 0,05$), e lipidi, che variavano da 0,76 % (Sanguigna) a 2,46 % (Muscaredda, $p < 0,05$). Al contrario, la cenere era simile in tutti i campioni considerati (12,81–15,23 %, $p > 0,05$). La stagione della potatura ha avuto un effetto significativo sul TDF, che era più alto in estate rispetto all'inverno (49,55 % contro 44,11 %, $p < 0,05$), carboidrati totali (29,91 % contro 25,54 %, $p < 0,05$) e lipidi (1,95 % contro 0,05). 1,05 %, $p < 0,05$), che erano significativamente più abbondanti in inverno che in estate. D'altra parte, contenuti simili di proteine (1,83–1,85 %, $p > 0,05$) e ceneri (12,92–14,73 %, $p > 0,05$) sono stati rilevati durante entrambe le stagioni di potatura. Indipendentemente dalla cultivar e dal periodo di potatura, l'essiccazione solare ha assicurato un basso livello di umidità (5,43–7,25 %, $p > 0,05$) e può migliorare efficacemente la shelf-life del nopal stesso, evitando la proliferazione microbica e

preservandone le proprietà nutritive (Tabella 1). Inoltre, il nopal siciliano può essere etichettato come “fonte naturale di fibra”, perché naturalmente caratterizzato da oltre il 3% di TDF, secondo il Regolamento (CE) 1924/2006 (Commissione Europea, 2006).

Per quanto a conoscenza degli autori, la composizione prossima del nopal essiccato siciliano non è stata ancora delucidata altrove. Nel complesso, i campioni esaminati hanno mostrato proteine e carboidrati più bassi e TDF più elevati, rispetto al nopal messicano, a cui la letteratura si riferiva principalmente. In effetti, il nopal liofilizzato ha mostrato un contenuto proteico significativamente variabile dal 6,7% al 19%, carboidrati dal 55,1 al 66,5% e TDF dal 6,2 al 15% a seconda della cultivar studiata (cioè Blanco, Manso, Amarillo e Cristalino). Allo stesso modo, lipidi e ceneri oscillavano rispettivamente tra 0,1–1,5% e 14,8–18,8% (Guevara-Figueroa *et al.*, 2010). Il nopal essiccato sottovuoto (cv. Redonda) da due studi separati ha mostrato proteine negli intervalli 5,85–8,99 % e 11,39–14,42 %, lipidi 1,42–2,38 % e 1,96–3,00 % e ceneri 17,65–24,30 % e 18,41–23,24 % a seconda dello stadio di maturità dei cladodi (Hernandez-Urbiola *et al.*, 2010; Rodríguez-García *et al.*, 2007). I cladodi liofilizzati delle cultivar Milpa Alta e Atlixico hanno mostrato contenuti di cenere (22,81–25,23%) e TDF (47,48–51,14%) non significativamente diversi. Tuttavia, entrambe le cultivar avevano livelli di TDF molto più alti del TDF generalmente rivelato nel nopal messicano (Ramírez-Moreno *et al.*, 2011). Il nopal ottenuto mediante essiccazione per convezione

era in linea con la tipica composizione prossima del nopal messicano (proteine: 7,24–7,52 %, grassi: 2,30–2,38 %, ceneri: 20,12–20,78 % e TDF: 6,00–6,15 %, Lopez-Cervantes et al., 2011).

Componenti	Cultivar			Stagionalità	
	Sanguigna	Surfarina	Muscarella	Invernale	Estiva
Proteine	1.48 ± 0.18 ^a	1.86 ± 0.13 ^b	2.18 ± 0.22 ^c	1.83 ± 0.29	1.85 ± 0.41
TDF	46.72 ± 2.26 ^a	41.10 ± 2.04 ^b	45.01 ± 3.45 ^a	44.11 ± 1.80*	49.55 ± 1.47*
Ceneri	12.81 ± 1.64 ^a	15.23 ± 3.51 ^a	13.3 ± 2.95 ^a	12.92 ± 1.88	14.73 ± 3.35
Carboidrati	29.62 ± 1.87 ^a	25.64 ± 1.61 ^b	30.62 ± 2.18 ^a	29.91 ± 1.19*	24.54 ± 1.99*
Lipidi	0.76 ± 0.39 ^a	1.55 ± 0.35 ^b	2.46 ± 0.58 ^c	1.95 ± 0.58*	1.05 ± 0.31*
Umidità	6.58 ± 1.03 ^a	7.25 ± 1.18 ^a	5.43 ± 0.73 ^a	7.02 ± 0.93	6.15 ± 1.11

Tabella 1: Composizione prossimale (% dw) di nopal siciliano da diverse cultivar di *O. ficus-indica*, proveniente dalla potatura invernale ed estiva. I risultati sono espressi come media ± deviazione standard di 12 campioni per cultivar e come media ± deviazione standard di 18 campioni per stagione, in cui ogni campione è stato analizzato tre volte. TDF = fibra alimentare totale. A seconda della cultivar: diverse lettere in apice (a–c) nella stessa riga indicano valori significativamente diversi ($p < 0,05$ secondo il test HSD post hoc di Tukey); le stesse lettere in apice nella stessa riga indicano valori non significativamente diversi ($p > 0,05$ secondo il test HSD post hoc di Tukey). A seconda della stagione di potatura: * indica valori significativamente differenti ($p < 0,05$ secondo il test t di Student).

6.2.3.2. Acidi grassi (FA)

La composizione FA del nopal siciliano è mostrata nella Tabella 2. Indipendentemente dalle variabili studiate, il nopal siciliano era caratterizzato dalla marcata presenza di acidi grassi saturi (SFA, 43,61–47,41%), seguiti da acidi grassi polinsaturi (PUFA, 36,61–39,22%) e livelli più bassi di acidi grassi monoinsaturi (MUFAs, 13,80–16,73 %). La composizione FA del nopal siciliano è stata influenzata sia dalla cultivar che dalla stagione della potatura, con

l'influenza della stagione della potatura più pronunciata. L'influenza della cultivar è stata particolarmente osservata sui principali AF. Ad esempio, l'acido palmitico era più abbondante in Muscaredda e Surfarina cvs. di Sanguigna cv. (C16:0, 32,07–36,40 %, $p < 0,05$), l'acido oleico era a un livello più alto nel nopal di Surfarina rispetto ad altri campioni (C18:1n-9, 13,00–15,47 %, $p < 0,05$), il linoleico era più concentrato nel nopal da Muscaredda cv. (C18:2n-6, 21,43–24,27 %, $p < 0,05$) e l'acido linolenico si è distinto nei campioni appartenenti a Sanguigna e Surfarina cvs. (C18:3n-3, 11,02–15,61 %, $p < 0,05$) (Tabella 2). È interessante notare che tutti i campioni sono risultati essere una fonte discreta di FA a catena corta, con l'acido caprilico predominante nel nopal di Sanguigna e Muscaredda cvs. (C8:0, 4,38–6,78 %, $p < 0,05$). È stato riportato che questi FA, non così rari nelle piante, migliorano la sensibilità all'insulina e riducono la produzione di glucosio epatico nei consumatori umani (Higgins, 2012). La stagione della potatura ha influenzato in modo significativo il contenuto della maggior parte degli AF. Ad esempio, C8:0 e C18:3n-3 erano più alti in estate che in inverno (rispettivamente, 3,48 % contro 7,65 % e 13,46 % contro 16,83 %, $p < 0,05$). Al contrario, l'acido stearico (C18:0) e C18:1n-9 erano più abbondanti in inverno che in estate (rispettivamente, 3,95% contro 1,68% e 12,75% contro 15,66%, $p < 0,05$) (Tabella 2). Per quanto a conoscenza degli autori, la composizione FA del nopal essiccato siciliano non è stata ancora riportata altrove. Infatti, la letteratura riporta solo pochi studi sulla

composizione AF del nopal messicano e spagnolo, a causa della maggiore attenzione data alla composizione AF dell'olio ottenuto da semi o polpa di fico d'India (Angulo Bejarano *et al.*, 2014). Rispetto al nopal di questo studio, il nopal messicano essiccato con un forno a convezione aveva grasso caratterizzato da acido palmitico inferiore (20,5–30,7%) e acido linolenico più elevato (21,58–26,4%) e livelli comparabili di oleico (9,48–11,03%) e acidi linoleici (25,05–28,61%) (Figueroa-Perez *et al.*, 2018). D'altra parte, il nopal spagnolo liofilizzato di sei cultivar ha mostrato una composizione di AF molto variabile a seconda della cultivar studiata (acido palmitico: 30,1–50,0%; acido oleico: 9,22–22,3%; acido linoleico: 12,8–27,9%; acido linolenico: 5,31–11,5%) (Andreu-Coll *et al.*, 2019).

Acidi grassi	Cultivar			Stagionalità	
	Sanguigna	Surfarina	Muscaredda	Invernale	Estiva
C4:0	0.42 ± 0.03 ^a	0.52 ± 0.02 ^a	0.64 ± 0.07 ^a	0.40 ± 0.05*	0.70 ± 0.06*
C6:0	0.13 ± 0.01 ^a	0.11 ± 0.01 ^a	0.12 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.03	0.14 ± 0.04
C8:0	6.52 ± 0.41 ^a	4.38 ± 0.86 ^b	6.78 ± 0.97 ^a	3.48 ± 1.05*	7.65 ± 0.67*
C14:0	0.13 ± 0.01 ^a	0.14 ± 0.05 ^a	0.12 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
C16:0	32.07 ± 0.89 ^a	36.40 ± 2.01 ^b	35.61 ± 1.50 ^b	35.65 ± 1.93	32.41 ± 1.31
C17:0	1.08 ± 0.19 ^a	1.16 ± 0.18 ^a	1.15 ± 0.19 ^a	1.29 ± 0.06*	0.97 ± 0.06*
C18:0	4.57 ± 1.07 ^a	1.93 ± 0.71 ^b	2.95 ± 1.28 ^{a, b}	3.95 ± 0.61*	1.68 ± 0.22*
C22:0	0.03 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
C24:0	0.02 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
SFAs	44.97 ± 1.23 ^a	44.68 ± 0.86 ^a	47.41 ± 0.81 ^a	44.93 ± 1.39	43.61 ± 1.30
C16:1n-7	0.44 ± 0.13 ^a	0.43 ± 0.09 ^a	0.40 ± 0.03 ^a	0.49 ± 0.06*	0.35 ± 0.03*
C17:1n-7	0.51 ± 0.14 ^a	0.39 ± 0.04 ^a	0.52 ± 0.13 ^a	0.56 ± 0.12*	0.39 ± 0.03*
C18:1n-9	13.00 ± 1.01 ^a	15.47 ± 0.61 ^b	13.74 ± 0.90 ^a	12.75 ± 1.01*	15.66 ± 0.82*
C20:1n-9	0.24 ± 0.13 ^a	0.49 ± 0.11 ^a	0.33 ± 0.10 ^a	0.37 ± 0.11	0.34 ± 0.19
MUFAs	14.09 ± 2.08 ^a	16.78 ± 0.71 ^a	14.99 ± 1.79 ^a	13.80 ± 1.69*	16.73 ± 0.73*
C18:2n-6	22.97 ± 1.38 ^a	21.43 ± 1.91 ^a	24.27 ± 0.55 ^b	23.97 ± 0.96	20.81 ± 2.41
C18:3n-3	14.82 ± 1.73 ^a	15.61 ± 2.99 ^a	11.02 ± 1.15 ^b	13.46 ± 1.05*	16.83 ± 1.88*
C20:4n-6	1.43 ± 0.33 ^a	1.07 ± 0.11 ^a	1.32 ± 0.19 ^a	1.21 ± 0.33	1.33 ± 0.17
PUFAs	39.22 ± 2.72 ^a	38.11 ± 1.30 ^a	36.61 ± 2.08 ^a	38.64 ± 0.73*	37.64 ± 1.00*

Tabella 2: Composizione in acidi grassi (FA) e acidi grassi saturi totali (SFA), acidi grassi monoinsaturi (MUFA) e acidi grassi polinsaturi (PUFA) del nopal siciliano provenienti da diverse cultivar di *O. ficus indica* e dalla potatura invernale ed estiva. I dati sono espressi come percentuale media dell'area del picco GC-FID ± deviazione standard (% dw) di 12 campioni per cultivar e come percentuale media dell'area del picco GC-FID ± deviazione standard (% dw) di 18 campioni per stagione, dove ogni campione è stato analizzato tre volte. A seconda della cultivar: diverse lettere in apice (a–c) nella stessa riga indicano valori significativamente diversi ($p < 0,05$ secondo il test HSD post hoc di Tukey); le stesse lettere in apice nella stessa riga indicano valori non significativamente diversi ($p > 0,05$ secondo il test HSD post hoc di Tukey). A seconda della stagione di potatura: *indica valori significativamente differenti ($p < 0,05$ secondo il test t di Student).

6.2.3.3. Zuccheri

La composizione zuccherina del nopal siciliano è riportata nella Tabella 3. In tutti i campioni testati, glucosio (9,30–12,00 g/100 g), acido galatturonico (6,51–8,78 g/100 g) e galattosio (3,41–4,83 g/100 g) erano gli zuccheri predominanti, con i livelli più alti rilevati nel nopal di Muscaredda ($p < 0,05$), mentre l'arabinosio (1,47–2,06 g/100 g, $p > 0,05$), lo xilosio (1,90–2,01 g/100 g, $p > 0,05$) e ramnosio (0,35–0,79 g/100 g, $p > 0,05$) sono stati osservati a livelli inferiori, con contenuti simili nei campioni delle tre cultivar autoctone. D'altra parte, la stagione della potatura ha influenzato maggiormente il profilo zuccherino, poiché la maggior parte dei monosaccaridi studiati era significativamente più alta in inverno che in estate. Ad esempio, il glucosio variava da 11,13 g/100 g a 9,37 g/100 g ($p < 0,05$), l'acido galatturonico variava da 7,90 g/100 g a 6,16 g/100 g ($p < 0,05$) e il galattosio era compreso tra 4,55 e 2,52 g/100 g ($p < 0,05$, Tabella 3). La composizione zuccherina del nopal di *O. ficus-indica* è stata poco e frammentariamente chiarita e la letteratura ha dedicato maggiore attenzione al succo estratto dal nopal piuttosto che al nopal stesso (Andreu *et al.*, 2018; Zenteno-Ramírez *et al.*, 2015). Solo Ginestra *et al.* (2009) hanno analizzato gli zuccheri monomerici di campioni di cladodi liofilizzati della *O. ficus-indica* calabrese (Sud Italia), costituiti da un mix di Surfarina, Muscaredda e Sanguigna cvs. Hanno riportato un profilo simile a quello ottenuto in questo

studio, confermando così l'abbondanza di glucosio (15,3 g/100 g), acido galatturonico (9,62 g/100 g) e galattosio (3,36 g/100 g). La somiglianza può essere spiegata non solo dall'osservazione delle stesse cultivar ma anche dal simile scenario di crescita geopedoclimatico.

Zucchero	Cultivar			Stagionalità	
	Sanguigna	Surfarina	Muscaredda	Invernale	Estiva
Glucosio	9.30 ± 0.37 ^a	10.27 ± 0.41 ^b	12.00 ± 0.60 ^c	11.13 ± 1.60*	9.37 ± 1.66*
Acido galatturonico	6.51 ± 1.41 ^a	6.81 ± 0.88 ^a	8.78 ± 0.85 ^b	7.90 ± 0.84*	6.16 ± 0.84*
Galattosio	3.79 ± 0.86 ^a	3.41 ± 1.24 ^a	4.83 ± 1.49 ^b	4.55 ± 1.01*	2.52 ± 0.33*
Mannosio	2.91 ± 0.40 ^a	0.67 ± 0.12 ^b	3.49 ± 0.73 ^c	1.44 ± 0.72*	4.09 ± 0.23*
Arabinosio	2.06 ± 0.43 ^a	1.47 ± 0.62 ^a	1.52 ± 1.23 ^a	2.97 ± 0.51*	1.73 ± 0.33*
Xilosio	1.90 ± 0.34 ^a	1.92 ± 0.59 ^a	2.01 ± 0.82 ^a	2.41 ± 0.47*	1.44 ± 0.18*
Ramnosio	0.58 ± 0.24 ^a	0.35 ± 0.15 ^a	0.79 ± 0.13 ^a	0.76 ± 0.21	0.48 ± 0.17

Tabella 3: Zuccheri (g/100 g, dw) di nopal siciliano da diverse cultivar di *O. ficus-indica* e recuperati dalla potatura invernale ed estiva. I risultati sono espressi come media ± deviazione standard di 12 campioni per cultivar e come media ± deviazione standard di 18 campioni per stagione, in cui ogni campione è stato analizzato tre volte. A seconda della cultivar: diverse lettere in apice (a–c) nella stessa riga indicano valori significativamente diversi ($p < 0,05$ secondo il test HSD post hoc di Tukey); le stesse lettere in apice nella stessa riga indicano valori non significativamente diversi ($p > 0,05$ secondo il test HSD post hoc di Tukey). A seconda della stagione di potatura: *indica valori significativamente diversi ($p < 0,05$ secondo il test t di Student).

6.2.3.4. Elementi minerali

Il profilo degli elementi inorganici del nopal siciliano è riportato in Tabella 4. La cultivar non ha avuto un impatto significativo sull'impronta digitale di minerali e tracce di metalli, come i cladodi di Sanguigna, Surfarina e Muscaredda cvs. erano generalmente caratterizzati da livelli simili di elementi inorganici. Le eccezioni erano rappresentate da K, l'elemento più abbondante, che era

significativamente più alto in nopal da Surfarina (6736,62 mg/100 g, $p < 0,05$) rispetto a Sanguigna e Muscaredda cvs. (rispettivamente, 5785,38 mg/100 g e 5745,84 mg/100 g, $p > 0,05$) e Ca, il secondo minerale più abbondante, che è risultato con il livello più alto nei campioni di Muscaredda cv. (5932,57 mg/100 g, $p < 0,05$).

Notoriamente, i cladodi sono caratterizzati da un contenuto di Ca molto elevato dovuto alla necessità della pianta di far fronte allo stress da calore, poiché tale minerale regola quei processi cellulari, inclusa la funzione stomatica, in grado di mitigare gli effetti negativi dell'elevata temperatura ambientale.

Tuttavia, il Ca si accumula nel nopal sotto forma di cristalli di ossalato che possono compromettere la sua bioaccessibilità finale (Angulo-Bejarano *et al.*, 2014). Quando si considerano gli oligoelementi, Mn era significativamente più alto ($p < 0,05$) in nopal da Surfarina e Muscaredda cvs. (57,32 mg/Kg e 55,76 mg/Kg) rispetto a Sanguigna cv. (45,12 mg/Kg); Zn era significativamente più concentrato ($p < 0,05$) nei campioni appartenenti a Sanguigna e Surfarina cvs. (13,23 mg/Kg e 11,86 mg/Kg) rispetto a Muscaredda cv. (7,87 mg/Kg); mentre Fe era simile in tutti i campioni considerati (15,82–17,09 mg/Kg, $p > 0,05$). I metalli in traccia potenzialmente tossici, come Ni, Cr, Cd, Pb e Hg, erano a livelli bassi e sicuri (0,02–0,03 a causa della natura organica dei frutteti da cui proviene il nopal (Tabella 4). La stagione della potatura è stata maggiore effetto della cultivar

sul profilo elementare, molti elementi risultavano significativamente più alti in estate che in inverno, ad esempio Mg era pari a 210,06 mg/100 g e 283,77 mg/100 g rispettivamente in inverno e in estate ($p < 0,05$), e K variava da 4899,25 mg/100 g a 6612,95 mg/Kg nelle stesse stagioni ($p < 0,05$). Tra gli oligoelementi, anche il contenuto di Fe e Zn era significativamente diverso tra inverno ed estate (rispettivamente, 14,21 contro 18,80 mg/Kg, e 16,12 contro 5,54 mg/Kg, $p < 0,05$, Tabella 4).

In letteratura sono stati studiati minerali e oligoelementi di nopal rispetto al messicano *O. ficus-indica*, risultando, in generale, a contenuti molto variabili e non confrontabili con il nopal siciliano. Il nopal essiccato sottovuoto (cv. Redonda) è stato caratterizzato da Mg variabile da 880 a 1120 mg/100 g, Na da 30 a 550 mg/100 g, e Mn da 290 a 300 mg/Kg a seconda degli stadi di maturazione (Hernandez-Urbiola *et al.*, 2010). Contreras-Padilla e collaboratori (2011) hanno valutato il contenuto di Ca dei cladodi essiccati sottovuoto (cv. Redonda) e hanno scoperto che il Ca nel nopal essiccato aumentava in funzione della maturità. Tuttavia, hanno riportato livelli di Ca più bassi rispetto a quelli osservati in questo studio (da 1740 mg/100 a 3440 mg/100 g). Analogamente al nostro studio, il nopal liofilizzato di due cultivar messicane (cioè Milpa Alta e Atlixico) ha mostrato profili elementari non significativamente diversi l'uno dall'altro. Tuttavia, il nopal messicano era caratterizzato da livelli di Mg più elevati (1016,68 724,93 mg/100 g) e da contenuti di Ca più bassi (1966,36 1701,10

mg/100 g) rispetto alla controparte siciliana; mentre elementi come K (5469,16–5648,15 mg/100 g), Na (83,12–112,45 mg/100 g) Mn (35,4 30,3 mg/Kg) e Fe (34,3 31,6 mg/Kg) sono stati trovati a livelli simili a quelli descritti in questo lavoro (Ramírez-Moreno *et al.*, 2011).

Elemento	Cultivar			Stagionalità	
	Sanguigna	Surfarina	Muscaredda	Invernale	Estiva
<i>Minerali</i>					
<i>(Mg/100g, dw)</i>					
Na	80.28 ± 10.91 ^a	79.28 ± 10.32 ^a	79.93 ± 9.56 ^a	80.89 ± 0.69*	110.05 ± 0.81*
Mg	241.16 ± 43.12 ^a	247.37 ± 40.12 ^a	252.22 ± 48.24 ^a	210.06 ± 12.61*	283.77 ± 11.96*
K	5785.83 ± 105.04 ^a	6736.62 ± 93.63 ^a	5745.84 ± 100.78 ^a	4899.25 ± 95.40*	6612.95 ± 83.81*
Ca	4876.15 ± 87.99 ^a	4941.33 ± 101.02 ^a	5932.57 ± 95.65 ^b	4780.31 ± 95.40*	5041.47 ± 91.43*
<i>Elementi in traccia (Mg/Kg, dw)</i>					
Mn	45.12 ± 6.21 ^a	57.32 ± 4.26 ^b	55.76 ± 5.19 ^{a, b}	53.56 ± 11.01	52.33 ± 9.08
Fe	17.09 ± 3.1 ^a	16.63 ± 2.5 ^a	15.82 ± 2.7 ^a	14.21 ± 1.50*	18.80 ± 0.96*
Zn	13.23 ± 2.17 ^a	11.86 ± 1.61 ^a	7.87 ± 0.59 ^b	16.12 ± 1.86*	5.54 ± 1.02*
Ni	0.02 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.01 ^a	0.03 ± 0.01 ^a	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Cr	0.03 ± 0.01 ^a	0.03 ± 0.01 ^a	0.03 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01
As	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Cd	0.02 ± 0.01 ^a	0.03 ± 0.01 ^a	0.01 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Pb	0.02 ± 0.00 ^a	0.02 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Hg	0.03 ± 0.01 ^a	0.03 ± 0.02 ^a	0.03 ± 0.01 ^a	0.02 ± 0.00	0.04 ± 0.00

Tabella 4: Minerali (mg/100 g, dw) e oligoelementi (mg/Kg, dw) di nopal siciliano provenienti da diverse cultivar di *O. ficus-indica* e bonificati dalla potatura invernale ed estiva. I dati sono espressi come media ± deviazione standard di 12 campioni per sito e come media ± deviazione standard di 18 campioni per stagione, in cui ogni campione è stato analizzato tre volte. LOQ di As = 0,246 µg/Kg. A seconda della cultivar: diverse lettere in apice (a–c) nella stessa riga indicano valori significativamente diversi ($p < 0,05$ secondo il test HSD post hoc di Tukey); le stesse lettere in apice nella stessa riga indicano valori non significativamente diversi ($p > 0,05$ secondo il test HSD post hoc di Tukey). A seconda della stagione di potatura: *indica valori significativamente diversi ($p < 0,05$ secondo il test t di Student).

6.2.3.5. Polifenoli

I singoli polifenoli del nopal siciliano sono riportati nella Tabella 5. Un totale di 17 composti -tra cui 10 acidi fenolici e 7 flavonoidi- sono stati identificati e quantificati in modo affidabile in tutti i campioni con l'aiuto di standard di riferimento. Nel complesso, il contenuto di composti fenolici è stato influenzato sia dalla cultivar che dalla stagione di potatura, con un'influenza più pronunciata della stagione di potatura. Sebbene non statisticamente significativi ($p > 0,05$), i campioni di Muscaredda cv. ha mostrato il più alto contenuto di polifenoli indagati (9,05 g/Kg), con flavonoidi (4,85 g/Kg) rivelati a livelli più elevati rispetto agli acidi fenolici (4,20 g/Kg). Il contenuto più basso di polifenoli è invece stato riscontrato nel nopal da Sanguigna cv. (7,91 g/Kg), con gli acidi fenolici rivelati (4,10 g/Kg) più abbondanti dei flavonoidi rilevati (3,81 g/Kg). Tra gli acidi fenolici, gli acidi p-cumarico (1,03–1,33 g/Kg, $p < 0,05$), ferulico (1,24–2,33 g/Kg, $p < 0,05$) e sinapico (730,05–916,22 mg/Kg, $p > 0,05$) erano gli acidi fitochimici trovati ai livelli più alti per ogni cultivar studiata. Considerando i flavonoidi, kaempferol-3-O-rutinoside (872,42–1110,69 mg/Kg, $p < 0,05$), isorhamnetin-3-O-rutinoside (1,02–1,33 g/Kg, $p > 0,05$) e kaempferol (1,21–1,90 g /Kg, $p < 0,05$) sono stati rilevati alle quantità più elevate in tutti i campioni (Tabella 5). Rispetto alla stagione della potatura, l'estate ha fornito al nopal un contenuto di polifenoli significativamente più elevato rispetto all'inverno (10,00 vs. 8,06 g/Kg, $p < 0,05$). In particolare, la stagione della potatura ha

avuto un effetto maggiore sugli acidi fenolici (estate: 5,36 g/Kg; inverno: 4,25 g/Kg, $p < 0,05$) che sui flavonoidi (estate: 4,64 g/Kg; inverno: 3,80 g/Kg, $p > 0,05$). Analogamente a quanto discusso per la cultivar, gli acidi fenolici più abbondanti erano p-cumarico (1,09–1,45 g/Kg, $p < 0,05$), ferulico (1,96–2,09 g/Kg, $p > 0,05$) e sinapico (654,07–1019,00 mg/Kg, $p < 0,05$) acidi; considerando che kaempferol-3-O-rutinoside (898,69–1031,33 mg/Kg, $p < 0,05$) e isorhamnetin-3-O-rutinoside (1,00–1,03 g/Kg, $p > 0,05$) e kampferolo (1,37–1,69 g/Kg, $p < 0,05$) rappresentavano i flavonoidi più concentrati (Tabella 5). Nel complesso, il nopal siciliano essiccato al sole è risultato una preziosa fonte di polifenoli caratterizzati da una rilevante attività biologica. Secondo la letteratura, fornirebbe una maggiore quantità di polifenoli, soprattutto in termini di acidi fenolici, rispetto ad altre matrici siciliane commestibili, come Pistacia e olio extravergine di oliva (Saitta *et al.*, 2009 e 2014). Per quanto a conoscenza degli autori, il nopal secco siciliano (*O. ficus-indica*) non ha ancora delucidato in modo esaustivo i singoli polifenoli. infatti, Rocchetti *et al.*, (2018) hanno quantificato le classi di fenolici, anziché singoli composti, del nopal siciliano fresco in termini di equivalenti per la relativa classe fenolica e, per evidenti ragioni, hanno ottenuto risultati non confrontabili. In un altro studio, solo 7 composti, inclusi 3 acidi fenolici e 4 flavonoidi, sono stati determinati nel nopal siciliano omogeneizzato e liofilizzato a livelli molto inferiori rispetto a quelli ottenuti nel presente studio. Pochi studi sono stati invece

dedicati alla caratterizzazione del profilo polifenolico del nopal essiccato di origine messicana e spagnola. Figueroa-Perez *et al.*, (2018) hanno rivelato 15 acidi fenolici e 13 flavonoidi in nopal (*O. ficus-indica*, Milpa Alta cv.) trattati mediante essiccazione per convezione e hanno scoperto che il profilo era influenzato dalla fase di maturità di cladodi. È interessante notare che molti di questi composti (ad esempio acido p-cumarico, acido 4-idrossibenzoico, acido ferulico, rutina, kaempferol-3-O-rutinoside e isorhamnetin-3-O-rutinoside ecc.) sono stati rilevati anche nel nopal siciliano, anche se a livelli molto più bassi. Guevara-Figueroa *et al.* (2010) hanno affermato che il profilo fenolico del nopal messicano è stato influenzato dalla cultivar. Hanno evidenziato pochi acidi fenolici in quantità inferiori a quelle trovate nel nostro studio (es. acido 4-idrossibenzoico: 5,0–47,2 mg/Kg; acido ferulico: 5,6–347,7 mg/Kg) e flavonoidi, come kaempferol-3-O-rutinoside e isorhamnetin-3-O-rutinoside, a contenuti altamente variabili (rispettivamente, 28,9–1465,0 mg/Kg e 197,1–1371,0 mg/Kg). L'opez-Palacios e Peña-Valdivia (2020) hanno dimostrato che i singoli polifenoli del nopal liofilizzato hanno mostrato di essere influenzati anche dalle specie *Opuntia*. In particolare, il nopal messicano di *O. ficus-indica* era caratterizzato da diversi acidi fenolici e flavonoidi a livelli inferiori rispetto alle controparti osservate in questo studio. Ad esempio, gli acidi ferulico gallico, caffeico e clorogenico erano compresi tra 5 e 38,96 mg/Kg; mentre l'apigenina e la quercetina erano rispettivamente 0,65 mg/Kg e 15,49 mg/Kg.

Polifenoli	λ_{max} (nm)	[M- H] ⁻ (m/z)	Cultivar			Stagionalità		
			Sanguigna	Surfarina	Muscaredda	Invernale	Estiva	
Acido gallico	214,270	169	84.68 ± 11.86 ^a	158.99 ± 20.39 ^b	119.44 ± 13.08 ^c	82.80 ± 12.62*	125.28 ± 21.31*	±
Acido protocatecuico	218,260,295	153	100.60 ± 17.28 ^a	59.35 ± 12.25 ^b	92.01 ± 9.86 ^a	69.08 ± 9.44*	105.56 ± 20.58*	±
Acido 4-idrossibenzoico	255	137	116.81 ± 17.94 ^a	128.66 ± 44.89 ^a	159.56 ± 38.71 ^a	106.85 ± 18.13*	163.17 ± 29.14*	±
Acido vanillico	220,260,295	167	39.72 ± 5.05 ^a	44.09 ± 8.16 ^a	41.94 ± 7.53 ^a	42.24 ± 8.95	41.58 ± 4.07	
Acido siringico	220,275	197	66.94 ± 15.71 ^a	64.44 ± 29.82 ^a	67.64 ± 32.68 ^a	44.18 ± 9.24*	88.50 ± 7.95*	
Acido clorogenico	324	353	27.48 ± 7.73 ^a	39.12 ± 11.22 ^a	35.39 ± 12.68 ^a	26.37 ± 7.02	41.62 ± 8.69	
Acido caffeico	210,272,328	179	180.61 ± 23.21 ^a	173.32 ± 21.45 ^a	240.24 ± 29.04 ^b	175.45 ± 35.24	220.66 ± 42.25	
Acido p-cumarico	225,310	163	1061.09 ± 129.76 ^a	1032.50 ± 141.53 ^a	1337.27 ± 94.87 ^b	1095.29 ± 107.36*	1458.62 ± 207.85*	±
Acido ferulico	230,320	193	1505.95 ± 365.82 ^a	2339.95 ± 385.36 ^b	1243.62 ± 402.38 ^a	1961.99 ± 524.21	2097.68 ± 560.15	±
Acido sinapico	235,322	223	916.22 ± 230.85 ^a	730.05 ± 324.14 ^a	863.34 ± 135.36 ^a	654.07 ± 161.71*	1019.00 ± 121.16*	±
Acidi fenolici totali	-	-	4100.10 ± 768.17 ^a	4770.47 ± 670.12 ^a	4200.45 ± 841.40 ^a	4258.31 ± 386.73*	5361.66 ± 479.86*	±
Rutina	257,354	609	61.62 ± 6.23 ^a	93.30 ± 5.34 ^b	37.58 ± 5.97 ^c	60.59 ± 24.58	67.74 ± 26.02	
Kaempferol-3-O-rutinoside	266,300,346	593	911.91 ± 36.62 ^a	872.42 ± 64.28 ^a	1110.69 ± 106.25 ^b	898.69 ± 80.33	1031.33 ± 153.32	±
Isorhamnetina-3-O-rutinoside	250,270,342	623	1022.69 ± 134.21 ^a	1114.98 ± 216.89 ^a	1339.97 ± 210.76 ^a	1004.09 ± 135.65	1314.34 ± 179.29	±
Quercetina	205,254,370	301	142.12 ± 13.77 ^a	94.99 ± 3.86 ^b	104.81 ± 14.28 ^b	107.88 ± 19.63	120.07 ± 27.56	
Luteolina	365	285	82.35 ± 8.19 ^a	101.57 ± 7.82 ^a	105.44 ± 12.16 ^a	89.92 ± 11.33	102.98 ± 13.40	
Apigenina	268,334	269	377.67 ± 28.74 ^a	237.58 ± 31.39 ^b	251.97 ± 22.97 ^b	269.04 ± 69.55	309.10 ± 71.45	
Kaempferol	266,368	285	1212.09 ± 175.70 ^a	1501.66 ± 192.50 ^a	1901.64 ± 192.68 ^b	1379.67 ± 306.19	1697.25 ± 317.14	±
Flavonoidi totali	-	-	3810.44 ± 325.60 ^a	4016.49 ± 512.15 ^{a, b}	4852.09 ± 560.93 ^{a, b}	3809.88 ± 441.58	4642.80 ± 561.84	±
Polifenoli totali	-	-	7910.54 ± 1101.74 ^a	8786.96 ± 1148.33 ^a	9052.54 ± 1298.18 ^a	8068.19 ± 898.37*	10004.46 ± 835.31*	±

Tabella 5: Polifenoli singoli (mg/Kg, dw) di nopal siciliano da diverse cultivar di *O. ficus-indica* e dalla potatura invernale ed estiva. I dati sono espressi come media ± deviazione standard di 12 campioni per sito e come media ± deviazione standard di 18 campioni per stagione, in cui ogni campione è stato analizzato tre volte. A seconda della cultivar: diverse lettere in apice (a–c) nella stessa riga indicano valori significativamente diversi ($p < 0,05$ secondo il test HSD post hoc di Tukey); le stesse lettere in apice nella stessa riga indicano valori non significativamente diversi ($p > 0,05$ secondo il test HSD post hoc di Tukey).

A seconda della stagione di potatura: *indica valori significativamente differenti ($p < 0,05$ secondo il test t di Student).

6.2.4. Conclusioni

Nel presente studio, il nopal essiccato siciliano (*O. ficus-indica*) è stato caratterizzato chimicamente in relazione alla cultivar e alla stagione di potatura con l'obiettivo finale di valorizzarne le potenzialità in ambito alimentare e nutraceutico. È stato sottolineato che il nopal essiccato siciliano aveva un profilo fitochimico unico, non paragonabile al nopal proveniente da altri paesi produttori rilevanti, come Messico e Spagna. Inoltre, i macro e micronutrienti del nopal siciliano hanno dimostrato di essere influenzati sia dalla cultivar che dalla stagione della potatura, con, tuttavia, l'influenza della stagione della potatura più pronunciata. Complessivamente nopal di Muscaredda cv. era più prezioso del nopal di Sanguigna e Surfarina cvs., a causa dei più alti livelli di proteine, carboidrati -rappresentati da zuccheri come glucosio, acido galatturonico e galattosio-alcuni acidi grassi (cioè acido caprilico e linoleico) e polifenoli. D'altra parte, la stagione della potatura ha avuto un notevole impatto sulla composizione prossima e sulle impronte chimiche dei campioni studiati. Infatti, il TDF, i minerali e la maggior parte degli acidi fenolici e dei flavonoidi, erano sostanzialmente più abbondanti nel nopal dalla stagione estiva; al contrario, i carboidrati totali - e la maggior parte dei loro zuccheri monomerici -, i lipidi - e la maggior parte degli AF - sono stati rivelati a livelli più elevati nel nopal dalla stagione invernale.

6.2.5. Bibliografia

- Albergamo, A., Mottese, A.F., Bua, G.D., Caridi, F., Sabatino, G., Barrega, L., Costa, R., Dugo, G., 2018. Discrimination of the Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L., cv. Muscaredda) according to the provenance by testing unsupervised and supervised chemometrics. *J. Food Sci.* 83, 2933–2942.
- Albergamo, A., Costa, R., Bartolomeo, G., Rando, R., Vadal`a, R., Nava, V., Gervasi, T., Toscano, G., German`o, M.P., D'Angelo, V., Ditta, F., Dugo, G., 2020. Grape water: reclaim and valorization of a by-product from the industrial cryoconcentration of grape (*Vitis vinifera*) must. *J. Sci. Food Agric.* 100, 2971–2981.
- Albergamo, A., Bartolomeo, G., Messina, L., Rando, R., Bella, G.D., 2021. Traceability of *Opuntia* spp. In: Ramadan, M.F., Ayoub, T.E.M., Rohn, S. (Eds.), *Opuntia Spp.: Chemistry, Bioactivity, and Industrial Applications*. Springer, Cham (CH), pp. 457–482.
- Andreu, L., Nuncio-J`auregui, N., Carbonell-Barrachina, `A.A., Legua, P., Hern´andez, F., 2018. Antioxidant properties and chemical characterization of Spanish *Opuntia ficus-indica* Mill. Cladodes and fruits. *J. Sci. Food Agric.* 98, 1566–1573.
- Andreu-Coll, L., Cano-Lamadrid, M., Sendra, E., Carbonell-Barrachina, A., Legua, P., Hern´andez, F., 2019. Fatty acid profile of fruits (pulp and peel) and cladodes (young and old) of prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] from six Spanish cultivars. *J. Food Compos. Anal.* 84, 103294.
- Angulo-Bejarano, P.I., Mart´inez-Cruz, O., Paredes-L´opez, O., 2014. Phytochemical content, nutraceutical potential and biotechnological applications of an ancient Mexican plant: nopal (*Opuntia ficus-indica*). *Curr. Res. Nutr. Food Sci. J.* 10, 196–217.
- AOAC, 2012. *AOAC Official Methods of Analysis*, 18th ed. Association of Official Analytical Chemists Arlington., Gaithersburg, MD, USA.
- Baldini, M., Fabietti, F., Giammarioli, S., Onori, R., Orefice, L., Stacchini, A., 1996. Analytical methods used in food chemical control. *Rapporti ISTISAN 96/34* 265, 66–67.
- Ben Amor, N., Nava, V., Albergamo, A., Potort`ı, A.G., Lo Turco, V., Ben Mansour, H., Di Bella, G., 2021. Tunisian essential oils as potential food antimicrobials and antioxidants and screening of their element profile. *Eur. Food Res. Technol.* [https:// doi.org/10.1007/s00217-021-03704-2](https://doi.org/10.1007/s00217-021-03704-2).
- Ciriminna, R., Morreale, V., Pecoraino, M., Pagliaro, M., 2019. Solar air drying for innovative *Opuntia ficus-indica* cladode dehydration. *4Open* 2, 1–6.
- Contreras-Padilla, M., Perez-Torrero, E., Hern´andez-Urbiola, M.I., Hern´andez-Quevedo, G., del Real, A., Rivera-Mu˜noz, E.M., Rodr´ıguez-García, M.E., 2011. Evaluation of oxalates and calcium in nopal pads (*Opuntia ficus-indica* var. *redonda*) at different maturity stages. *J. Food Compos. Anal.* 24, 38–43.
- Di Bella, G., Lo Turco, V., Potort`ı, A.G., Bua, G.D., Fede, M.R., Dugo, G., 2015. Geographical discrimination of Italian honey by multi-element analysis with a chemometric approach. *J. Food Compos. Anal.* 44, 25–35.

- Di Bella, G., Naccari, C., Bua, G.D., Rastrelli, L., Lo Turco, V., Potortì, A.G., Dugo, G., 2016. Mineral composition of some varieties of beans from Mediterranean and Tropical areas. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 67, 239–248.
- Di Bella, G., Licata, P., Potortì, A.G., Crupi, R., Nava, V., Qada, B., Bartolomeo, G., Dugo, G., Lo Turco, V., 2020. Mineral content and physico-chemical parameters of honey from North regions of Algeria. *Nat. Prod. Res.* <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1791110>.
- El-Mostafa, K., El Kharrassi, Y., Badreddine, A., Andreoletti, P., Vamecq, J., El Kebbaj, M., Latruffe, N., Lizard, G., Nasser, B., Cherkaoui-Malki, M., 2014. Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules* 19, 14879–14901.
- European Commission, 2006. Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods. *Official Journal of European Union* 404, 9–25.
- Figueroa-Pérez, M.G., Pérez-Ramírez, I.F., Paredes-López, O., Mondragón-Jacobo, C., Reynoso-Camacho, R., 2018. Phytochemical composition and in vitro analysis of nopal (*O. ficus-indica*) cladodes at different stages of maturity. *Int. J. Food Prop.* 21, 1728–1742.
- Gervasi, T., Pellizzeri, V., Calabrese, G., Di Bella, G., Cicero, N., Dugo, G., 2018. Production of single cell protein (SCP) from food and agricultural waste by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Prod. Res.* 32, 648–653.
- Ginestra, G., Parker, M.L., Bennett, R.N., Robertson, J., Mandalari, G., Narbad, A., Lo Curto, R.B., Bisignano, G., Faulds, C.B., Waldron, K.W., 2009. Anatomical, chemical and biochemical characterization of cladodes from prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.]. *J. Agric. Food Chem.* 57, 10323–10330.
- Guevara-Arauza, J.C., Paz, J.D.J.´O., Mendoza, S.R., Guerra, R.E.S., Maldonado, L.M.T.P., González, D.J.P., 2011. Biofunctional activity of tortillas and bars enhanced with nopal. Preliminary assessment of functional effect after intake on the oxidative status in healthy volunteers. *Chem. Cent. J.* 5, 1–10.
- Guevara-Figueroa, T., Jiménez-Islas, H., Reyes-Escogido, M.L., Mortensen, A.G., Laursen, B.B., Lin, L.W., De León-Rodríguez, A., Fomsgaard, I.S., de la Rosa, A.P.B., 2010. Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia spp.*). *J. Food Compos. Anal.* 23, 525–532.
- Hernández-Urbiola, M.I., Contreras-Padilla, M., Pérez-Torrero, E., Hernández-Quevedo, G., Rojas-Molina, J.I., Cortes, M.E., Rodríguez-García, M.E., 2010. Study of nutritional composition of nopal (*Opuntia ficus indica* cv. Redonda) at different maturity stages. *Open Nutr. J.* 4, 11–16.
- Higgins, J.A., 2012. Whole grains, legumes, and the subsequent meal effect: implications for blood glucose control and the role of fermentation. *J. Nutr. Metab.* <https://doi.org/10.1155/2012/829238>.
- How, Y.K., Siow, L.F., 2020. Effects of convection-, vacuum- and freeze-drying on antioxidant, physicochemical properties, functional properties and storage

- stability of stink bean (*Parkia speciosa*) powder. *J. Food Sci. Technol.* 57, 4637–4648.
- Lanuzza, F., Occhiuto, F., Monforte, M.T., Tripodo, M.M., D'Angelo, V., Galati, E.M., 2017. Antioxidant phytochemicals of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Cladodes with potential anti-spasmodic activity. *Pharmacogn. Mag.* 13, S424.
 - Lo Turco, V., Potortì, A.G., Rando, R., Ravenda, P., Dugo, G., Di Bella, G., 2016. Functional properties and fatty acids profile of different beans varieties. *Nat. Prod. Res.* 30, 2243–2248.
 - Lo Turco, V., Potortì, A.G., Tropea, A., Dugo, G., Di Bella, G., 2020. Element analysis of dried figs (*Ficus carica* L.) from the Mediterranean areas. *J. Food Compos. Anal.* 90, 103503.
 - L'opez-Cervantes, J., S'anchez-Machado, D.I., Campas-Baypoli, O.N., Bueno-Solano, C., 2011. Functional properties and proximate composition of cactus pear cladodes flours. *Food Sci. Technol.* 31, 654–659.
 - L'opez-Palacios, C., Pe~na-Valdivia, C.B., 2020. Screening of secondary metabolites in cladodes to further decode the domestication process in the genus *Opuntia* (Cactaceae). *Planta* 251, 1–14.
 - Potortì, A.G., Di Bella, G., Lo Turco, V., Rando, R., Dugo, G., 2013. Non-toxic and potentially toxic elements in Italian donkey milk by ICP-MS and multivariate analysis. *J. Food Compos. Anal.* 31, 161–172.
 - Potortì, A.G., Di Bella, G., Mottese, A., Bua, G.D., Fede, M.R., Sabatino, G., Salvo, A., Somma, R., Dugo, G., Lo Turco, V., 2018. Traceability of Protected Geographical Indication (PGI) Interdonato lemon pulps by chemometric analysis of the mineral composition. *J. Food Compos. Anal.* 69, 122–128.
 - Potortì, A.G., Bua, G.D., Lo Turco, V., Tekaya, A.B., Beltifa, A., Ben Mansour, H., Dugo, G., Di Bella, G., 2020. Major, minor and trace element concentrations in spices and aromatic herbs from Sicily (Italy) and Mahdia (Tunisia) by ICP-MS and multivariate analysis. *Food Chem.* <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126094>.
 - Potortì, A.G., Lo Turco, V., Di Bella, G., 2021. Chemometric analysis of elements content in Algerian spices and aromatic herbs. *LWT-Food Science and Technology* 138, 110643.
 - Potortì, A.G., Lo Turco, V., Saitta, M., Bua, G.D., Tropea, A., Dugo, G., Di Bella, G., 2017. Chemometric analysis of minerals and trace elements in Sicilian wines from two different grape cultivars. *Nat. Prod. Res.* 31, 1000–1005.
 - Procacci, S., Boj'orquez-Quintal, E., Platamone, G., Maccioni, O., Lo Vecchio, V., Morreale, V., Alisi, C., Balducchi, R., Bacchetta, L., 2021. *Opuntia ficus-indica* pruning waste recycling: recovery and characterization of mucilage from cladodes. *Nat. Resour.* 12, 91–107.
 - Ram'irez-Moreno, E., Marques, C.D., S'anchez-Mata, M.C., Go~ni, I., 2011. In vitro calcium bioaccessibility in raw and cooked cladodes of prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* L. Miller). *LWT-Food Science and Technology* 44, 1611–1615.

- Rocchetti, G., Pellizzoni, M., Montesano, D., Lucini, L., 2018. Italian *Opuntia ficus-indica* cladodes as rich source of bioactive compounds with health-promoting properties. *Foods* 7, 24.
- Rodríguez-García, M.E., de Lira, C., Hernández-Becerra, E., Cornejo-Villegas, M.A., Palacios-Fonseca, A.J., Rojas-Molina, I., Reynoso, R., Quintero, L.C., Del-Real, A., Zepeda, T.A., Muñoz-Torres, C., 2007. Physicochemical characterization of nopal pads (*Opuntia ficus-indica*) and dry vacuum nopal powders as a function of the maturation. *Plant Foods Hum. Nutr.* 62, 107–112.
- Saitta, M., Salvo, F., Di Bella, G., Dugo, G., La Torre, G.L., 2009. Minor compounds in the phenolic fraction of virgin olive oils. *Food Chem.* 112, 525–532.
- Saitta, M., La Torre, G.L., Potortì, A.G., Di Bella, G., Dugo, G., 2014. Polyphenols of pistachio (*Pistacia vera* L.) oil samples and geographical differentiation by principal component analysis. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 91, 1595–1603.
- Santos-Zea, L., Gutiérrez-Urbe, J.A., Serna-Saldivar, S.O., 2011. Comparative analyses of total phenols, antioxidant activity, and flavonol glycoside profile of cladode flours from different varieties of *Opuntia* spp. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 59, 7054–7061.
- Sdiri, W., Chehab, H., Reyns, T., Van Loco, J., Mechri, B., Boujnah, D., Bua, G.D., Ben Mansour, H., Di Bella, G., 2018. Incidence of dairy wastewater on morphological and physiological compartment of Chemlali and Chetoui olive. *Water Resour. Ind.* 20, 29–36.
- Sdiri, W., Ben Mansour, H., Albergamo, A., Di Bella, G., 2020a. Effectiveness of dairy treated wastewater and different irrigation systems on the growth, biomass and fruiting of a Tunisian olive orchard (*Olea europaea* L., cv Chemlali). *Nat. Prod. Res.* 34, 183–186.
- Sdiri, W., Dabbou, S., Chehab, H., Selvaggini, R., Servili, M., Di Bella, G., Ben Mansour, H., 2020b. Quality characteristics and chemical evaluation of Chemlali olive oil produced under dairy wastewater irrigation. *Agric. Water Manag.* 236, 106–124.
- Snyman, H.A., 2013. Growth rate and water-use efficiency of cactus pears *Opuntia ficus-indica* and *O. Robusta*. *Arid. Land Res. Manag.* 27, 337–348.
- Sottile, F., Modica, A., Rosselli, S., Catania, C.A., Cavallaro, G., Lazzara, G., Bruno, M., 2019. Hand-made paper obtained by green procedure of cladode waste of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. From Sicily. *Nat. Prod. Res.* 35, 359–368.
- Timpanaro, G., Foti, V.T., 2014. The structural characteristics, economic performance and prospects for the Italian cactus pear industry. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 16, 32–50.
- Zenteno-Ramírez, G., Juárez-Flores, B.I., Aguirre-Rivera, J.R., Ortiz-Pérez, M.D., Zamora-Pedraza, C., Rendón-Huerta, J.A., 2015. Evaluation of sugars and soluble fiber in the juice of prickly pear varieties (*Opuntia* spp.). *Agrociencia* 48, 141–152.

- Zouhri, M.A., Anouar, A., 2015. Biofloculants extraction from Cactaceae and their application in treatment of water and wastewater. Journal of Water Processing Engineering 7, 306–313.

6.3. Caratterizzazione chimica di diversi prodotti di *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Tunisino

6.3.1. Introduzione

Con l'aumento demografico sia gli organi politici che i consumatori sono sempre più consapevoli che le risorse alimentari devono essere ottimizzate il più possibile garantendo il loro uso sostenibile sia a livello industriale che domestico, sfruttando al contempo i loro potenziali benefici per la salute. Di conseguenza, sono state recentemente create sinergie tra politiche e interventi per ridurre l'impatto ambientale delle filiere agroalimentari e promuovere il benessere e la salute dei consumatori attraverso modelli alimentari adeguati (Sàez *et al.*, 2013). Riconosciuto come patrimonio culturale immateriale con stili di vita e abitudini alimentari peculiari, il Mediterraneo la dieta potrebbe affrontare problemi sia di salute che ambientali, poiché è essenzialmente basata su un maggiore utilizzo di cibi locali e di stagione a base vegetale e sul minor consumo di prodotti animali. Infatti, da un lato, fornisce fibre e minerali preziosi, un elevato rapporto grassi monoinsaturi-saturi, e anche un equilibrato rapporto n-6/n-3 (Albergamo *et al.*, 2021; Potortì *et al.*, 2020) che, secondo la crescente evidenza scientifica, sarebbe responsabile di un minor

rischio di mortalità cardiovascolare e malattie coronariche, diabete, sindrome metabolica e alcune malattie neurodegenerative e tumori (Serra-Majem *et al.*, 2020). La dieta mediterranea, invece, è caratterizzata da un ridotto impatto ambientale, in termini di produzione di rifiuti ed emissioni, e preserva la biodiversità del bacino del Mediterraneo stesso (Pairotti *et al.*, 2015; Burlingame *et al.*, 2011). Il fico d'India si è ben adattato al modello della dieta mediterranea affermandosi inizialmente come pianta selvatica e, successivamente, come coltura per un'agricoltura orientata al mercato e anche per sistemi agricoli sostenibili (Albergamo *et al.*, 2018; Albergamo *et al.*, 2021). Dal punto di vista del marketing, il fico d'India è riconosciuto per la produzione stagionale e redditizia di frutti carnosì - detti fichi d'India - caratterizzati da proprietà organolettiche accettabili, ed eccellenti proprietà nutritive e salutistiche dovute alla presenza di fibre, minerali, vitamine e composti antiossidanti (es., fenoli, flavonoidi, betaxantina e betacianina). Nel complesso, la frutta e i prodotti derivati, come succhi, marmellate e sciroppi, sono sempre più apprezzati, contribuendo così ad arricchire la già variegata dieta mediterranea (Mouas *et al.*, 2021; Piga *et al.*, 2004). In termini di sostenibilità, sono stati dedicati molti studi alla bonifica dei rifiuti come cladodi, bucce di frutta e semi, che, oltre ad essere già stati utilizzati nella medicina popolare per le loro proprietà nutritive (cioè effetti antiossidanti) e attività benefiche (effetti antinfiammatori ipoglicemizzanti, neuroprotettivi ecc.) (Kaur *et al.*, 2012) hanno un

notevole impatto sulla catena di approvvigionamento di *Opuntia* (Di Bella *et al.*, 2021; Cardador-Martínez *et al.*, 2011). Infatti, dopo il periodo della potatura, vengono prodotte circa 6–8 tonnellate/ettaro di cladodi che non sono facilmente smaltibili e rappresentano uno dei principali costi per gli agricoltori (Procacci *et al.*, 2021); mentre bucce e semi, che derivano dalla lavorazione industriale costituiscono rispettivamente il 45–55% e il 2–10% del peso totale del frutto, e finiscono in discarica o adibiti all'alimentazione animale (Ciriminna *et al.*, 2019). La possibilità di trasformare tali rifiuti in sottoprodotti ad alto valore aggiunto ha comportato non solo una riduzione dei costi di gestione delle colture, ma anche una diversificazione del reddito per gli agricoltori. Infatti, il nopal è già stato riutilizzato in una varietà di prodotti, come alimenti fortificati, cosmetici, biopolimeri e agenti flocculanti per il trattamento dell'acqua e delle acque reflue (Patel *et al.*, 2019; López-García *et al.*, 2017). Le bucce sono state valorizzate dalla produzione di alimenti fortificati, nutraceutici, farmaceutici, coloranti naturali e nanoparticelle di ossido di zinco (Ciriminna *et al.*, 2019; Kamaraj *et al.*, 2020; Scarano *et al.*, 2020) mentre i semi sono stati utilizzati per la produzione di un olio commestibile ad alto grado di insaturazione (El Mannoubi *et al.*, 2009) nonché come farina proteica utilizzata per arricchire il pane e gli estrusi a base di riso (Ali *et al.*, 2020; Ryan *et al.*, 2018). In ogni caso, la conoscenza preventiva della pletora di fitomolecole che costituiscono tali sottoprodotti continua ad essere obbligatoria

per spiegare le loro caratteristiche tecnologiche, funzionali e salutari e, di conseguenza, per ricercare e valorizzare i loro potenziali riutilizzi. In questo contesto, lo scopo di questo studio è stato quello di caratterizzare chimicamente il nopal ed il frutto-polpa, buccia e semi - da *O. ficus-indica* tunisino, nel tentativo di sfruttarne al massimo le potenzialità nel contesto del modello di dieta mediterranea.

6.3.2. Materiali e metodi

6.3.2.1. Campioni

Cladodi e frutti di *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill., sono stati raccolti a mano da piantagioni naturalizzate situate nell'area costiera del governo di Mahdia (Tunisia nord-orientale) nell'agosto 2020. L'identificazione tassonomica della specie è stata eseguita dai botanici dell'Università di Monastir (Monastir, Tunisia). Nello specifico, sono stati raccolti, lavati e trattati tre campioni di nopal fresco, in cui ogni campione era costituito da n= 10 cladodi adulti con una lunghezza di circa 50 cm, e tre campioni di frutti freschi, ciascuno comprendente n= 15 frutti maturi a polpa rossa (Figura 1). Ogni campione di frutta è stato ulteriormente sbucciato e la polpa è stata separata manualmente dai semi per ottenere rispettivamente tre campioni di polpa, tre campioni di bucce e tre campioni di semi (Figura 1).

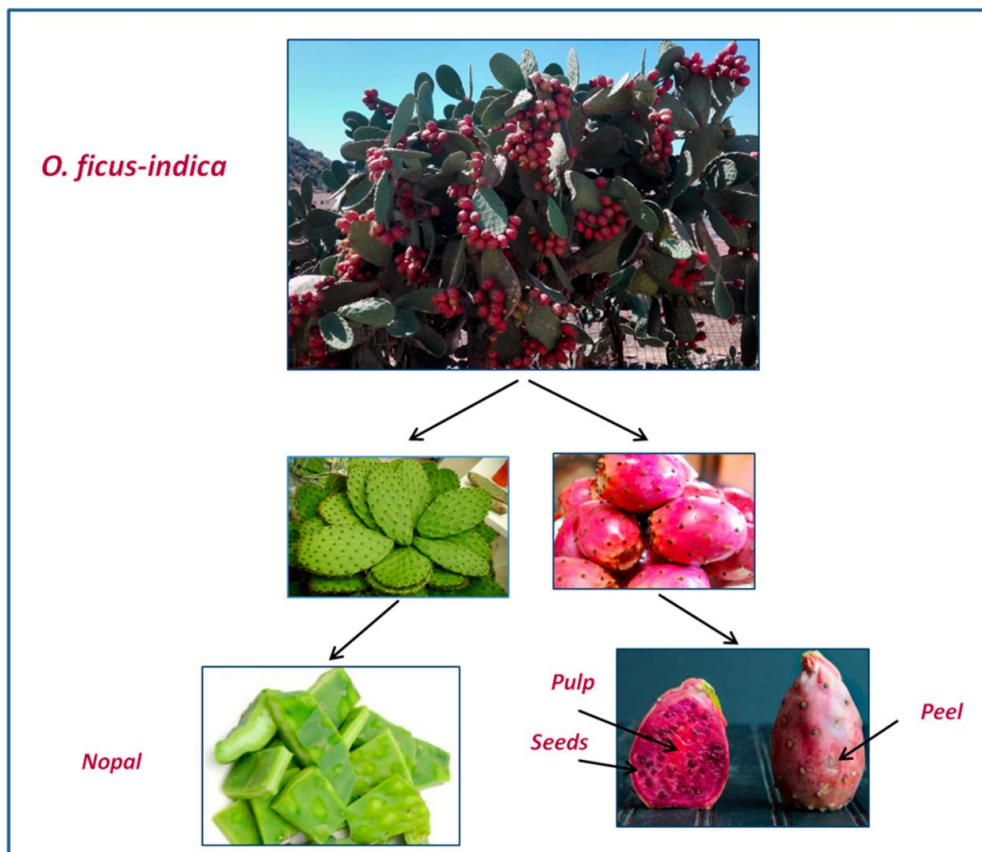


Figura 1: Frutti e cladodi di *O. ficus-indica* provenienti da Mahdia (Tunisia) utilizzati per il presente studio.

Quindi, campioni freschi di cladodi, polpa, buccia e semi sono stati tagliati separatamente in piccoli pezzi (semi esclusi) e liofilizzati in un liofilizzatore Alpha-LD Plus (Martin Christ, Osterode, Germania), per 72 ore a $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizzando una pressione della camera di 0,110 mbar. Ogni campione essiccato è stato pesato, macinato (Retsch Grindomix GM200, Retsch GmbH, Haan, Germania) e passato attraverso un setaccio da 20 mm per ottenere polveri fini. Il contenuto medio di umidità rimosso dai campioni di cladodi, polpa, buccia e semi era rispettivamente dell'85, 75, 73 e 5%. I campioni sono stati conservati a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ fino all'analisi.

6.3.2.2. Reagenti

Per la proteina grezza, il catalizzatore Kjeldahl è stato reperito da Carlo Erba (Milano, Italia). I solventi, inclusi n-esano e n-eptano (grado reagente) e acetonitrile e metanolo (grado HPLC), provenivano da J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Il perossido di idrogeno (30% v/v) e l'acido nitrico (65% v/v) (grado di analisi dei metalli in tracce) e l'acqua ultrapura (resistività di 10 mΩ cm) provenivano da Mallinckrodt Baker (Milano, Italia). Gli standard di riferimento degli esteri metilici degli acidi grassi (FAMEs, C4–C24) sono stati acquistati da Supelco (Bellefonte, PA, USA). Le soluzioni madre di vari elementi inorganici (1000 mg/L in 2% HNO₃, ciascuna) sono state fornite da Fluka (Milano, Italia), mentre gli standard di riferimento dei singoli zuccheri e polifenoli sono stati ottenuti da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) ed Extrasynthese (Genay, Francia).

6.3.2.3. Composizione prossimale

La determinazione della composizione prossimale dei diversi campioni di *Opuntia* è stata effettuata secondo i protocolli di analisi ufficiali dell'AOAC (Horwitz *et al.*, 2012). Per ogni campione, la fibra alimentare è stata determinata seguendo il metodo ufficiale AOAC 991.43 e il metodo AACC 32-07.01, utilizzando il kit di test Megazyme (International Ireland Ltd., Wicklow, Irlanda). In breve, due aliquote di campione (1,0 g ciascuna) sono state trattate in parallelo con α -amilasi a 80 ° C e

quindi digerite con proteasi e amiloglucosidasi a 60 ° C. Le soluzioni sono state raffreddate a ~ 40 ° C e trattate con etanolo per precipitare la fibra. I residui sono stati filtrati, lavati con solventi organici, essiccati ed è stato calcolato il peso medio. In questa fase, un residuo è stato incubato a 500°C fino a peso costante (~12 h) per la determinazione delle ceneri, mentre l'altro residuo è stato analizzato per la proteina grezza con il metodo ufficiale AOAC 976.05. In questo caso, il residuo è stato digerito con acido solforico, rame (II) selenite diidrato e solfato di potassio dallo SpeedDigester K-439 (Büchi, Svizzera) e quindi analizzato dal KjelMaster System K-375 dotato di scrubber di gas e vapori (Büchi, Svizzera). La soluzione risultante è stata trattata con idrossido di sodio, per sviluppare ammoniaca. La quantità di azoto è stata valutata mediante titolazione con acido cloridrico e il calcolo della proteina (%) è avvenuto moltiplicando l'azoto (%) per un fattore di conversione di 6,5. Quindi, la fibra alimentare era uguale al peso medio del residuo essiccato meno il peso di proteine e ceneri. Per il grasso totale è stato utilizzato il metodo AOAC 920.39. In breve, un'aliquota del campione (15,0 g) è stata estratta da un apparato Soxhlet con n-eptano per 6 ore. Quindi, l'estratto è stato essiccato mediante un evaporatore rotante (Heidolph Instruments GmbH & Co., Schwabach, Germania) e la resa di estrazione è stata determinata gravimetricamente. L'umidità è stata valutata secondo il metodo AOAC 925.09 essiccando in forno il campione a 110 °C per 4 ore e registrando successivamente la

perdita di peso del campione, mentre i carboidrati totali sono stati calcolati per differenza. Per ogni componente, ogni campione di *Opuntia* è stato analizzato in triplicato.

6.3.2.4. Acidi grassi (FA)

La composizione di FA è stata determinata secondo quanto già riportato da Di Bella et al. (Di Bella *et al.*, 2021). Ogni estratto lipidico ottenuto dall'apparato Soxhlet è stato transesterificato mediante transesterificazione “calda” ed iniettato in un gascromatografo (GC) dotato di iniettore split/splitless e accoppiato ad un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) (Dani Master GC1000, Dani Instrument, Milano, Italia). Per la separazione cromatografica è stata utilizzata una colonna capillare Supelco SLB-IL100 (60 m × 0,25 mm ID, 0,20 µm di spessore del film, Supelco, Sigma Aldrich, USA), con un programma di temperatura del forno da 130 a 210 °C (10 min di mantenimento) a 2 °C/min; temperature dell'iniettore e del rivelatore rispettivamente a 220 e 240 °C; elio (He) ad una velocità lineare di 30 cm/s (costante) e una pressione di testa iniziale di 99,5 kPa e frequenza di campionamento: 12,5 Hz. Altre condizioni sperimentali erano idrogeno gassoso (H₂) 40 mL/min, gas di makeup (He) 30 mL/min e aria 300 mL/min. Il volume di iniezione era di 1 µL, con un rapporto di divisione di 1:100. L'analisi dei dati è stata eseguita dal software strumentale (Clarity Chromatography, v.4.0.2). Le FAME di interesse nutrizionale sono state individuate mediante confronto

diretto con i tempi di ritenzione dei composti di riferimento, mentre l'analisi quantitativa è avvenuta calcolando la percentuale di FAME individuale rispetto all'area totale del cromatogramma. Ogni campione è stato analizzato in triplicato insieme a bianchi analitici. Come già riportato in Dimić *et al.* (2020), la qualità dietetica del grasso proveniente dai (sotto)prodotti di *Opuntia* è stata determinata da tre indici derivati dal relativo profilo FA, come il rapporto tra FA ipocolesterolemici e ipercolesterolemici (H/H):

$$\frac{H}{H} = \frac{C18 : 1 + C18 : 2 + C18 : 3}{C14 : 0 + C16 : 0}$$

l'indice di aterogenicità (AI):

$$AI = \frac{C14 + 4(C16 : 0)}{\sum MUFA + \sum \omega 3 + \sum \omega 6}$$

e indice di trombogenicità (TI):

$$TI = \frac{C14 : 0 + C16 : 0 + C18 : 0}{0.5 (\sum MUFA) + 3 (\sum \omega 3) + 0.5 (\sum \omega 6) + (\sum \omega 3 / \sum \omega 6)}$$

dove C14:0 è acido miristico, C16:0 è acido palmitico, C18:0 è acido stearico, C18:1 è acido oleico, C18:2 è acido linoleico e C18:3 è acido α -linolenico. $\sum MUFA$ è la somma degli acidi grassi monoinsaturi, $\sum \omega-3$ è la somma dei $\omega-3$ FA polinsaturi e $\sum \omega-6$ è la somma dei $\omega-6$ FA polinsaturi. Inoltre, è stato valutato un altro

importante determinante della salute, ovvero il rapporto tra ω -6/ ω -3 FA essenziali (Simopoulos *et al.*, 2022).

6.3.2.5. Elementi minerali

Per ogni (sotto)prodotto di *Opuntia*, un'aliquota del campione (0,5 g) è stata digerita con 2 mL di H₂O₂ e 7 mL di HNO₃ con un sistema di digestione a microonde a vaso chiuso (Ethos 1, Milestone, Bergamo, Italia). È stato adottato un programma di temperatura, composto da 0–200 °C in 10 minuti (passo 1) e 200 °C mantenuti per 15 minuti (passo 2), con una potenza del microonde costante di 1500 W. Lo screening di minerali (es. Na, Mg e K), oligoelementi essenziali (es. Mn, Fe, Cu e Zn) ed elementi potenzialmente tossici (es. Ni, Cr, As, Cd e Pb) è stato eseguito da un quadrupolo ICP-MS (iCAP Q, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), secondo il nostro metodo ottimizzato già utilizzato per un certo numero di matrici vegetali (Potortì *et al.*, 2017; Potortì *et al.*, 2018; Di Bella *et al.*, 2020; Di Bella *et al.*, 2021; Bua *et al.*, 2017; Mottese *et al.*, 2020). Le condizioni strumentali di analisi erano radiofrequenza incidente (rf) potenza 1500 W; portata del gas plasma (Ar) 15 L/min; portata del gas ausiliario (Ar) 0,9 l/min e portata del gas di trasporto (Ar) 1,10 l/min. L'ICP-MS è stato utilizzato con elio come gas della cella di collisione a una velocità di flusso di 4 ml/min ed è stato dotato di una camera di nebulizzazione (2 °C). Il volume di iniezione e la portata di introduzione del campione erano rispettivamente di 200

μL e 1 mL/min. L'acquisizione degli spettri è avvenuta in modalità scansione completa (tempo di permanenza 0,5 o 0,1 s/punto, in base all'analita). L'analisi dei dati è stata eseguita dal software strumentale (Qtegra™ Intelligent Scientific Data Solution). Per ogni campione sono state eseguite misurazioni triplicate insieme a bianchi analitici. Per la quantificazione, sono state create curve di calibrazione esterne a sei punti per ciascun analita (r^2 compreso tra 0,9999 [Mg, K e Cr] e 0,9991 [Cu]). Le prestazioni della procedura ICP-MS sono state valutate con l'aiuto di standard commerciali in termini di linearità, limite di rilevabilità (LOD) e quantificazione (LOQ), variabilità e accuratezza intra e inter-saggio.

6.3.2.6. Zuccheri

Ogni (sotto)prodotto di *Opuntia* è stato sottoposto a screening per gli zuccheri secondo il metodo ISTISAN 96/34 descritto da Baldini *et al.* (1996). In breve, un'aliquota del campione (10,0 g) è stata miscelata con 100 mL di acetonitrile/acqua (60:40, v/v) e agitata, prima, per 30 minuti mediante un bagno ad ultrasuoni e poi per 3 ore mediante un agitatore magnetico. Il supernatante ottenuto è stato filtrato, purificato con una cartuccia Sep-Pak C18 (Waters, Milford, MA, USA) e, analizzato mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiata a un rivelatore di indice di rifrazione (HPLC-RI), impiegando un sistema Shimadzu LC10A (Shimadzu, Kyoto, Giappone) accoppiato a un rivelatore Shimadzu RID-6A RI (Shimadzu, Kyoto, Giappone). La separazione cromatografica è

avvenuta con una colonna a base di propilammina in fase inversa (Supelcosil LC-NH₂, 25 cm × 4,6 mm, 5 μm ID, Supelco, Bellefonte, PA, USA) e una fase mobile costituita da acetonitrile/acqua (50: 50), con una portata di 1 ml/min. Il volume di iniezione e la temperatura del forno della colonna sono stati impostati rispettivamente a 10 μL e 25 °C. Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato insieme a bianchi analitici. Per la quantificazione, sono state costruite curve di calibrazione a sei punti per ogni zucchero studiato (r^2 compreso tra 0,993 [arabinosio] e 0,998 [glucosio]).

6.3.2.7. Polifenoli totali e singoli

Un'aliquota (3,0 g) di ogni campione di *Opuntia* è stata sospesa in 10 mL di metanolo acquoso (80%) e agitata per una notte in ghiaccio. Quindi, la miscela è stata centrifugata a $10.000 \times g$ per 15 minuti a 4 ° C e il surnatante risultante è stato raccolto per l'analisi. Il contenuto totale di fenoli (TPC) è stato valutato con il metodo proposto da Dewanto *et al.* (2002) con lievi modifiche. In breve, sono stati aggiunti 10 μl di supernatante con 240 μl di H₂O distillata e 250 μl di reattivo Folin-Ciocalteu. La soluzione è stata agitata e ulteriormente miscelata con 2,5 mL di NaHCO₃ al 7%, per ottenere un volume finale di 3 mL. La soluzione risultante è stata tenuta al buio per 90 minuti a temperatura ambiente e successivamente analizzata con lo spettrofotometro UV-VIS (UV-2401 PC, Shimadzu, Milano, Italia) a una lunghezza d'onda di

assorbanza di 760 nm. È stata costruita una curva di calibrazione a sei punti utilizzando diluizioni appropriate di una soluzione standard di acido gallico ($r^2 = 0,9907$). Di conseguenza, il contenuto totale di polifenoli è stato calcolato come mg di acido gallico equivalente per 100 g di campione essiccato (mg GAE/100 g). Tutte le determinazioni sono state eseguite in triplicato insieme a soluzioni in bianco.

Per i polifenoli singoli, aliquote campione (3,0 g) di nopal, polpa e buccia della frutta, nonché un'aliquota (3,0 g) di polvere sgrassata dai semi, sono state mescolate con 10 mL di soluzione acquosa di metanolo (80%) e agitate per una notte in un bagno di ghiaccio. Le miscele risultanti sono state centrifugate a $10.000 \times g$ per 15 minuti ($+4^\circ C$) e i surnatanti ottenuti sono stati filtrati attraverso filtri di politetrafluoroetilene (PTFE) da $0,45 \mu m$ e $0,20 \mu m$. L'analisi è avvenuta mediante HPLC accoppiato a diode-array detection e spettrometria di massa (HPLC-DAD-MS), sfruttando un apparato LC (sistema Prominence UFLC XR, Shimadzu, Kyoto, Giappone), dotato di un controller (CBM-20A), binario pompe (LC-20AD-XR), degasatore (DGU-20A3R), rilevatore PDA (SPD-M20), forno a colonna (CTO-20AC) e campionatore automatico (SIL-20A XR). Il metodo di analisi è stato già riportato da Albergamo et al. (2020) e prevedeva l'uso di un Ascentis Express C18 ($250 \times 4,6$ mm di diametro interno $\times 2,7 \mu m$ di diametro delle particelle; Supelco) e di fasi mobili, come acqua/acido formico (99,9:0,1, v/v) (solvente A) e

acetonitrile/acido formico (99,9:0,1, v/v) (solvente B). Il gradiente di eluizione era 0 min, 5% B, 5 min, 5% B, 15 min, 30% B, 40 min, 60% B, 45 min, comprese fasi come il lavaggio della colonna e il riequilibrio. La portata della fase mobile era pari a 1,0 mL/min, mentre il volume di iniezione e la temperatura del forno erano rispettivamente di 5,0 μ L e 30 °C. Gli spettri PDA sono stati acquisiti nell'intervallo 190–400 nm e i cromatogrammi sono stati estratti con lunghezze d'onda comprese tra 280 e 370 nm (costante di tempo 0,60 s; frequenza di campionamento 1,5625 Hz). Una sorgente di ionizzazione elettrospray (ESI) ha interfacciato il sistema LC con uno spettrometro di massa (MS) a triplo quadrupolo (LCMS-8040, Shimadzu, Kyoto, Giappone). Un dispositivo di divisione (VICI AG International, Schenkon, Svizzera) assicurava che solo un terzo del flusso totale fosse diretto dal sistema LC all'interfaccia ESI. L'acquisizione MS è stata eseguita con interfaccia ESI in modalità negativa e MS operante in modalità full-scan (m/z 100–800) e monitoraggio ionico selezionato (SIM), con le seguenti condizioni: temperatura ESI, 350 °C; blocco termico, 300 °C e temperatura della linea di desolvatazione (DL), 300 °C; velocità di scansione 715 amu/sec; flusso del gas di nebulizzazione (N₂) 1,5 L/min; flusso del gas di essiccazione (N₂) 10 L/min. Ogni campione di *Opuntia* è stato analizzato in triplicato insieme a bianchi analitici. L'analisi dei dati è stata eseguita dal software strumentale (LabSolution, v. 5.53).

I composti studiati appartenevano alle classi degli acidi idrossibenzoici, degli acidi idrossicinnamici e dei flavonoidi (flavoni e flavonoli). Sono stati selezionati in base alla disponibilità standard e alla loro presenza caratteristica nei diversi prodotti di *O. ficus-indica* (Lanuzza *et al.*, 2017; Rocchetti *et al.*, 2018; Guevara-Figueroa *et al.*, 2010). Ai fini della quantificazione, è stata condotta una procedura di calibrazione esterna mediante curve di calibrazione a sei punti (r^2 compreso tra 0,9947 [kaempferol 3-O-glucoside] e 0,9998 [luteolin]). Il metodo LC-MS è stato validato con successo in termini di linearità, LOD, LOQ, accuratezza, variabilità intra- e inter-saggio.

6.3.2.8. Analisi statistica

I dati sperimentali sono stati espressi come media \pm deviazione standard di tre misurazioni replicate per campione. Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il pacchetto SPSS (SPSS 21.0, Chicago, IL, USA). Differenze statisticamente significative nella composizione prossima, composizione AF, elementi inorganici, zuccheri e polifenoli totali e singoli rispetto alle diverse parti dell'*O. ficus-indica* tunisino sono state verificate mediante analisi della varianza unidirezionale (ANOVA), seguita da un post hoc Tukey's honestly significant difference (HSD). Per ogni variabile studiata, la significatività statistica è stata accettata a $p < 0,05$.

6.3.3. Risultati e discussioni

6.3.3.1. Composizione prossimale

I diversi (sotto)prodotti di *O. ficus-indica* hanno mostrato particolari composizioni prossimali (Tabella 1). Complessivamente, nopal e buccia erano caratterizzati da un contenuto proteico simile e piuttosto basso (rispettivamente 1,36 e 1,22%; $p > 0,05$), rispetto alla polpa e ai semi del frutto, che mostravano rispettivamente la proteina grezza più bassa e la più alta (0,78 e 17,34%, rispettivamente; $p < 0,05$). I lipidi erano più abbondanti nei semi e nella buccia (9,65 e 5,04%; $p < 0,05$) e inferiori e non significativamente differenti nel nopal e nella polpa del frutto (1,15 e 1,12%, $p > 0,05$). Nopal ha mostrato la più alta quantità di fibra alimentare (28,39%, $p < 0,05$), seguita da semi e buccia (16,28 e 12,54%, rispettivamente; $p > 0,05$); mentre la polpa del frutto era caratterizzata dai livelli più bassi di tale componente (4,06%, $p < 0,05$). La cenere variava dal 18,58% in nopal allo 0,28% nella polpa ($p < 0,05$). I carboidrati erano significativamente diversi in tutti i campioni ($p < 0,05$), compresi tra il 74,34% (nella polpa) e il 38,79% (nella nopal) (Tabella 1).

Componenti	Nopal	Frutti		
		Polpa	Buccia	Semi
Proteine	1.36 ± 0.22 ^a	0.78 ± 0.28 ^b	1.22 ± 0.49 ^a	17.34 ± 3.86 ^c
Lipidi	1.15 ± 0.53 ^a	1.12 ± 0.51 ^a	5.04 ± 0.57 ^b	9.65 ± 2.05 ^c
Ceneri	18.58 ± 2.19 ^a	0.28 ± 0.07 ^b	3.58 ± 0.42 ^c	1.79 ± 0.26 ^d
Fibre	28.39 ± 3.12 ^a	4.06 ± 0.92 ^b	12.54 ± 1.70 ^c	16.28 ± 2.35 ^c
Carboidrati	38.79 ± 3.56 ^a	74.34 ± 7.38 ^b	65.23 ± 5.46 ^c	49.76 ± 6.66 ^d
Umidità	7.73 ± 1.26 ^a	16.57 ± 2.98 ^b	10.12 ± 2.06 ^a	3.39 ± 0.86 ^c

Tabella 1: Composizione prossimale (g/100 g, su base dw) di nopal, polpa di frutta, buccia e semi di *O. ficus-indica* tunisino. Per ogni prodotto, i dati sono riportati in termini di media ± deviazione standard di n = 3 campioni, dove ogni campione è stato analizzato tre volte. a–d: lettere in apice diverse nella stessa riga indicano valori significativamente diversi per un dato parametro ($p < 0,05$ secondo il test HSD di Tukey post hoc); le stesse lettere in apice nella stessa riga indicano valori non significativamente diversi per un dato parametro ($p > 0,05$ secondo il test HSD di Tukey post hoc).

Sulla base dei risultati ottenuti, il nopal tunisino, così come la buccia e i semi di fico d'India, possono essere etichettati come "fonte naturale di fibre", perché i risultati hanno mostrato che erano caratterizzati da oltre il 3% di fibra alimentare, secondo il regolamento (CE) 1924/2006 (European Commission Regulation). Inoltre, i semi di fico d'India possono fungere da fonte di proteine. Rispetto ad altri semi, il contenuto proteico dei semi di fico d'India è simile a quello dei semi di chia (18,81%), dei semi di lino (20,30%), della colza (19,00 g/100 g) e del sesamo (15,07%) (Kotecka-Majchrzak *et al.*, 2020).

Nel complesso, il nopal tunisino era caratterizzato da un livello notevolmente diverso di proteine, carboidrati e fibre alimentari e un contenuto simile di lipidi e ceneri rispetto al nopal messicano, a cui si riferiva principalmente la letteratura. Infatti, il nopal essiccato di diverse cultivar (es. Blanco, Manso, Amarillo e

Cristalino) ha mostrato proteine più elevate (6,7–19%), carboidrati (55,1–66,5%) e fibre alimentari (6,2–15%), mentre i lipidi e le ceneri erano, rispettivamente, pari a 0,1–1,5% e 14,8–18,8% [56]. È interessante notare che il nopal essiccato di diverse cultivar siciliane aveva proteine (1,48–2,18%), cenere (12,81–15,23%) e lipidi (0,76–2,46%) simili alla controparte tunisina. Tuttavia, era caratterizzato da livelli più elevati di fibra alimentare (41,10–46,72%) (Di Bella *et al.*, 2021). Contrariamente al nopal, la letteratura riporta una maggiore coerenza con i risultati ottenuti dalla polpa del fico d'India tunisino. Infatti, la polpa essiccata dei fichi d'India algerini, canari ed egiziani era complessivamente caratterizzata da proteine pari allo 0,87–1,62%, lipidi 0,48–0,75%, ceneri 0,4–2,6% e fibre alimentari 4,65–5,37% (Salim *et al.*, 2009; Medina *et al.*, 2007; El-Beltagi *et al.*, 2019). Le bucce essiccate di fichi d'India algerini ed egiziani mostravano un contenuto proteico e di cenere paragonabile a quello delle bucce di fico d'India tunisino (proteine: 0,90–1,53% e ceneri: 3,05–3,4%). Tuttavia, non è stata osservata alcuna consistenza per gli altri componenti prossimi, che sono stati trovati a livelli molto più bassi (lipidi: 0,32–1,69%, fibre: 0,96–8,53% (Salim *et al.*, 2009; El-Said *et al.*, 2011; Siano *et al.*, 2016). I semi di *Opuntia* provenienti da diversi paesi (Algeria, Etiopia e Turchia), ed essiccati in forno o in condizioni atmosferiche, hanno riportato un contenuto di fibre paragonabile a quello dei semi tunisini (12,47–18,23%). Tuttavia, le proteine (4,48–10,00%) e i lipidi (3,66–5,00%) erano inferiori

rispetto alle controparti di questo studio, confermando così che i semi di *Opuntia tunisina* sono preziose fonti di proteine e grassi (Salim *et al.*, 2009; Özcan *et al.*, 2011; Reda *et al.*, 2019).

6.3.3.2. Acidi grassi

La composizione degli acidi grassi dei (sotto)prodotti di *Opuntia tunisina* è riportata nella Tabella 2. Complessivamente, nopal e bucce erano caratterizzati dalle quantità più elevate di FA polinsaturi (PUFA, 56,69 e 60,21%), seguiti da FA saturi (SFA, 23,79 e 23,42%) e MUFA (19,41 e 16,21%). D'altra parte, polpa e semi hanno mostrato un grado di insaturazione maggiore, in quanto i PUFA erano i più abbondanti (52,93 e 61,71%), seguiti da MUFA (25,05 e 22,42%) e SFA (21,94 e 14,12%) (Tabella 2).

Sebbene ogni matrice rivelasse un profilo FA peculiare, in generale, l'acido palmitico (C16:0) era l'SFA più abbondante (dal 10,35% nei semi al 21,14% nel nopal), l'acido oleico (C18:1 n-9, dal 13,56% nelle bucce al 23,26% nella polpa dei frutti) presentava l'83-93% dei MUFA totali, mentre l'acido linoleico (C18:2 n-6) era il PUFA predominante (dal 36,44% in nopal al 61,11% nei semi), rappresentando fino a 99% dei PUFA totali nei semi (Tabella 2). In particolare, i semi di fico d'India hanno riportato la composizione in AF tipica di un olio di semi commestibile con potenziali benefici per la salute, per l'abbondante presenza di PUFA, in particolare l'acido linoleico essenziale, e il più basso contenuto di SFA (14,12%) (Özcan *et al.*, 2011; Matthäus *et al.*, 2011; Dubois

et al., 2007). In effetti, profili FA simili sono già stati riportati per l'olio di semi d'uva (C16:0, 9,91%; C18:0, 2,88%; C18:1 n-9, 26,51%; C18:2 n-6, 53,84%,) (Cicero *et al.*, 2018), l'olio di semi di paprika (C16:0, 13,8%; C18:0, 3,7%; C18:1 n-9, 14,6%; C18:2 n-6, 67,8%), e il niger olio di semi (C16:0, 12,0%; C18:0, 3,0%; C18:1 n-9, 13,5%; C18:2 n-6, 65,4%) (Dubois *et al.*, 2007).

La qualità alimentare dei grassi provenienti da diversi (sotto)prodotti di *Opuntia* è stata valutata dal rapporto H/H, dagli indici AI e TI (Tabella 2), ovvero indicatori della stimolazione del metabolismo del colesterolo e dell'aggregazione piastrinica responsabili delle sindromi cardiovascolari (Javardi *et al.*, 2020).

I valori H/H variavano da 3,48 (nopal) a 7,95 (semi). Nelle matrici grasse, come i semi di *Opuntia*, sarebbe auspicabile un livello più alto di questo indice, direttamente proporzionale al contenuto di PUFA, poiché esprime l'effetto degli AF sul metabolismo del colesterolo. A questo proposito, valori H/H comparabili sono stati trovati nell'olio di sesamo (7,72), mentre gli oli di semi di lino (13,24), oli di semi d'uva (11,07–12,28), canapa (14,97) e lino (17,05) hanno mostrato H/H più elevati rapporti (Simopoulos *et al.*, 2002; Siano *et al.*, 2016; Razmaitè *et al.*, 2021).

I (sotto)prodotti di *Opuntia* hanno mostrato bassi indici AI e TI, essendo direttamente proporzionali agli SFA, e, di conseguenza, avevano un buon potenziale di protezione contro le malattie coronariche. In particolare, l'IA era compresa tra 0,49 (semi) e 1,11 (nopal), mentre TI era compresa tra 0,27 (nopal) e 0,43 (polpa).

Nel complesso, un'IA comparabile è stata trovata nell'olio di semi di melograno (0,42) (Siano *et al.*, 2016); mentre gli oli di lino (0,00) e vinaccioli (0,081–0,090), di canapa (0,07) e di lino (0,06) erano caratterizzati da AI ancora più bassi (Simopoulos *et al.*, 2002; Siano *et al.*, 2016; Razmaitè *et al.*, 2021). Gli oli di canapa (0,10), lino (0,05) e semi di lino (0,04) mostravano Tis ancora più bassi, mentre gli oli di sesamo (0,26), semi d'uva (0,24–0,26) e olio di melograno (0,75) avevano rispettivamente Tis comparabile e superiore rispetto ai prodotti studiati (Simopoulos *et al.*, 2002; Siano *et al.*, 2016; Razmaitè *et al.*, 2021). Considerando il rapporto ω -6/ ω -3, il nopal tunisino ha mostrato il rapporto più equilibrato (1,89), seguito dalle bucce (4,27). Come previsto, i semi avevano un rapporto molto sbilanciato (211,83), a causa di un contenuto molto elevato di ω -6 FA e quantità molto piccole di ω -3 FA. Complessivamente, la letteratura ha riportato oli di canapa, semi di lino e semi di lino con rapporti ottimali ω -6/ ω -3 (rispettivamente, 3,79, 0,28, 0,22) semi di *Opuntia* (Siano *et al.*, 2016; Razmaitè *et al.*, 2021). Tuttavia, l'olio di sesamo ha mostrato un rapporto sbilanciato ω -6/ ω -3, pari a 50 (Hashempour-Baltork *et al.*, 2018). Per quanto, a conoscenza degli autori, la composizione in acidi grassi dei diversi (sotto)prodotti di *O. ficus-indica* tunisina non è stata ancora studiata altrove. La letteratura ha riportato un disaccordo generale tra le poche indagini sul nopal messicano, spagnolo e siciliano e i risultati di questo studio. Per quanto riguarda il nopal di questo studio, il nopal essiccato messicano era

caratterizzato da acidi palmitico (20,5–36,4%) e linolenico (21,58–26,4%) più elevati, nonché da oleico inferiore (9,48–11,03%) e linoleico (25,05–28,61 %) acidi (Figueroa-Pérez *et al.*, 2018). D'altra parte, il nopal essiccato spagnolo di sei cultivar ha mostrato una composizione di AF molto variabile a seconda della cultivar studiata (acido palmitico: 30,1–50,0%; acido oleico: 9,22–22,3%; acido linoleico: 12,8–27,9%; acido linolenico: 5,31–11,5%) (Andreu-Coll *et al.*, 2019). Recentemente, Di Bella *et al.*, (2021) hanno sottolineato che il nopal siciliano essiccato aveva livelli molto più elevati di acido palmitico (32,07–36,40%), ma quantità inferiori di oleico (13,00–15,47%), linoleico (21,43–24,27%) e acidi linolenici (11,02–15,61%). Per quanto riguarda la polpa del frutto, è stata osservata una maggiore coerenza tra letteratura e risultati di questo studio. A questo proposito, la polpa del frutto essiccato di *Opuntia* di sei cultivar spagnole ha riportato i seguenti intervalli: acido palmitico 14,8–29,0%, acido linoleico 20,2–53,39% e acido linolenico 10,8–20,8% (Andreu-Coll *et al.*, 2019). La polpa essiccata dell'*Opuntia* egiziana ha mostrato che gli stessi FA predominanti rientravano negli intervalli discussi sopra (El-Beltagi *et al.*, 2019). Notevole attenzione è stata data allo studio del profilo FA di bucce e semi di fico d'india. In particolare, le bucce essiccate di *Opuntia* egiziana, spagnola e commerciale hanno mostrato livelli molto variabili di acido palmitico (15,76–32,1%) e oleico (6,83–24,1%), così come linoleico (28,96–52,00%) e linolenico (0,43– 21,9%) acidi (El-Beltagi *et al.*, 2019;

El-Said *et al.*, 2011; Andreu-Coll *et al.*, 2019; Ramadan *et al.*, 2003). Tuttavia, analogamente alla polpa del frutto, i semi di *Opuntia* con origini diverse hanno mostrato una composizione di FA abbastanza omogenea. In effetti, i semi turchi, tunisini e algerini essiccati in condizioni atmosferiche avevano acidi grassi predominanti come l'acido palmitico compreso tra il 9,23 e il 13,4%, l'acido oleico dal 13,0 al 25,52% e l'acido linoleico tra il 49,3 e il 63,1% (Özcan *et al.*, 2011; Matthäus *et al.*, 2011; Ennouri *et al.*, 2005; Chougui *et al.*, 2013). In particolare, tali PUFA hanno raggiunto il 70,3% nei semi del governatorato di Sfax (Tunisia) (Ennouri *et al.*, 2005). Complessivamente, i semi indagati del governatorato di Mahdia hanno mostrato una composizione di FA paragonabile a quella già descritta in letteratura.

FA	Nopal	Frutto		
		Polpa	Buccia	Semi
C16:0	21.14 ± 1.74 ^a	16.83 ± 2.33 ^b	20.76 ± 1.25 ^a	10.35 ± 1.02 ^c
C18:0	2.64 ± 0.28 ^a	4.96 ± 0.45 ^b	2.65 ± 0.91 ^a	3.45 ± 0.20 ^c
C20:0	0.01 ± 0.00 ^a	0.15 ± 0.07 ^b	0.01 ± 0.00 ^a	0.32 ± 0.00 ^b
SFA	23.79 ± 1.08 ^a	21.94 ± 1.76 ^a	23.42 ± 1.18 ^a	14.12 ± 2.10 ^b
C16:1 n-7	0.34 ± 0.12 ^a	0.97 ± 0.38 ^b	1.09 ± 0.26 ^b	1.02 ± 0.23 ^b
C17:1 n-7	0.57 ± 0.06 ^a	0.57 ± 0.07 ^a	0.50 ± 0.29 ^a	0.12 ± 0.05 ^a
C18:1 n-9	17.55 ± 2.63 ^a	23.26 ± 1.31 ^b	13.56 ± 1.78 ^c	20.86 ± 1.22 ^b
C20:1 n-9	0.95 ± 0.28 ^a	0.25 ± 0.11 ^a	1.05 ± 0.09 ^b	0.42 ± 0.26 ^a
MUFA	19.41 ± 2.98 ^a	25.05 ± 1.66 ^b	16.21 ± 1.85 ^a	22.42 ± 0.95 ^c
C18:2 n-6	36.44 ± 3.81 ^a	48.97 ± 4.86 ^b	47.85 ± 3.86 ^b	61.11 ± 5.55 ^c
C18:3 n-3	19.64 ± 1.08 ^a	3.26 ± 0.76 ^b	11.44 ± 0.19 ^c	0.29 ± 0.09 ^d
C20:4 n-6	0.61 ± 0.19 ^a	0.75 ± 0.09 ^a	0.92 ± 0.14 ^a	0.32 ± 0.08 ^b
PUFA	56.69 ± 5.89 ^a	52.93 ± 6.09 ^a	60.21 ± 4.67 ^a	61.71 ± 3.05 ^a
H/H	3.48	5.45	3.50	7.95
AI	1.11	0.86	1.09	0.49
TI	0.27	0.43	0.35	0.32
ω-6/ω-3	1.89	15.26	4.27	211.83

Tabella 2: Composizione in acidi grassi (FA) (g/100 g, su base dw) di nopal, polpa di frutta, buccia e semi dell'O. ficus-indica tunisino. Per ogni prodotto, i dati sono espressi come media dell'area del picco GC-FID ± deviazione standard (% dw) di n = 3 campioni, dove ogni campione è stato analizzato tre volte.

a-d: diverse lettere in apice nella stessa riga indicano valori significativamente diversi per un dato parametro ($p < 0,05$ secondo il test HSD post hoc di Tukey); stesse lettere in apice nella stessa riga indicano valori non significativamente differenti per un dato parametro ($p > 0,05$ secondo il test HSD post hoc di Tukey).

6.3.3.3. Elementi minerali

Il profilo degli elementi delle diverse parti dell'O. ficus-indica tunisino è riportato nella Tabella 3. Tra i (sotto)prodotti studiati, il nopal era il più ricco di minerali e oligoelementi essenziali, seguito da buccia, semi e polpa. Tutte le matrici sono risultate una preziosa fonte di Mg e K, che variavano significativamente rispettivamente

tra 152,84–493,57 mg/100 g e 187,05–6949,57 mg/100 g ($p < 0,05$). Tra gli oligoelementi essenziali, Mn (0,78–59,73 mg/Kg, $p < 0,05$) e Fe (2,36–23,15 mg/Kg, $p < 0,05$) si sono distinti in ogni parte indagata. Una tendenza inversa è stata osservata per gli oligoelementi potenzialmente tossici, in quanto la polpa della frutta è risultata il prodotto più “contaminato”, seguita da nopal, buccia e semi. A questo proposito, Ni e Cr erano gli elementi più abbondanti, variando da 33,28 a 47,14 $\mu\text{g/Kg}$ ($p < 0,05$) e da 11,92 a 41,50 $\mu\text{g/Kg}$ ($p < 0,05$). Tuttavia, metalli pesanti come Cd e Pb erano a livelli bassi e sicuri (11,28–25,62 $\mu\text{g/Kg}$, $p > 0,05$) e As era addirittura $< \text{LOD}$ ($< 0,015 \mu\text{g/Kg}$) in ogni campione. In particolare, le varie parti del fico d'india tunisino rientravano nei limiti stabiliti dal Reg. Europeo n. 1881/2006 per Cd (0,050 mg/Kg, a peso fresco) e Pb (0,10 mg/Kg, a peso fresco) per quanto riguarda la frutta (EC 1881/2006).

Sebbene lo schema degli elementi di una matrice vegetale possa variare notevolmente anche all'interno di una data specie, a causa di fattori quali l'origine geografica, lo scenario di crescita, la variabilità genetica, nonché lo stadio di maturità, le bucce dell'*Opuntia tunisina* hanno mostrato livelli di minerali simili a quelli di bucce di patate, carote e ravanelli.

Per quanto riguarda gli oligoelementi essenziali, le bucce studiate possono essere confrontate con le bucce sopra elencate per il contenuto di Mn, ma non per Fe e Zn, che risultano in quantità molto inferiori (Khattak *et al.*, 2017). D'altra parte, i semi di fico

d'india hanno mostrato un profilo minerale simile a quello dei semi di anguria, zucca e colza, sebbene gli oligoelementi essenziali, come Fe, Zn e Mn, fossero a livelli molto più bassi (Beyzi *et al.*, 2019; Ding *et al.*, 2018; Mehra *et al.*, 2015; Kaul *et al.*, 2011). Nel complesso, queste considerazioni evidenziano il ruolo potenziale di tali sottoprodotti come ingredienti utili per l'arricchimento degli alimenti e anche per lo sviluppo di prodotti nutraceutici.

In letteratura i minerali e gli oligoelementi del nopal sono stati indagati principalmente rispetto alla *O. ficus-indica* messicana, risultando, in genere, in contenuti molto variabili e non confrontabili con il nopal tunisino. In effetti, il nopal essiccato, della *cultivar* messicana Redonda, è stato contrassegnato da Mg variabile da 880 a 1120 mg/100 g, Na 30-550 mg/100 g e Mn 290-300 mg/Kg a seconda dello stadio di maturità (Hernández-Urbiola *et al.*, 2010). Allo stesso modo, il nopal essiccato delle altre due *cultivar* messicane (cioè Milpa Alta e Atlixico) era caratterizzato da livelli di Mg più elevati (1016,68–724,93 mg/100 g) rispetto alla controparte tunisina. Tuttavia, elementi come K (5469,16-5648,15 mg/100 g), Na (83,12-112,45 mg/100 g) e Fe (31,6-34,3 mg/Kg) sono stati trovati a livelli simili a quelli descritti in questo lavoro (Ramírez-Moreno *et al.*, 2011).

La polpa del fico d'india tunisino era più abbondante in minerali e oligoelementi essenziali rispetto alla frutta secca keniota, algerina e delle Canarie, contrassegnata da Mg e K nell'intervallo 1,05-76,10 mg/100 g e 11,14-559 mg/100 g, e Mn, Fe e Zn che variano

tra 3,0–69,9 mg/Kg, 2,0–33,5 mg/Kg e 15,5–16,3 mg/Kg (Salim *et al.*, 2009; Medina *et al.*, 2007; El Kossori *et al.*, 1998; Chiteva *et al.*, 2013).

Analogamente alla polpa, le bucce e i semi dei frutti tunisini hanno rivelato concentrazioni di minerali più elevate rispetto alle bucce e ai semi derivati dai fichi d'india essiccati turchi, egiziani, arabi, etiopi e algerini (Mg variabile tra 1,47-322 mg/100 g in bucce e 8,07–208 mg/100 g nei semi; K variabile tra 53,27–275 mg/100 g nelle bucce e 53,27–275 mg/100 g nei semi (Salim *et al.*, 2009; El-Beltagi *et al.*, 2019; El-Said *et al.*, 2011; Siano *et al.*, 2016; Özcan *et al.*, 2011; Sawaya *et al.*, 1983). le bucce e i semi di pera precedentemente studiati erano caratterizzati da una maggiore quantità di oligoelementi essenziali rispetto a quelli tunisini di questo studio (Mn: 180–729 mg/Kg nelle bucce e 1,9–8,3 mg/Kg nei semi, Fe: 83, 1-255,8 mg/ Kg in bucce e 11,7–121,0 in semi (Özcan *et al.*, 2011; Reda *et al.*, 2019; Sawaya *et al.*, 1983).

Elementi	Nopal	Frutto		
		Polpa	Buccia	Semi
Minerali (mg/100g, dw)				
Na	144.54 ± 21.09 ^a	2.58 ± 0.26 ^b	114.29 ± 15.95 ^c	14.09 ± 0.17 ^d
Mg	493.57 ± 87.73 ^a	152.84 ± 29.38 ^b	345.19 ± 55.67 ^c	427.35 ± 76.17 ^a
K	6949.57 ± 1039.89 ^a	187.05 ± 15.85 ^b	1820.83 ± 20.33 ^c	214.36 ± 18.93 ^b
Elementi in traccia (mg/Kg, dw)				
Mn	59.73 ± 12.96 ^a	0.78 ± 0.07 ^b	46.86 ± 6.13 ^a	1.56 ± 0.09 ^c
Fe	23.15 ± 3.07 ^a	2.36 ± 0.16 ^b	15.27 ± 1.24 ^c	4.99 ± 0.35 ^d
Cu	0.05 ± 0.01 ^a	0.21 ± 0.03 ^b	11.55 ± 1.58 ^c	0.46 ± 0.12 ^b
Zn	11.16 ± 1.25 ^a	5.09 ± 0.28 ^b	24.96 ± 2.20 ^c	31.58 ± 3.60 ^d
Oligoelementi potenzialmente tossici (µg/Kg, dw)				
Cr	41.50 ± 5.13 ^a	20.14 ± 1.44 ^b	15.41 ± 2.62 ^c	11.92 ± 1.03 ^c
Ni	47.14 ± 5.59 ^a	55.46 ± 3.10 ^a	34.79 ± 1.99 ^b	33.28 ± 1.41 ^b
As	<LOD	<LOD	<LOD	24.15 ± 1.40
Cd	25.62 ± 2.13	<LOD	<LOD	<LOD
Pb	22.37 ± 1.81 ^a	23.72 ± 2.04 ^a	13.77 ± 3.02 ^b	11.28 ± 2.76 ^b

Tabella 3: Minerali (mg/100 g, dw), oligoelementi essenziali (mg/Kg prodotto, dw) e potenzialmente tossici (µg/Kg prodotto, dw) di nopal, polpa di frutta, buccia e semi di *O. ficus-indica* tunisino. Per ogni prodotto, i dati sono espressi come media ± deviazione standard di n = 3 campioni, dove ogni campione è stato analizzato tre volte. Limite di rilevabilità (LOD) di As = 0,015 µg/Kg, Cd = 0,008 µg/Kg e Pb = 0,012 µg/Kg. a-d: diverse lettere in apice nella stessa riga indicano valori significativamente diversi per un dato parametro (p < 0,05 secondo il test HSD post hoc di Tukey); stesse lettere in apice nella stessa riga indicano valori non significativamente differenti per un dato parametro (p > 0,05 secondo il test HSD post hoc di Tukey).

6.3.3.4. Zuccheri

La composizione zuccherina dei carboidrati totali dei vari prodotti *Opuntia* tunisini è riportata in Tabella 4. Complessivamente ogni campione è stato caratterizzato da un profilo zuccherino peculiare, la polpa del fico d'India era caratterizzata dalla più alta concentrazione di quasi tutti i monosaccaridi, seguita dalla buccia, semi e nopal. Tra gli zuccheri studiati, il glucosio era lo zucchero

più abbondante (8,75–42,57 g/100 g, $p < 0,05$), seguito da xilosio (7,79–22,29 g/100 g, $p < 0,05$) e arabinosio (2,27–13,78 g/100 g, $p < 0,05$) (Tabella 3). Nel nopal disidratato, in particolare, il galattosio (9,76 g/100 g) e l'arabinosio (13,78 g/100 g) fungono tipicamente da monomeri di un polimero noto come "opuntiamannano", che mostra effetti antiiperlipidemici e antiiperglicemici, rendendo i grassi e gli zuccheri alimentari non assorbibili attraverso il tratto intestinale (Arena *et al.*, 2006).

La composizione zuccherina dei carboidrati totali dei (sotto)prodotti essiccati di *O. ficus-indica* è stata scarsamente e frammentariamente chiarita solo per quanto riguarda il nopal e i semi. Infatti, frutti e bucce sono stati per lo più chiariti per la composizione zuccherina della frazione pectinica (Lira-Ortiz *et al.*, 2014; Forni *et al.*, 1994).

Due lavori precedenti hanno analizzato gli zuccheri monomerici del cladode essiccato di *O. ficus-indica* calabrese e siciliano, riportando una marcata abbondanza di glucosio (9,30-15,31 g/100 g), livelli comparabili di mannosio (0,67-3,49 g/100 g) e livelli inferiori di galattosio (3,36–4,83 g/100 g), xilosio (1,86–2,01 g/100 g) e arabinosio (1,47–3,96 g/100 g) (Di Bella *et al.*, 2021; Ginestra *et al.*, 2009).

I semi essiccati dell'*Opuntia marocchina* hanno mostrato livelli più elevati di glucosio e xilosio rispetto ai semi di questo studio (40,6 e 44,8%). Tuttavia, galattosio, arabinosio e mannosio sono stati

riportati a livelli simili (rispettivamente 1,0, 3,1 e 1,0%) (Habibi *et al.*, 2007).

Zuccheri	Nopal	Frutto		
		Polpa	Buccia	Semi
Glucosio	8.75 ± 2.16 ^a	42.57 ± 13.88 ^b	21.79 ± 4.94 ^c	19.37 ± 4.25 ^d
Galattosio	9.76 ± 1.13 ^a	2.34 ± 0.51 ^b	15.67 ± 3.21 ^c	0.56 ± 0.03 ^d
Xilosio	7.78 ± 0.91 ^a	6.78 ± 1.79 ^a	5.48 ± 0.72 ^a	22.29 ± 3.87 ^b
Arabinosio	13.78 ± 3.81 ^a	13.56 ± 3.31 ^a	4.22 ± 1.05 ^b	2.27 ± 0.29 ^c
Mannosio	1.92 ± 0.45 ^a	4.75 ± 1.73 ^b	6.96 ± 1.78 ^b	1.34 ± 0.38 ^a

Tabella 4: Zuccheri (g/100 g, dw) di nopal, polpa di frutta, buccia e semi di *O. ficus-indica* tunisino. Per ogni prodotto, i dati sono espressi come media ± deviazione standard di n = 3 campioni, dove ogni campione è stato analizzato tre volte.

a-d: diverse lettere in apice nella stessa riga indicano valori significativamente diversi per un dato parametro ($p < 0,05$ secondo il test HSD post hoc di Tukey); stesse lettere in apice nella stessa riga indicano valori non significativamente differenti per un dato parametro ($p > 0,05$ secondo il test HSD post hoc di Tukey).

6.3.3.5. Polifenoli

Secondo i dati forniti dal saggio Folin-Ciocalteu in Tabella 5, il più alto contenuto di polifenoli totali è stato rilevato nelle bucce dei fichi d'india (4785,36 mg GAE/100 g). Sebbene significativamente differenti ($p < 0,05$), alti fenoli totali sono stati rilevati anche nei cladodi (4235,27 mg GAE/100 g) e nel frutto (2381,68 mg GAE/100 g), mentre i semi hanno mostrato i livelli più bassi di queste fitomolecole (28,36 mg GAE/100 g). La tendenza descritta dai nostri risultati era in accordo con la letteratura precedente che chiariva la distribuzione dei polifenoli in varie parti di *O. ficus-indica* ed ha confermato che la buccia è una fonte molto interessante per la rivalorizzazione dei composti bioattivi. Tuttavia, tra questi (sotto)prodotti non sono stati descritti contenuti fenolici comparabili, a causa di alcune variabili responsabili di variazioni

consistenti di tali bioattivi, come lo stadio di maturità, la variabilità genetica, il contesto pedoclimatico e, non ultimo, la procedura di elaborazione della matrice Opuntia (Abdel-Hameed *et al.*, 2014; El-Mostafa *et al.*, 2014; Gouws *et al.*, 2019; Fernández-López *et al.*, 2010). Per gli stessi motivi, la letteratura riporta quantità molto variabili di singoli polifenoli tra nopal, polpa di frutta, buccia e semi di *O. ficus-indica*, sebbene classi di composti peculiari, quali acido idrossicinnamico e idrossibenzoico, e flavonoidi, caratterizzino costantemente questi prodotti. (Di Bella *et al.*, 2021; Guevara-Figueroa *et al.*, 2010; El-Mostafa *et al.*, 2014). Tra gli acidi fenolici, il nopal era caratterizzato dagli acidi predominanti p-cumarico (498,16 mg/100 g), clorogenico (179,22 ± 22,49 mg/100 g) e sirigico (166,22 mg/100 g). Nella polpa del frutto, gli acidi clorogenico (203,86 mg/100 g), cinnamico (124,33 mg/100 g) e vanillico (111,7 mg/100 g) erano i fitocostituenti più abbondanti; mentre tra gli acidi fenolici delle bucce spiccavano l'acido 4-idrossibenzoico (484,95 mg/100 g), l'acido cinnamico (318,95 mg/100 g) e l'acido ferulico (127,67 mg/100 g). In linea con il basso contenuto di fenoli totali, i semi riportavano pochissimi acidi fenolici, compreso il più abbondante acido ferulico (12,53 mg/100 g) (Tabella 6). In particolare, l'acido ferulico è già emerso come uno dei principali composti fenolici, essendo il precursore di alcuni isomeri feruloil-saccarosio già descritti nell'olio derivato da diverse varietà di semi di *O. ficus-indica* (Chougui *et al.*, 2013). A differenza della grande variabilità osservata per gli acidi fenolici,

rutina e kaempferolo sono stati i composti più abbondanti nella frazione flavonoidica, essendo significativamente differenti ($p < 0,05$) in nopal (500,05 e 309,38 mg/100 g), polpa di frutta (260,45 e 105,83 mg/100 g), bucce (818,94 e 270,26 mg/100 g) e semi (rutina: 20,37 mg/100 g). Tuttavia, diversi glicosidi di isorhamnetin e kaempferol sono stati trovati anche a livelli molto alti e significativamente diversi tra le tre matrici studiate ($p < 0,05$) (Tabella 6). Ciò è in linea con studi precedenti, che evidenziano tali polifenoli come bioattivi caratteristici di *O. ficus-indica* (Guevara-Figueroa *et al.*, 2010; Moussa-Ayoub *et al.*, 2011).

Polifenoli totali	Nopal	Frutto		
		Polpa	Buccia	Semi
	4235.27 ± 68.15 ^a	2581.68 ± 45.21 ^b	4785.36 ± 73.16 ^c	108.36 ± 10.15 ^d

Tabella 5: Polifenoli totali (mg GAE/100 g, dw) di diversi (sotto)prodotti di *O. ficus-indica* tunisina. Per ogni prodotto, i dati sono espressi come media ± deviazione standard di $n = 3$ campioni, dove ogni campione è stato analizzato tre volte.

a-d: diverse lettere in apice nella stessa riga indicano valori significativamente diversi per un dato parametro ($p < 0,05$ secondo il test HSD post hoc di Tukey); stesse lettere in apice nella stessa riga indicano valori non significativamente differenti per un dato parametro ($p > 0,05$ secondo il test HSD post hoc di Tukey).

Polifenoli	λ_{\max} (nm)	[M-H] (<i>m/z</i>)	Frutto			
			Nopal	Polpa	Buccia	Semi
Acido gallico	214,270	169	33.27 ± 3.55 ^a	11.68 ± 1.40 ^b	65.50 ± 2.76 ^c	<LOD
Acido protocatecuico	218,260,295	153	50.61 ± 4.47 ^a	21.89 ± 2.21 ^b	9.61 ± 1.19 ^c	<LOD
Acido 4-idrossibenzoico	255	137	9.44 ± 1.26 ^a	16.77 ± 1.56 ^b	484.95 ± 8.73 ^c	1.37 ± 0.11 ^d
Acido vanillico	220,260,295	167	84.15 ± 10.14 ^a	111.77 ± 17.13 ^a	24.86 ± 3.57 ^b	<LOD
Acido sirigico	220,275	197	166.22 ± 18.99 ^a	3.23 ± 0.62 ^b	59.49 ± 4.09 ^c	3.78 ± 0.75 ^b

Acido cinnamico	321	147	42.42 ± 3.10 ^a	124.33 ± 8.78 ^b	318.95 ± 11.99 ^c	<LOD
Acido clorogenico	324	353	179.22 ± 22.49 ^a	203.86 ± 23.36 ^a	28.84 ± 4.33 ^b	<LOD
Acido caffeico	210,272,328	179	23.50 ± 5.09 ^a	10.64 ± 2.38 ^b	98.88 ± 2.97 ^c	<LOD
Acido p-cumarico	225,310	163	498.16 ± 58.38 ^a	4.00 ± 0.93 ^b	57.79 ± 2.22 ^c	<LOD
Acido ferulico	230,320	193	69.92 ± 9.23 ^a	251.16 ± 7.46 ^b	127.67 ± 5.82 ^c	12.53 ± 3.22 ^d
Acido sinapico	235,322	223	20.21 ± 2.04 ^a	85.71 ± 5.27 ^b	46.17 ± 3.39 ^c	<LOD
<i>Acidi fenolici totali</i>	--	--	1177.12 ± 41.89 ^a	845.01 ± 46.78 ^b	1322.68 ± 27.22 ^c	17.68 ± 5.22 ^d
Rutina	257,354	609	500.05 ± 33.39 ^a	260.45 ± 10.15 ^b	818.94 ± 44.86 ^c	20.37 ± 5.87 ^d
Isorhamnetin 3-O-glucoside	250,342	477	149.71 ± 10.13 ^a	184.14 ± 14.91 ^b	223.66 ± 14.44 ^c	<LOD
Isorhamnetin-3-O-rutinoside	250,270,342	623	703.33 ± 28.45 ^a	271.39 ± 25.59 ^b	254.51 ± 31.03 ^b	<LOD
Kaempferol-3-O-glucoside	262,362	447	479.77 ± 31.90 ^a	132.11 ± 9.62 ^a	512.44 ± 42.58 ^c	<LOD
Kaempferol-3-O-rutinoside	266,300,346	593	253.46 ± 48.05 ^a	171.52 ± 12.78 ^b	159.22 ± 27.65 ^b	<LOD
Quercetina	205,254,370	301	48.77 ± 7.70 ^a	63.60 ± 8.24 ^b	605.28 ± 22.71 ^c	32.33 ± 11.09 ^d
Luteolina	365	285	49.29 ± 2.83 ^a	71.72 ± 5.27 ^b	80.12 ± 6.71 ^b	<LOD
Apigenina	268,334	269	167.06 ± 14.54 ^a	59.95 ± 6.51 ^b	60.89 ± 2.02 ^b	<LOD
Kaempferol	266,368	285	309.38 ± 50.83 ^a	105.83 ± 10.62 ^b	270.26 ± 14.19 ^c	<LOD
<i>Flavonoidi totali</i>	--	--	2660.84 ± 68.48 ^a	1320.68 ± 38.30 ^b	2985.30 ± 30.10 ^c	52.70 ± 7.36 ^d
<i>Polifenoli totali</i>	--	--	3837.96 ± 110.37 ^a	2165.69 ± 8.41 ^b	4307.98 ± 17.12 ^c	70.38 ± 14.37 ^d

Tabella 6: Polifenoli singoli (mg/100 g, dw) di varie parti di *O. ficus-indica* tunisina. Per ogni prodotto, i dati sono espressi come media ± deviazione standard di n = 3 campioni, dove ogni campione è stato analizzato tre volte. a-d: diverse lettere in apice nella stessa riga indicano valori significativamente diversi per un dato parametro (p < 0,05 secondo il test HSD post hoc di Tukey); stesse lettere in apice nella stessa riga indicano valori non significativamente differenti per un dato parametro (p > 0,05 secondo il test HSD post hoc di Tukey).

6.3.4. Conclusioni

In base alla composizione nutrizionale chiarita per i diversi (sotto)prodotti di *Opuntia*, si può concludere che il fico d'india tunisino potrebbe essere saggiamente sfruttato per incoraggiare una produzione sostenibile, un'efficace gestione dei rifiuti e per ricevere una serie di benefici per la salute umana, in piena sintonia con il modello della dieta mediterranea.

In linea con la letteratura su *Opuntia*, esiste un potenziale realistico di ogni sottoprodotto di *O. ficus-indica* tunisino da utilizzare nello sviluppo di alimenti mediterranei funzionali, nonché nell'isolamento di composti a valore aggiunto che potrebbero essere impiegato efficacemente nei settori alimentare, cosmetico e farmaceutico. Infatti, i nostri risultati hanno evidenziato che il nopal può servire come preziosa fonte di fibre alimentari, elementi inorganici, come Mg, K, Mn e Fe, e zuccheri monomerici che costituiscono peculiari carboidrati antiiperlipidemici e antiiperglicemici. La buccia del fico d'india sarebbe un altro prezioso sottoprodotto non solo per i suoi minerali e oligoelementi essenziali, ma anche per il suo profilo polifenolico, ricco di alcuni acidi fenolici e flavonoidi. Infine, i semi di *Opuntia* si sono dimostrati caratterizzati non solo da interessanti proteine, ma anche da notevoli lipidi e composizione in FA, che li rendono già notoriamente utili per la produzione di un olio di semi commestibile con alto grado di insaturazione.

Trattandosi di una specie predominante in tutta l'area mediterranea, è di fondamentale importanza investire nella ricerca di sottoprodotti di *O. ficus-indica* di diversa origine geografica e/o varietà, con l'obiettivo finale di valorizzarne le caratteristiche nutrizionali e potenziale funzionale e, non da ultimo, verso sistemi di economia circolare e redditizia.

6.3.5. Bibliografia

- Abdel-Hameed E.S.S., Nagaty M.A., Salman M.S., Bazaid S.A. Phytochemicals, nutritionals and antioxidant properties of two prickly pear cactus cultivars (*Opuntia ficus-indica* Mill.) growing in Taif, KSA. *Food Chem.* 2014;160:31–38. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.060.
- Albergamo A., Bartolomeo G., Messina L., Rando R., Di Bella G. Traceability of *Opuntia* spp. In: Ramadan M.F., Ayoub T.E.M., Rohn S., editors. *Opuntia spp.: Chemistry, Bioactivity and Industrial Applications*. Springer International Publishing; Cham, Switzerland: 2021. pp. 457–482.
- Albergamo A., Bua G.D., Rotondo A., Bartolomeo G., Annuario G., Costa R., Dugo G. Transfer of major and trace elements along the “farm-to-fork” chain of different whole grain products. *J. Food Comp. Anal.* 2018;66:212–220. doi: 10.1016/j.jfca.2017.12.026.
- Albergamo A., Costa R., Bartolomeo G., Rando R., Vadalà R., Nava V., Gervasi T., Toscano G., Germanò M.P., D’Angelo V., et al. Grape water: Reclaim and valorization of a by-product from the industrial cryoconcentration of grape (*Vitis vinifera*) must. *J. Sci. Food Agric.* 2020;100:2971–2981. doi: 10.1002/jsfa.10326.
- Albergamo A., Mottese A.F., Bua G.D., Caridi F., Sabatino G., Barrega L., Costa R., Dugo G. Discrimination of the Sicilian prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L., cv. Muscaredda) according to the provenance by testing unsupervised and supervised chemometrics. *J. Food Sci.* 2018;83:2933–2942. doi: 10.1111/1750-3841.14382.
- Albergamo A., Rotondo A., Salvo A., Pellizzeri V., Bua D.G., Maggio A., Cicero N., Dugo G. Metabolite and mineral profiling of “Violetto di Niscemi” and “Spinoso di Menfi” globe artichokes by 1H-NMR and ICP-MS. *Nat. Prod. Res.* 2017;31:990–999. doi: 10.1080/14786419.2016.1258563.
- Albergamo A., Vadalà R., Metro D., Nava V., Bartolomeo G., Rando R., Macrì A., Messina L., Gualtieri R., Colombo N., et al. Physicochemical, Nutritional, Microbiological, and Sensory Qualities of Chicken Burgers Reformulated with Mediterranean Plant Ingredients and Health-Promoting Compounds. *Foods.* 2021;10:2129. doi: 10.3390/foods10092129.
- Ali R.F., El-Anany A.M., Mousa H.M., Hamad E.M. Nutritional and sensory characteristics of bread enriched with roasted prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) seed flour. *Food Funct.* 2020;11:2117–2125. doi: 10.1039/C9FO02532D.

- Andreu-Coll L., Cano-Lamadrid M., Sendra E., Carbonell-Barrachina A., Legua P., Hernández F. Fatty acid profile of fruits (pulp and peel) and cladodes (young and old) of prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] from six Spanish cultivars. *J. Food Comp. Anal.* 2019;84:103294. doi: 10.1016/j.jfca.2019.103294.
- Angulo-Bejarano P.I., Martínez-Cruz O., Paredes-López O. Phytochemical content, nutraceutical potential and biotechnological applications of an ancient Mexican plant: Nopal (*Opuntia ficus-indica*) *Curr. Res. Nutr. Food Sci.* 2014;10:196–217. doi: 10.2174/157340131003140828121015.
- Arba M. The Potential of Cactus Pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) as Food and Forage Crop. In: Hirich A., Choukr-Allah R., Ragab R., editors. *Emerging Research in Alternative Crops*. Springer International Publishing; Cham, Switzerland: 2020. pp. 335–357.
- Arena G., Spada M.F., Nocifora R., Matera M. A proving of *Opuntia vulgaris*. *Homoeopath. Links.* 2006;19:e1–e3. doi: 10.1055/s-2006-924125.
- Ayadi M.A., Abdelmaksoud W., Ennouri M., Attia H. Cladodes from *Opuntia ficus-indica* as a source of dietary fiber: Effect on dough characteristics and cake making. *Ind. Crops Prod.* 2009;30:40–47. doi: 10.1016/j.indcrop.2009.01.003.
- Baldini M., Fabietti F., Giammarioli S., Onori R., Orefice L., Stacchini A. Analytical methods used in food chemical control. *Rapporti ISTISAN.* 1996;96/34:66–67.
- Beyzi E., Gunes A., Beyzi S.B., Konca Y. Changes in fatty acid and mineral composition of rapeseed (*Brassica napus* ssp. oleifera L.) oil with seed sizes. *Ind. Crop. Prod.* 2019;129:10–14. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.11.064.
- Bua G.D., Albergamo A., Annuario G., Zammuto V., Costa R., Dugo G. High-throughput ICP-MS and chemometrics for exploring the major and trace element profile of the Mediterranean sepia ink. *Food Anal. Methods.* 2017;10:1181–1190. doi: 10.1007/s12161-016-0680-6.
- Burlingame B., Dernini S. Sustainable diets: The Mediterranean diet as an example. *Public Health Nutr.* 2011;14:2285–2287. doi: 10.1017/S1368980011002527.
- Cardador-Martínez A., Jiménez-Martínez C., Sandoval G. Revalorization of cactus pear (*Opuntia* spp.) wastes as a source of antioxidants. *Food Sci. Technol.* 2011;31:782–788. doi: 10.1590/S0101-20612011000300036.
- Chiteva R., Wairagu N. Chemical and nutritional content of *Opuntia ficus-indica* (L.) *Afr. J. Biotechnol.* 2013;12:3309–3312.
- Chougui N., Tamendjari A., Hamidj W., Hallal S., Barras A., Richard T., Larbat R. Oil composition and characterisation of phenolic compounds of *Opuntia ficus-indica* seeds. *Food Chem.* 2013;139:796–803. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.01.054.
- Cicero N., Albergamo A., Salvo A., Bua G.D., Bartolomeo G., Mangano V., Rotondo A., Di Stefano V., Di Bella G., Dugo G. Chemical characterization of a variety of cold-pressed gourmet oils available on the Brazilian market. *Food Res. Int.* 2018;109:517–525. doi: 10.1016/j.foodres.2018.04.064.
- Ciriminna R., Fidalgo A., Avellone G., Danzi C., Timpanaro G., Locatelli M., Pagliaro M. Integral extraction of *Opuntia ficus indica* peel bioproducts via

microwave-assisted hydrodiffusion and hydrodistillation. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2019;7:7884–7891. doi: 10.1021/acssuschemeng.9b00502.

- Costa R., Albergamo A., Piparo M., Zaccone G., Capillo G., Manganaro A., Dugo P., Mondello L. Multidimensional gas chromatographic techniques applied to the analysis of lipids from wild-caught and farmed marine species. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2017;119:1600043. doi: 10.1002/ejlt.201600043.
- Costa R., Capillo G., Albergamo A., Li Volsi R., Bartolomeo G., Bua G., Ferracane A., Savoca S., Gervasi T., Rando R., et al. A multi-screening Evaluation of the Nutritional and Nutraceutical Potential of the Mediterranean Jellyfish *Pelagia noctiluca*. *Marine Drugs*. 2019;17:172. doi: 10.3390/md17030172.
- Dewanto V., Wu X., Adom K.K., Liu R.H. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:3010–3014. doi: 10.1021/jf0115589.
- Di Bella G., Licata P., Potortì A.G., Crupi R., Nava V., Qada B., Rando R., Bartolomeo G., Lo Turco V. Mineral content and physico-chemical parameters of honey from North regions of Algeria. *Nat. Prod. Res.* 2020:1–8. doi: 10.1080/14786419.2020.1791110.
- Di Bella G., Lo Vecchio G., Albergamo A., Nava V., Bartolomeo G., Macrì A., Bacchetta L., Lo Turco V., Potortì A.G. Chemical characterization of Sicilian dried nopal [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] *J. Food Comp. Anal.* 2021. in press.
- Di Bella G., Naccari C., Bua G.D., Rastrelli L., Lo Turco V., Potorti A.G., Dugo G. Mineral composition of some varieties of beans from Mediterranean and Tropical areas. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2016;67:239–248. doi: 10.3109/09637486.2016.1153610.
- Di Bella G., Potortì A.G., Beltifa A., Mansour H.B., Nava V., Lo Turco V. Discrimination of Tunisian Honey by Mineral and Trace Element Chemometrics Profiling. *Foods*. 2021;10:724. doi: 10.3390/foods10040724.
- Di Bella G., Turco V.L., Potortì A.G., Bua G.D., Fede M.R., Dugo G. Geographical discrimination of Italian honey by multi-element analysis with a chemometric approach. *J. Food Compos. Anal.* 2015;44:25–35. doi: 10.1016/j.jfca.2015.05.003.
- Dimić I., Teslić N., Putnik P., Bursać Kovačević D., Zeković Z., Šojić B., Mrkonjić Ž., Čolović D., Montesano D., Pavlić B. Innovative and conventional valorizations of grape seeds from winery by-products as sustainable source of lipophilic antioxidants. *Antioxidants*. 2020;9:568. doi: 10.3390/antiox9070568.
- Ding Y., Lin H.W., Lin Y.L., Yang D.J., Yu Y.S., Chen J.W., Chen Y.C. Nutritional composition in the chia seed and its processing properties on restructured ham-like products. *J. Food Drug Anal.* 2018;26:124–134. doi: 10.1016/j.jfda.2016.12.012.
- Dubois V., Breton S., Linder M., Fanni J., Parmentier M. Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2007;109:710–732. doi: 10.1002/ejlt.200700040.
- El Kossori R.L., Villaume C., El Boustani E., Sauvaire Y., Méjean L. Composition of pulp, skin and seeds of prickly pears fruit (*Opuntia ficus indica* sp.) *Plant Foods Hum. Nutr.* 1998;52:263–270. doi: 10.1023/A:1008000232406.

- El Mannoubi I., Barrek S., Skanji T., Casabianca H., Zarrouk H. Characterization of *Opuntia ficus indica* seed oil from Tunisia. *Chem. Nat. Compd.* 2009;45:616–620. doi: 10.1007/s10600-009-9448-1.
- El-Beltagi H.S., Mohamed H.I., Elmelegy A.A., Eldesoky S.E., Safwat G. Phytochemical screening, antimicrobial, antioxidant, anticancer activities and nutritional values of cactus (*Opuntia ficus-indica*) pulp and peel. *Fresenius Environ. Bull.* 2019;28:1545–1562.
- El-Mostafa K., El Kharrassi Y., Badreddine A., Andreoletti P., Vamecq J., El Kebbaj M., Cherkaoui-Malki M. Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules.* 2014;19:14879–14901. doi: 10.3390/molecules190914879.
- El-Safy F.S., Salem R.H., Abd El-Ghany M.E. Chemical and nutritional evaluation of different seed flours as novel sources of protein. *World J. Dairy Food Sci.* 2012;7:59–65.
- El-Said N.M., Nagib A.I., Rahman Z.A., Deraz S.F. Prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill] peels: Chemical composition, nutritional value, and protective effects on liver and kidney functions and cholesterol in rats. *Funct. Plant Sci. Biotechnol.* 2011;5:30–35.
- Ennouri M., Evelyne B., Laurence M., Hamadi A. Fatty acid composition and rheological behaviour of prickly pear seed oils. *Food Chem.* 2005;93:431–437. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.10.020.
- European Commission Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union.* 2006;364:5–24.
- European Commission Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods. *Off. J. Eur. Union.* 2006;404:9–25.
- Fernández-López J.A., Almela L., Obón J.M., Castellar R. Determination of antioxidant constituents in cactus pear fruits. *Plant. Foods Hum. Nutr.* 2010;65:253–259. doi: 10.1007/s11130-010-0189-x.
- Figueroa-Pérez M.G., Pérez-Ramírez I.F., Paredes-López O., Mondragón-Jacobo C., Reynoso-Camacho R. Phytochemical composition and in vitro analysis of nopal (*O. ficus-indica*) cladodes at different stages of maturity. *Int. J. Food Prop.* 2018;21:1728–1742. doi: 10.1080/10942912.2016.1206126.
- Forni E., Penci M., Polesello A. A preliminary characterization of some pectins from quince fruit (*Cydonia oblonga* Mill.) and prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) peel. *Carbohydr. Polym.* 1994;23:231–234. doi: 10.1016/0144-8617(94)90183-X.
- Ginestra G., Parker M.L., Bennett R.N., Robertson J., Mandalari G., Narbad A., Waldron K.W. Anatomical, chemical, and biochemical characterization of cladodes from prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] *J. Agric. Food Chem.* 2009;57:10323–10330. doi: 10.1021/jf9022096.
- Gouws C.A., D’Cunha N.M., Georgousopoulou E.N., Mellor D.D., Naumovski N. The effect of different drying techniques on phytochemical content and in vitro antioxidant properties of Australian-grown prickly pears (*Opuntia ficus indica*) *J. Food Process. Preserv.* 2019;43:e13900. doi: 10.1111/jfpp.13900.

- Guevara-Figueroa T., Jiménez-Islas H., Reyes-Escogido M.L., Mortensen A.G., Laursen B.B., Lin L.W., De León-Rodríguez A., Fomsgaard I.S., De La Rosa A.P.B. Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia* spp.) *J. Food Comp. Anal.* 2010;23:525–532. doi: 10.1016/j.jfca.2009.12.003.
- Habibi Y., Heux L., Mahrouz M., Vignon M.R. Morphological and structural study of seed pericarp of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. *Carbohydr. Polym.* 2008;72:102–112. doi: 10.1016/j.carbpol.2007.07.032.
- Hashempour-Baltork F., Torbati M., Azadmard-Damirchi S., Savage G.P. Chemical, rheological and nutritional characteristics of sesame and olive oils blended with linseed oil. *Adv. Pharm. Bull.* 2018;8:107. doi: 10.15171/apb.2018.013.
- Hernández-Urbiola M.I., Contreras-Padilla M., Pérez-Torrero E., Hernández-Quevedo G., Rojas-Molina J.I., Cortes M.E., Rodríguez-García M.E. Study of nutritional composition of nopal (*Opuntia ficus indica* cv. Redonda) at different maturity stages. *Open Nutr. J.* 2010;4:11–16. doi: 10.2174/1874288201004010011.
- Horwitz W., Latimer G. *AOAC Official Methods of Analysis*. 18th ed. Association of Official Analytical Chemists Arlington; Gaithersburg, MD, USA: 2012.
- Javardi M.S.M., Madani Z., Movahedi A., Karandish M., Abbasi B. The correlation between dietary fat quality indices and lipid profile with Atherogenic index of plasma in obese and non-obese volunteers: A cross-sectional descriptive-analytic case-control study. *Lipids Health Dis.* 2020;19:213. doi: 10.1186/s12944-020-01387-4.
- Kamaraj M., Nithya T.G., Chidambararajan P., Kebede M. Photocatalytic degradation of Bisphenol-A in water under sunlight irradiation over ZnO nanoparticles fabricated by Ethiopian cactus pear fruit peel infusions. *Optik.* 2020;208:164539. doi: 10.1016/j.ijleo.2020.164539.
- Kaul P. Nutritional potential, bioaccessibility of minerals and functionality of watermelon (*Citrullus vulgaris*) seeds. *LWT-Food Sci. Technol.* 2011;44:1821–1826.
- Kaur M., Kaur A., Sharma R. Pharmacological actions of *Opuntia ficus-indica*: A Review. *J. Appl. Pharm. Sci.* 2012;2:15–18. doi: 10.7324/JAPS.2012.2703.
- Khattak K.F., Rahman T.U. Analysis of vegetable's peels as a natural source of vitamins and minerals. *Int. Food Res. J.* 2017;24:292.
- Kotecka-Majchrzak K., Sumara A., Fornal E., Montowska M. Oilseed proteins—Properties and application as a food ingredient. *Trends Food Sci. Technol.* 2020;106:160–170. doi: 10.1016/j.tifs.2020.10.004.
- Lanuzza F., Occhiuto F., Monforte M.T., Tripodo M.M., D'Angelo V., Galati E.M. Antioxidant phytochemicals of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. cladodes with potential anti-spasmodic activity. *Pharmacogn. Mag.* 2017;13:S424.
- Lira-Ortiz A.L., Reséndiz-Vega F., Ríos-Leal E., Contreras-Esquivel J.C., Chavarría-Hernández N., Vargas-Torres A., Rodríguez-Hernández A.I. Pectins from waste of prickly pear fruits (*Opuntia albicarpa* Scheinvar 'Reyna'): Chemical and rheological properties. *Food Hydrocoll.* 2014;37:93–99. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.10.018.

- Lo Turco V., Potortì A.G., Rando R., Ravenda P., Dugo G., Di Bella G. Functional properties and fatty acids profile of different beans varieties. *Nat. Prod. Res.* 2016;30:2243–2248. doi: 10.1080/14786419.2016.1154056.
- Lo Turco V., Potortì A.G., Tropea A., Dugo G., Di Bella G. Element analysis of dried figs (*Ficus carica* L.) from the Mediterranean areas. *J. Food Comp. Anal.* 2020;90:103503. doi: 10.1016/j.jfca.2020.103503.
- López-García F., Jiménez-Martínez C., Guzmán-Lucero D., Maciel-Cerda A., Delgado-Macuil R., Cabrero-Palomino D., Terres-Rojas E., Arzate-Vázquez I. Physical and chemical characterization of a biopolymer film made with corn starch and nopal xocostle (*Opuntia joconsotle*) mucilage. *Rev. Mex. Ing. Quim.* 2017;16:147–158. doi: 10.24275/rmiq/Alim760.
- Marwa Z.M., Abd-Elnoor A.V. Housewives' knowledges and practices of utilizing prickly pear peels and its use in fortifying some bakery products (cake & biscuits): An applied study. *Home Econ. J.* 2020;36:163–196.
- Matthäus B., Özcan M.M. Habitat effects on yield, fatty acid composition and tocopherol contents of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L.) seed oils. *Sci. Hortic.* 2011;131:95–98. doi: 10.1016/j.scienta.2011.09.027.
- Medina E.D., Rodríguez E.R., Romero C.D. Chemical characterization of *Opuntia dillenii* and *Opuntia ficus-indica* fruits. *Food Chem.* 2007;103:38–45. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.06.064.
- Mehra M., Pasricha V., Gupta R.K. Estimation of nutritional, phytochemical and antioxidant activity of seeds of musk melon (*Cucumis melo*) and watermelon (*Citrullus lanatus*) and nutritional analysis of their respective oils. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 2015;3:98–102.
- Mondragon-Jacobo C., Perez-Gonzalez S. *Cactus (Opuntia spp.) as Forage*. Food and Agriculture Organization (FAO); Roma, Italia: 2001. [(accessed on 27 November 2021)]. Available online: <http://www.fao.org/3/a-y2808e.pdf>
- Mottese A.F., Albergamo A., Bartolomeo G., Bua G.D., Rando R., De Pasquale P., Saija E., Donato D., Dugo G. Evaluation of fatty acids and inorganic elements by multivariate statistics for the traceability of the Sicilian *Capparis spinosa* L. *J. Food Comp. Anal.* 2018;72:66–74. doi: 10.1016/j.jfca.2018.05.009.
- Mottese A.F., Fede M.R., Caridi F., Sabatino G., Marciandò G., Calabrese G., Albergamo A., Dugo G. Chemometrics and innovative multidimensional data analysis (MDA) based on multi-element screening to protect the Italian porcino (*Boletus sect. Boletus*) from fraud. *Food Control.* 2020;110:107004. doi: 10.1016/j.foodcont.2019.107004.
- Mouas N.T., Kabouche Z., Bellel N., Chertout L.K. *Opuntia ficus-indica* a Mediterranean Diet Product; Proceedings of the 1st International Electronic Conference on Biological Diversity, Ecology and Evolution; online. 15–31 March 2021;
- Moussa-Ayoub T.E., El-Samahy S.K., Kroh L.W., Rohn S. Identification and quantification of flavonol aglycons in cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) fruit using a commercial pectinase and cellulase preparation. *Food Chem.* 2011;124:1177–1184. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.07.032.
- Nefzaoui A., Ben Salem H. *Opuntia*: A strategic fodder and efficient tool to combat desertification in the WANA (West Asia/North Africa) region. [(accessed

on 27 November 2021)];FAO Plant Prod. Prot. Pap. 2001 Available online: <https://www.fao.org/3/y2808e/y2808e0d.html>

- Özcan M.M., Al Juhaimi F.Y. Nutritive value and chemical composition of prickly pear seeds (*Opuntia ficus-indica* L.) growing in Turkey. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2011;62:533–536. doi: 10.3109/09637486.2011.552569.
- Pairotti M.B., Cerutti A.K., Martini F., Vesce E., Padovan D., Beltramo R. Energy consumption and GHG emission of the Mediterranean diet: A systemic assessment using a hybrid LCA-IO method. *J. Clean. Prod.* 2015;103:507–516. doi: 10.1016/j.jclepro.2013.12.082.
- Patel S. *Opuntia cladodes* (nopal): Emerging functional food and dietary supplement. *Mediterr. J. Nutr. Metab.* 2014;7:11–19. doi: 10.3233/MNM-140003.
- Piga A. Cactus pear: A fruit of nutraceutical and functional importance. *J. Prof. Assoc. Cactus Dev.* 2004;6:9–22.
- Potortì A.G., Bua G.D., Lo Turco V., Tekaya A.B., Beltifa A., Mansour H.B., Di Bella G. Major, minor and trace element concentrations in spices and aromatic herbs from Sicily (Italy) and Mahdia (Tunisia) by ICP-MS and multivariate analysis. *Food Chem.* 2020;313:126094. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.126094.
- Potortì A.G., Di Bella G., Mottese A.F., Bua G.D., Fede M.R., Sabatino G., Lo Turco V. Traceability of Protected Geographical Indication (PGI) Interdonato lemon pulps by chemometric analysis of the mineral composition. *J. Food Comp. Anal.* 2018;69:122–128. doi: 10.1016/j.jfca.2018.03.001.
- Potortì A.G., Lo Turco V., Saitta M., Bua G.D., Tropea A., Dugo G., Di Bella G. Chemometric analysis of minerals and trace elements in Sicilian wines from two different grape cultivars. *Nat. Prod. Res.* 2017;31:1000–1005. doi: 10.1080/14786419.2016.1261341.
- Procacci S., Bojórquez-Quintal E., Platamone G., Maccioni O., Lo Vecchio V., Morreale V., Alisi C., Balducchi R., Bacchetta L. *Opuntia ficus-indica* pruning waste recycling: Recovery and characterization of mucilage from cladodes. *Nat. Resour.* 2021;12:91–107.
- Ramadan M.F., Mörsel J.T. Recovered lipids from prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill] peel: A good source of polyunsaturated fatty acids, natural antioxidant vitamins and sterols. *Food Chem.* 2003;83:447–456. doi: 10.1016/S0308-8146(03)00128-6.
- Ramírez-Moreno E., Marques C.D., Sánchez-Mata M.C., Goñi I. In vitro calcium bioaccessibility in raw and cooked cladodes of prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* L. Miller) *LWT-Food Sci. Technol.* 2011;44:1611–1615. doi: 10.1016/j.lwt.2011.01.001.
- Rayan A.M., Morsy N.E., Youssef K.M. Enrichment of rice-based extrudates with cactus *Opuntia dillenii* seed powder: A novel source of fiber and antioxidants. *J. Food Sci. Technol.* 2018;55:523–531. doi: 10.1007/s13197-017-2961-5.
- Razmaitė V., Pileckas V., Bliznikas S., Šiukšcius A. Fatty acid composition of *Cannabis sativa*, *Linum usitatissimum* and *Camelina sativa* seeds harvested in Lithuania for food use. *Foods.* 2021;10:1902. doi: 10.3390/foods10081902.
- Reda T.H., Atsbha M.K. Nutritional composition, antinutritional factors, antioxidant activities, functional properties, and sensory evaluation of cactus pear

(*Opuntia ficus-indica*) seeds grown in tigray region, Ethiopia. *Int. J. Food Sci.* 2019;2019:5697052. doi: 10.1155/2019/5697052.

- Rocchetti G., Pellizzoni M., Montesano D., Lucini L. Italian *Opuntia ficus-indica* cladodes as rich source of bioactive compounds with health-promoting properties. *Foods*. 2018;7:24. doi: 10.3390/foods7020024.
- Sáez-Almendros S., Obrador B., Bach-Faig A., Serra-Majem L. Environmental footprints of Mediterranean versus Western dietary patterns: Beyond the health benefits of the Mediterranean diet. *Environ. Health*. 2013;12:1–8. doi: 10.1186/1476-069X-12-118.
- Salim N., Abdelwaheb C., Rabah C., Ahcene B. Chemical composition of *Opuntia ficus-indica* (L.) fruit. *Afr. J. Biotechnol.* 2009;8:1623–1624.
- Sawaya W.N., Khahl J.K., Al-Mohammad M.M. Nutritive value of prickly pear seeds, *Opuntia ficus-indica*. *Plants Food Hum. Nutr.* 1983;33:91–97. doi: 10.1007/BF01093742.
- Scarano P., Naviglio D., Prigioniero A., Tartaglia M., Postiglione A., Sciarrillo R., Guarino C. Sustainability: Obtaining natural dyes from waste matrices using the prickly pear peels of *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller. *Agronomy*. 2020;10:528. doi: 10.3390/agronomy10040528.
- Serra-Majem L., Tomaino L., Dernini S., Berry E.M., Lairon D., Ngo de la Cruz J., Trichopoulou A. Updating the mediterranean diet pyramid towards sustainability: Focus on environmental concerns. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2020;17:8758. doi: 10.3390/ijerph17238758.
- Siano F., Straccia M.C., Paolucci M., Fasulo G., Boscaino F., Volpe M.G. Physico-chemical properties and fatty acid composition of pomegranate, cherry and pumpkin seed oils. *J. Sci. Food Agric.* 2016;96:1730–1735. doi: 10.1002/jsfa.7279.
- Simopoulos A.P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed. Pharmacother.* 2002;56:365–379. doi: 10.1016/S0753-3322(02)00253-6.
- Zouhri M.A., Anouar A. Bioflocculants extraction from Cactaceae and their application in treatment of water and wastewater. *J. Water Process. Eng.* 2015;7:306–313.

6.4. Cladodi di *Opuntia ficus indica* come substrato di fermentazione di *Lactobacillus acidophilus* La5 per la produzione di acido lattico

6.4.1. Introduzione

Opuntia ficus-indica (OFI) è una pianta tipica delle aree semi-aride e aride dell'America centrale (Messico), dell'Africa e dei paesi del Mar Mediterraneo (Mohamed-Yasseen *et al.*, 1995; Adli *et al.*, 2017). La pianta presenta diversi elementi vegetativi: i frutti (fico d'india) e i fusti metamorfosati detti cladodi. Queste parti sono state impiegate per secoli e possono essere utilizzate in diversi ambiti: farmaceutico, come nutraceutico e, non ultimo, come prodotto alimentare destinato sia al consumo animale che umano (Mohamed-Yasseen *et al.*, 1995; Adli *et al.*, 2017). Recentemente, i cladodi sono stati impiegati per produrre acido lattico da materia prima lignocellulosica poco costosa, suscitando grande interesse. L'acido lattico rappresenta uno degli acidi organici più noti con un ampio spettro di utilizzo industriale, spesso utilizzato nelle filiere produttive alimentari, chimiche, cosmetiche e farmaceutiche. L'acido lattico deriva dalla sintesi chimica o dalla fermentazione microbica. La parte principale dell'acido lattico artificiale è prodotta dalla fermentazione batterica. Serve come acidificante alimentare ed è una base usata frequentemente per la sintesi chimica (Derabli *et al.*, 2017).

La domanda globale di acido lattico aumenterà nei prossimi anni come stimato da alcuni ricercatori (da 1220,0 a 1960 kilotoni nel periodo 2016-2025) a causa dell'importanza dell'acido polilattico per i prodotti verdi (Alves *et al.*, 2017). La possibilità di utilizzare il sottoprodotto agricolo e agroalimentare al posto delle materie prime come substrato per il processo di fermentazione potrebbe essere un vantaggio ecologico ed economico. La natura complessa della biomassa lignocellulosica, rappresentata da diversi polisaccaridi (principalmente cellulosa, emicellulosa) e un polimero aromatico (lignina), costituisce un ostacolo ad una facile fermentazione. Il pretrattamento prima dell'idrolisi enzimatica e della fermentazione aiuta i batteri produttori di acido lattico (LAB) a idrolizzare e fermentare direttamente i polisaccaridi presenti nella lignocellulosa (Tamine *et al.*, 2018). Recentemente, l'attenzione è stata rivolta a nuove fonti di carbonio per produrre diversi metaboliti. I cladodi costituiscono un substrato conveniente e adatto per prodotti nutraceutici ad alta concentrazione di zucchero e un substrato adatto per la fermentazione batterica (Magarelli *et al.*, 2022). I lattobacilli sono quasi tutti gram-positivi e producono acido lattico come prodotto finale del metabolismo fermentativo. In particolare, i batteri dell'acido lattico (LAB) fermentano gli zuccheri e producono acido lattico attraverso tre percorsi: Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) o via della glicolisi, via della

fosfochetolasi (PK) e via del pentoso fosfato. A causa dei percorsi e dei prodotti finali della fermentazione, i LAB sono divisi in LAB omofermentanti ed eterofermentanti (Ajala *et al.*, 2020). I batteri che generano acido lattico solo dopo la fermentazione sono detti omofermentanti; i LAB che producono CO₂, H₂O₂, acido acetico e alcol insieme all'acido lattico sono detti eterofermentanti.

L. acidophilus LA-5 è un batterio omofermentativo e utilizza il glucosio attraverso la via Embden Meyerhof Parnas (EMP) (Bujna *et al.*, 2018; Gervasi *et al.*, 2022).

La nostra ricerca mira a studiare i sottoprodotti di *Opuntia ficus-indica* come substrati grezzi economici per la produzione di acido lattico utilizzando *Lactobacillus acidophilus* LA-5 senza integrazione di nutrienti nel terreno di coltura. L'idrolisi e la fermentazione separate (SHF) dei cladodi pretrattati con acido diluito è stata valutata per produrre acido lattico.

6.4.2. Materiali e metodi

6.4.2.1. Matrice

I cladodi di OFI raccolti nel mese di maggio 2022, nella zona di Milazzo (Messina, Italia), sono stati lavati, tagliati in piccoli pezzi, asciugati a bassa temperatura (40°C) per circa 72 ore. Infine, i campioni essiccati sono stati macinati e passati attraverso un setaccio da 150 mesh per ottenere polveri fini. Il

campione è stato quindi conservato a temperatura ambiente fino al momento dell'uso.

6.4.2.2. Pretrattamento della biomassa

La polvere di *O. ficus-indica* cladode è stata pretrattata come descritto da Kuloyo *et al.* (2014).

In breve, la polvere è stata incubata con una soluzione acquosa all'1,5% (w/w) di H₂SO₄ per una notte e quindi sterilizzata a 121°C per 15 minuti.

Dopo il pretrattamento acido è stata eseguita un'idrolisi enzimatica. In particolare, il pH del liquame è stato regolato a 5,0 con NaOH (3M) ed è stata utilizzata una miscela enzimatica di cellulasi (15 FPU), β-glucosidasi (15 IU) e pectinasi (100 U) per g di sostanza secca. L'idrolisi enzimatica è stata eseguita per 48 ore a 50 °C a 300 rpm. La sospensione è stata conservata a -20°C fino all'ulteriore utilizzo. Questo idrolizzato è stato utilizzato come mezzo di fermentazione senza integrazione di nutrienti.

6.4.2.3. Condizioni di crescita del ceppo batterico

Il *Lactobacillus acidophilus* LA-5 è stato isolato da una sospensione commerciale (Solgar Italia Multinutrient S.p.A. Italia).

Il microrganismo è stato coltivato su de Man, Rogosa e Sharpe Broth (MRS) a pH 7,0, 37 °C, per 24 ore utilizzando giare

anaerobiche contenenti confezioni di gas anaerobico (Oxoid AnaeroGen 3.5L, Thermo Scientific™, Milano, Italia) su un agitatore rotante (New Brunswick, USA) a 150 giri/min. C. Il terreno di coltura è stato centrifugato a 3000 rpm per 15 minuti e lavato due volte con soluzione fisiologica normale sterile. Infine, il pellet è stato risospeso nella normale soluzione fisiologica sterile per ottenere circa 1×10^6 CFU/mL di *L. acidophilus* LA-5 attivo. Questo è stato utilizzato come inoculo per le prove di fermentazione. La crescita di *Lactobacillus acidophilus* LA-5 è stata eseguita mediante conta su piastra su MRS Agar. I conteggi sono stati espressi come log CFU/mL (il log delle unità formanti colonie per millilitro di mezzo di fermentazione).

6.4.2.4. Test di fermentazione

I test di fermentazione, utilizzando cladodi idrolizzati come materia prima per il *Lactobacillus acidophilus* LA-5, sono stati eseguiti in beute Erlenmeyer da 250 ml contenenti 100 ml di terreno di coltura in condizioni anaerobiche a 37° C, con un'agitazione di 150 rpm (dati non riportati). È stato utilizzato il 10% dell'inoculo. Quindi, il test è stato scalato in un bioreattore Biostat-B da 5 L (Sartorius Stedim Biotech, Gottingen, Germania). Il bioreattore era dotato di due turbine Rushton a quattro pale e dei tipici sistemi di controllo, tra cui temperatura, pH, pO₂ e un rilevatore di schiuma. Sono state utilizzate le

seguenti condizioni di coltura: volume di lavoro 2L, 37°C, pH regolato a 7 con NaOH, agitazione a 150 rpm per 24 ore. Le condizioni anaerobiche sono state mantenute spruzzando il recipiente con azoto gassoso privo di ossigeno a 15 ml/min. I campioni (5 ml) sono stati prelevati dal bioreattore all'inizio (T0) e dopo un periodo di incubazione di 24 ore.

6.4.2.5. Composizione prossimale

La determinazione della composizione prossimale dei cladodi è stata effettuata secondo i metodi dell'Association of Official Analytical Chemist (AOAC) (2005). In particolare, i campioni di cladodi sono stati analizzati per ceneri, fibre, zuccheri riducenti totali e proteine prima e dopo il pretrattamento.

La determinazione delle ceneri grezze è stata effettuata secondo i metodi ufficiali AOAC 923.03.

La fibra alimentare totale è stata valutata secondo i metodi ufficiali AOAC 991.43 (First Action 1991) e il metodo AACC 32-07.01 (Final Approval 10-16-91) utilizzando i kit di analisi Megazyme K-TDFR (Megazyme International Ireland Ltd, Wicklow, Irlanda).

Il contenuto di azoto è stato determinato mediante una procedura standard secondo il metodo ufficiale standard AOAC 990.03, con valori proteici espressi come Nx6.25.

6.4.2.6. Elementi minerali

L'analisi degli elementi minerali è stata eseguita utilizzando uno spettrometro ICP-MS iCAP-Q (Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia), secondo il metodo utilizzato da Lo Vecchio et al., (2021) Brevemente 0,5 g di campione sono stati mineralizzati con 7 mL di HNO₃ e 2 mL di H₂O₂ in un sistema di digestione a microonde Ethos 1 (Milestone, Bergamo, Italia). Le condizioni erano: temperatura di 0-200°C in 10 min; 200 ° C per 15 minuti con una potenza del microonde di 1500 W. I campioni digeriti sono stati quindi diluiti fino a 25 ml con acqua ultrapura e filtrati utilizzando un filtro da 0,45 µm. Le stesse condizioni sono state utilizzate per lavorare il materiale di riferimento certificato (foglie di spinaci NIST1570A). Per l'analisi è stato utilizzato uno spettrometro ICP-MS iCAP Q, le condizioni operative erano le seguenti: potenza a radiofrequenza incidente (RF) 1500 W, flusso di gas plasma argon (Ar) a 15 L/min, portata di gas ausiliario (Ar) 0,9 L/min e portata del gas di trasporto (Ar) 1,10 L/min. Il gas della cella di collisione era l'elio (He, 4 mL/min) e la camera di nebulizzazione era impostata a 2 °C. Il volume di iniezione e la velocità di introduzione del campione erano rispettivamente di 200 µL e 1 ml/min.

L'acquisizione degli spettri è stata eseguita in modalità full scan (tempo di permanenza 0,5 o 0,1 s/punto, a seconda dell'analita). Tutti i campioni sono stati testati in triplicato e l'acquisizione

dei dati è stata condotta tramite Qtegra™ Intelligent Scientific Data Solution (Thermo Scientific™).

6.4.2.7. Zuccheri riducenti

La determinazione qualitativa e quantitativa degli zuccheri riducenti è stata condotta utilizzando test enzimatici utilizzando i kit di Megazyme (Megazyme Ltd., Bray, Irlanda).

6.4.2.8. Determinazione dell'acido lattico

La concentrazione dell'acido lattico prodotto è stata determinata con il metodo descritto da Darwin *et al.* (2019). In breve, il campione prelevato dal brodo di fermentazione dopo 24h è stato centrifugato a 4000 rpm per 5 minuti e filtrato con filtri da 0,22 µm. Quindi, 420 µL di acido periodico (100 mM) e 300 µL di acido formico (10%) sono stati aggiunti a 720 µL sia di standard che di campioni, in provette con tappo a vite. Queste provette sono state poste a 100°C per 60 minuti in un bagno, quindi raffreddate e poste a 4°C per 20 minuti. La determinazione dell'acido lattico è stata eseguita utilizzando un gascromatografo (GC) dotato di un iniettore split/splitless e un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) (Dani Master GC1000, Dani Instrument, Milano, Italia). È stata utilizzata una colonna capillare Supelco SPB-1, 15 m × 0,20 mm ID, 0,20 µm di spessore del film (Supelco, Sigma Aldrich, USA). L'elio è stato utilizzato come gas di trasporto con una portata di 0,5 ml/min e

il campione è stato suddiviso 100: 1 all'ingresso. Il volume di iniezione è stato fissato a 0,4 μL . Il tempo di esecuzione è stato programmato a 12,54 min.

La temperatura del forno è stata programmata come segue: temperatura iniziale 50°C; tenuto per 2,0 minuti; rampa di temperatura da 70°C/min a 130°C; tenuto per 5,0 min; rampa di temperatura da 50°C/min a 250°C; tenuto per 2,0 min. Le temperature dell'iniettore e del rivelatore sono state impostate rispettivamente a 250 e 300 °C. Le portate di idrogeno e aria al FID sono state impostate rispettivamente a 40 e 280 ml/min. L'acquisizione e la gestione dei dati sono state eseguite utilizzando il software Clarity Chromatography v4.0.2. Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato insieme a bianchi analitici.

6.4.2.9. Parametri cinetici

La resa in acido lattico (g/g) è stata calcolata sulla base dello zucchero consumato, ed è definita come il rapporto tra acido lattico prodotto (g/L) e quantità di zucchero consumato (g/l).

La produttività (δ) (g/L.h) dell'acido lattico è stata calcolata come rapporto tra la concentrazione di acido lattico (g/L) e il tempo di fermentazione.

6.4.2.10. Analisi statistica

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti almeno due volte con tre repliche e i risultati sono stati presentati in base alle medie \pm deviazione standard (SD).

6.4.3. Risultati

6.4.3.1. Composizione prossimale

I cladodi di *O. ficus-indica* utilizzati nel presente lavoro sono stati caratterizzati per la composizione prossimale che è riportata in Tabella 1.

Parametro (g/100g, dw)	cladodi OFI (presente studio)	cladodi OFI (Kuloyo <i>et al.</i> , 2014)	cladodi OFI (Ginestra <i>et al.</i> , 2009)	cladodi OFI (Derabli <i>et al.</i> , 2022)
Umidità ^a	84 \pm 0.05	88–95	n.a	89.12
Fibre ^b	41 \pm 1.2			na
Ceneri ^b	23 \pm 1.3	16.8	n.a	na
Proteine ^b	2.18 \pm 1.05	7.5	6.42	8.6
pH	5.5			
Zuccheri totali	30.62 \pm 2.18	42	26	11.31

Tabella 1: Composizione prossimale dei cladodi di *O. ficus-indica*

a % Peso fresco.

b % peso secco.

dw: Peso a secco.

I valori rappresentano la media \pm la deviazione standard calcolata da tre determinazioni

6.4.3.2. Elementi minerali

Il contenuto di minerali dei cladodi di *O. ficus-indica* è mostrato nella Tabella 3. Come si può vedere dai risultati ottenuti gli elementi più presenti sono stati Mg (25,56 mg/100g) e K (500,12 mg/100g).

Minerali (mg/100g dw)	Risultati
K	500.12±15.55
Mg	25.56±3.55
Na	1.32± 0.13
Mn	4.11± 0.06
Zn	0.99± 0.06
Fe	1.32± 0.13

Tabella 3: Elementi minerali dei cladodi di *Opuntia-ficus indica*

6.4.3.3. Zuccheri totali e riducenti

I cladodi di *O. ficus-indica* presentavano una concentrazione di zuccheri riducenti di 6,90 g/L. Quelli più abbondanti erano glucosio (3,90 g/L) e maltosio (3,00 g/L), seguiti dall'arabinosio (2,95 g/L). La concentrazione zuccherina totale di *O. ficus-indica*, dopo l'idrolisi acida ed enzimatica, era di 32,8 g/L di cui 28,45 g/L erano zuccheri riducenti, principalmente maltosio (14,9% w/w) e glucosio (13,55%, w/w). I risultati ottenuti sono riportati in tabella 2.

Zuccheri (g/L)	Prima del trattamento	Dopo il trattamento
Glucosio	3.90	13.55
Maltosio	3.00	14.9
Arabinosio	2.95	4.35
Zuccheri totali ^b	9.85	32.8
Zuccheri totali fermentabili ^c	6.9	28.45

Tabella 2: Composizione zuccherina (g/L) del mezzo idrolizzato (OFI) utilizzato negli esperimenti di fermentazione. I valori rappresentano la media ± la deviazione standard calcolata da tre determinazioni.

6.4.3.4. Crescita di *Lactobacillus acidophilus* La 5

Il pretrattamento termico e con acido diluito unitamente al trattamento enzimatico, eseguito secondo Kuloyo *et al.* (2014), consentono di ottenere un substrato a basso costo per la crescita di *Lactobacillus* e la produzione di acido lattico. La conta di *Lactobacillus* da 6,03 log CFU/mL è stata registrata a 8,1 log CFU/mL dopo 24 ore di incubazione. La resa e la produttività in acido lattico erano rispettivamente di circa 0,63 g/g e 0,73 g/L.h. La concentrazione massima di acido lattico è risultata essere di 17,5 g/L (Figura 1; Figura 2).

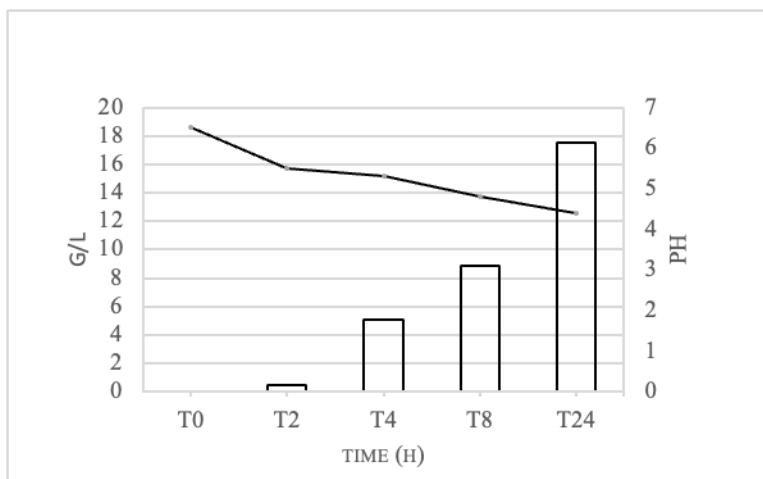


Figura 1: Variazione del pH e dell'acido lattico durante la fermentazione dell'idrolizzato OFI. Colonne: acido lattico; linea: pH

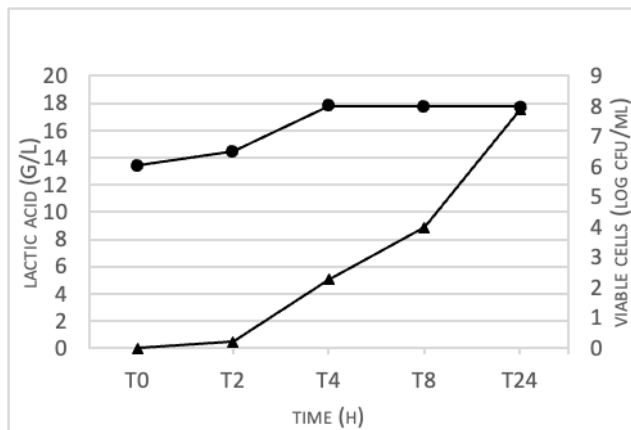


Figura 2: Dinamica dell'acido lattico (▲) durante la fermentazione dell'idrolizzato OFI e conteggio di *Lactobacillus* (●).

6.4.4. Discussioni

Sulla base dell'analisi del contenuto proteico, i valori ottenuti di circa 2,18% sono inferiori a quelli riportati da Derabli *et al.* (2022), Tamine *et al.* (2018), e Kuloyo *et al.* (2014).

È noto che il contenuto di minerali dei cladodi nopali è influenzato da vari fattori tra cui la varietà delle piante, la regione di coltivazione, la qualità dell'acqua, il suolo, le pratiche di coltivazione e lo stadio di maturazione (Rodríguez-García *et al.*, 2007; Hernández-Urbiola *et al.*, 2010; Contreras-Padilla *et al.*, 2011). I principali elementi minerali nei cladodi sono potassio, magnesio e sodio. Invece ferro, zinco e manganese si trovano solitamente in piccole quantità. La letteratura ha riportato che l'*Opuntia* è una buona fonte di macroelementi (calcio, sodio, potassio e magnesio) (Missaoui *et al.*, 2020). Tuttavia, altri autori hanno riportato che questi minerali possono essere trovati sotto forma di carbonati, cloruri, solfati e fosfati (Rodríguez-García *et al.*, 2007; Hernández-Urbiola *et al.*, 2010). I risultati di questo

studio hanno mostrato che i cladodi di *O. ficus-indica* sono una buona fonte di elementi minerali per i LAB. Il K presente in alte concentrazioni nei cladodi di OFI gioca un ruolo fondamentale in quanto rappresenta la principale molecola di segnalazione citoplasmatica che, attivando e/o inducendo enzimi e sistemi di trasporto, permette alla cellula di adattarsi ad un'elevata osmolarità (Epstein *et al.*, 2003). Inoltre, i cladodi di *O. ficus-indica* possedevano alti contenuti di Mg e Na, rispettivamente di 25,56 e 1,32 mg/100 g. Questi risultati sono in linea con El-Mostafa *et al.*, (2014), che hanno riportato intervalli tra 0,3 e 0,4 mg/100 g per Na, tra 2,35 e 55,20 mg/100 g per K e tra 0,19 e 0,29 mg/100 g per Mg, 0,09 mg /100g per Fe, 0,08 mg/100g per Zn e 8,8 mg/100g per Mn. Tuttavia, per il motivo precedentemente spiegato, la composizione minerale variava rispetto ai risultati di Derabli *et al.*, (2022) e Jana *et al.* (2012), che riportavano maggiori quantità minerali di Mg e K.

Le determinazioni degli zuccheri totali e riducenti sono state effettuate prima e dopo il pretrattamento. Sebbene il contenuto zuccherino totale (di circa il 40%), sia inferiore a quello di alcune altre materie prime lignocellulosiche convenzionali (Kuloyo *et al.*, 2014; Anwar *et al.*, 2014), *O. ficus-indica* rappresenta una biomassa lignocellulosica commercialmente interessante con un alto potenziale di utilizzo come materia prima sostenibile per una varietà di prodotti (Derabli *et al.*, 2022; Kuloyo *et al.*, 2014; Ginestra *et al.*, 2009). Per rendere accessibile la struttura

lignocellulosica sono necessari efficaci pretrattamenti prima dell'idrolisi enzimatica. Come riportato in precedenza il pretrattamento con acido diluito, che, per applicazioni industriali, è una procedura più favorevole rispetto a quello con acido concentrato ed è stato ampiamente studiato per un'ampia gamma di pretrattamento di materie prime lignocellulosiche, consente di solubilizzare la frazione emicellulosica della biomassa rendendo la cellulosa più accessibile agli enzimi (Dahman *et al.*, 2019). L'idrolisi enzimatica è stata effettuata dopo il pretrattamento con acido diluito ed è stata eseguita per favorire il rilascio di monosaccaridi dalla cellulosa cristallina e dall'emicellulosa. La presenza di lignina ed emicellulosa rende la biomassa lignocellulosica più complessa di quella della pura cellulosa. Questi componenti non glucanici come la lignina hanno un effetto significativo sull'idrolisi di numerosi substrati cellulosici. In particolare, la lignina può svolgere un ruolo di barriera fisica, restringendo l'accesso delle cellulasi alla cellulosa. Inoltre, il grado di polimerizzazione e la disposizione molecolare possono influenzare la resistenza delle fibre di cellulosa (Derabli *et al.*, 2022). L'idrolizzato OFI è stato utilizzato per la crescita e per la produzione di acido lattico di *L. acidophilus* LA-5. Questo microrganismo, come altri LAB omo-fermentanti obbligati, è caratterizzato da fermentazione omo-lattica. Questo, per mole di glucosio consumato, dovrebbe teoricamente produrre 2 moli di acido lattico con una resa teorica di 1 g di prodotto per g di

substrato. Tuttavia, le rese sperimentali sono generalmente comprese tra 0,74 e 0,99 g/g perché una porzione (0,07–0,22 g/g) della fonte di carbonio viene utilizzata per la produzione di biomassa (Bintsis *et al.*, 2018). Precedenti studi hanno mostrato l'uso di *Lactobacillus acidophilus* LA-5 per ottenere succhi fermentati con acido lattico con una maggiore durata di conservazione (Buruleanu *et al.*, 2013). Questo microrganismo è stato ampiamente utilizzato e studiato per la sua produzione di metaboliti bioattivi, responsabili delle sue proprietà antimicrobiche e salutari e anche della sua capacità di ridurre l'aflatossina M1 (Amiri *et al.*, 2021) e l'acrilammide (Petka *et al.*, 2022). Tuttavia, sebbene molti altri prodotti di scarto siano stati valutati per il loro potenziale (Mangano *et al.*, 2021), nessuna letteratura riporta l'uso di LA-5 e acido lattico nella gestione e valorizzazione dei rifiuti alimentari in preziosi bioprodotto. Una vasta letteratura ha dimostrato che la materia prima potrebbe potenzialmente essere utilizzata come fonte di carbonio nella produzione di acido lattico da batteri dell'acido lattico utilizzati in mono (Derabli *et al.*, 2022; Tamine *et al.*, 2018) e colture miste (Buina *et al.*, 2018). Inoltre, data la loro elevata produttività annua, i cladodi sono un substrato interessante ea basso costo come integratori alimentari o per processi fermentativi (Derabli *et al.*, 2022; Tamine *et al.*, 2018, Kuloyo *et al.*, 2014).

6.4.5. Conclusioni

Il bisogno sempre crescente di materiali più sostenibili è la sfida dei nostri giorni. L'utilizzo degli scarti di potatura dei cladodi OFI, oltre a consentire il contenimento degli scarti agroalimentari, grazie alle sue caratteristiche, potrebbe essere un modo innovativo di generare substrati utili in vari ambiti. La nostra attenzione è stata rivolta all'utilizzo di cladodi essiccati come substrato di fermentazione per la produzione di acido lattico, che può essere utilizzato in vari campi. Il risultato dello studio implica che l'idrolizzato OFI può essere efficacemente utilizzato come unica fonte di carbonio per produrre acido lattico. L'elevata concentrazione di lignocellulosa nel cladodo è essenziale per la produzione di zuccheri fermentescibili in seguito ai processi di idrolisi acida ed enzimatica. Il *Lactobacillus acidophilus* La5, utilizzato per la fermentazione, è un microrganismo omofermentativo con elevata capacità di produzione di acido lattico. La nostra ricerca ha confermato il suo potenziale insieme a una biomassa così economica per ottenere una produzione sostenibile di acido lattico. Risolvere i problemi associati alla produzione su scala industriale di un tale substrato verde è la chiave dell'ultimo decennio. Insieme ad altri gruppi di ricerca come quelli di Derabli *et al.*, (2022), Tamine *et al.*, (2018) e Kuloyo *et al.*, (2014), stiamo cercando di tracciare la strada verso un futuro più sostenibile e green.

6.4.6. Bibliografia

- Adli, B.; Boutekrabt, A.; Touati, M.; Bakria, T.; Touati, A.; Bezini, E. Phenotypic diversity of *Opuntia ficus indica* (L.) MILL. in the Algerian steppe. *South African Journal of Botany* 2017, 109, 66-74.
- Ajala, E.O.; Olonade, Y.O.; Ajala, M.A.; Akinpelu, G.S. Lactic acid production from lignocellulose—A review of major challenges and selected solutions. *ChemBioEng Reviews* 2020, 7, 38-49.
- Alves, F.; De Andrade, A.; Bruno, R.; Dos Santos, D.; Magalhães, A.; Da Silva, D. Chemical and nutritional variability of cactus pear cladodes, genera *Opuntia* and *Nopalea*. 2017.
- Amiri, S.; Mokarram, R.R.; Khiabani, M.S.; Bari, M.R.; Alizadeh, M. Optimization of food-grade medium for co-production of bioactive substances by *Lactobacillus acidophilus* LA-5 for explaining pharmabiotic mechanisms of probiotic. *Journal of Food Science and Technology* 2021, 58, 1-12.
- Anwar, Z.; Gulfraz, M.; Irshad, M. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: a brief review. *Journal of radiation research and applied sciences* 2014, 7, 163-173.
- Bintsis, T. Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS microbiology* 2018, 4, 665.
- Bujna, E.; Farkas, N.A.; Tran, A.M.; Dam, M.S.; Nguyen, Q.D. Lactic acid fermentation of apricot juice by mono-and mixed cultures of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Food science and biotechnology* 2018, 27, 547-554.
- Buruleanu, L.C.; Bratu, M.G.; Manea, L.; Avram, D.; Nicolescu, C.L. Fermentation of vegetable juices by *Lactobacillus acidophilus* LA-5. *Lactic Acid Bacteria-R & D for Food, Health and Livestock Purposes*; Kongo, M., Ed 2013, 173-194.
- Contreras-Padilla, M.; Perez-Torrero, E.; Hernández-Urbiola, M.I.; Hernández-Quevedo, G.; del Real, A.; Rivera-Muñoz, E.M.; Rodríguez-García, M.E. Evaluation of oxalates and calcium in nopal pads (*Opuntia ficus-indica* var. *redonda*) at different maturity stages. *Journal of Food Composition and Analysis* 2011, 24, 38-43.

- Dahman, Y.; Dignan, C.; Fiayaz, A.; Chaudhry, A. An introduction to biofuels, foods, livestock, and the environment. In Biomass, biopolymer-based materials, and bioenergy; Elsevier: 2019; pp. 241-276.
- Darwin, D. Rapid determination of lactic acid in anaerobic biological treatment process using a portable sensitive lactate biosensor. *BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology* 2019, 100.
- Derabli, B.; Nancib, A.; Nancib, N.; Aníbal, J.; Raposo, S.; Rodrigues, B.; Boudrant, J. *Opuntia ficus indica* waste as a cost effective carbon source for lactic acid production by *Lactobacillus plantarum*. *Food Chemistry* 2022, 370, 131005.
- El-Mostafa, K.; El Kharrassi, Y.; Badreddine, A.; Andreoletti, P.; Vamecq, J.; El Kebbaj, M.H.S.; Latruffe, N.; Lizard, G.; Nasser, B.; Cherkaoui-Malki, M. Nopal cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a source of bioactive compounds for nutrition, health and disease. *Molecules* 2014, 19, 14879-14901.
- Epstein, W. The Roles and Regulation of Potassium in Bacteria. In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*; Academic Press: 2003; Volume 75, pp. 293-320.
- Gervasi, C.; Pellizzeri, V.; Vecchio, G.L.; Vadalà, R.; Foti, F.; Tardugno, R.; Cicero, N.; Gervasi, T. From by-product to functional food: the survival of *L. casei shirota*, *L. casei immunitas* and *L. acidophilus johnsonii*, during spray drying in orange juice using a maltodextrin/pectin mixture as carrier. *Natural Product Research* 2022, 1-8, doi:10.1080/14786419.2022.2032049.
- Ginestra, G.; Parker, M.L.; Bennett, R.N.; Robertson, J.; Mandalari, G.; Narbad, A.; Lo Curto, R.B.; Bisignano, G.; Faulds, C.B.; Waldron, K.W. Anatomical, chemical, and biochemical characterization of cladodes from prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.]. *J Agric Food Chem* 2009, 57, 10323-10330.
- Hernández-Urbiola, M.; Contreras-Padilla, M.; Pérez-Torrero, E.; Hernández-Quevedo, G.; Rojas-Molina, J.; Cortes, M.; Rodríguez-García, M. Study of nutritional composition of nopal (*Opuntia ficus indica* cv. Redonda) at different maturity stages. *The Open Nutrition Journal* 2010, 4.
- Jana, S. Nutraceutical and functional properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) and its utilization for food applications. *Journal of Engineering Research and Studies* 2012, 3, 60-66.

- Kuloyo, O.O.; Du Preez, J.C.; García-Aparicio, M.d.P.; Kilian, S.G.; Steyn, L.; Görgens, J. *Opuntia ficus-indica* cladodes as feedstock for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2014, 30, 3173-3183.
- Lo Vecchio, G.; Cicero, N.; Nava, V.; Macrì, A.; Gervasi, C.; Capparucci, F.; Sciortino, M.; Avellone, G.; Benameur, Q.; Santini, A. Chemical Characterization, Antibacterial Activity, and Embryo Acute Toxicity of *Rhus coriaria* L. Genotype from Sicily (Italy). *Foods* 2022, 11, 538.
- Magarelli, R.A.; Trupo, M.; Ambrico, A.; Larocca, V.; Martino, M.; Palazzo, S.; Balducchi, R.; Joutsjoki, V.; Pihlanto, A.; Bevivino, A. Designing a Waste-Based Culture Medium for the Production of Plant Growth Promoting Microorganisms Based on Cladodes Juice from *Opuntia ficus-indica* Pruning. *Fermentation* 2022, 8, 225.
- Mangano, V.; Gervasi, T.; Rotondo, A.; De Pasquale, P.; Dugo, G.; Macrì, F.; Salvo, A. Protein hydrolysates from anchovy waste: purification and chemical characterization. *Natural Product Research* 2021, 35, 399-406, doi:10.1080/14786419.2019.1634711.
- Missaoui, M.; D'Antuono, I.; D'Imperio, M.; Linsalata, V.; Boukhchina, S.; Logrieco, A.F.; Cardinali, A. Characterization of micronutrients, bioaccessibility and antioxidant activity of prickly pear cladodes as functional ingredient. *Molecules* 2020, 25, 2176.
- Mohamed-Yasseen, Y.; Barringer, S.A.; Splittstoesser, W.E.; Schnell, R.J. Rapid propagation of tuna (*Opuntia ficus-indica*) and plant establishment in soil. *Plant cell, tissue and organ culture* 1995, 42, 117-119.
- Nguyen, B.T.; Bujna, E.; Fekete, N.; Tran, A.T.; Rezessy-Szabo, J.M.; Prasad, R.; Nguyen, Q.D. Probiotic beverage from pineapple juice fermented with *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Frontiers in nutrition* 2019, 6, 54.
- Petka, K.; Sroka, P.; Tarko, T.; Duda-Chodak, A. The Acrylamide Degradation by Probiotic Strain *Lactobacillus acidophilus* LA-5. *Foods* 2022, 11, 365.
- Rodríguez-García, M.; De Lira, C.; Hernández-Becerra, E.; Cornejo-Villegas, M.; Palacios-Fonseca, A.; Rojas-Molina, I.; Reynoso, R.; Quintero, L.; Del-Real, A.; Zepeda, T. Physicochemical characterization of nopal pads (*Opuntia ficus indica*)

and dry vacuum nopal powders as a function of the maturation. *Plant Foods for Human Nutrition* 2007, 62, 107-112.

- Tamine, M.; Nancib, A.; Nancib, N.; Boudrant, J. Prickly pear cactus as a raw material for lactic acid production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Malaysian Journal of Microbiology* 2018, 14, 16-24.

6.5. Da sottoprodotto ad alimento funzionale: la sopravvivenza di *L. casei shirota*, *L. casei immunitas* e *L. acidophilus johnsonii*, durante l'essiccazione a spruzzo in succo d'arancia utilizzando una miscela maltodestrina/pectina come vettore

6.5.1. Introduzione

Negli ultimi anni, c'è stato un crescente interesse per la qualità degli alimenti lungo tutta la filiera e anche per i prodotti alimentari funzionali (Terpou *et al.* 2019). Nel mercato degli alimenti funzionali, in particolare nel mercato globale degli integratori alimentari probiotici, dal 2015 al 2025, le previsioni economiche prevedono un aumento da 3,3 a 7 miliardi di dollari (Terpou *et al.* 2019).

Vasta letteratura riporta gli effetti benefici del succo d'arancia e dei suoi componenti attivi (Cardile *et al.* 2015; Cirimi *et al.* 2021). La polvere di arancia con l'aggiunta di probiotici e prebiotici si è dimostrata un prodotto ideale innovativo e potenzialmente funzionale (Barbosa *et al.* 2015). Uno dei principali integratori alimentari di vitamina C, è il succo

d'arancia, la cui produzione presenta però diversi svantaggi come la breve conservabilità e le costose condizioni di trasporto. La possibilità di ottenere una polvere di arancia molto più stabile con caratteristiche probiotiche e prebiotiche migliorate si tradurrebbe in un prodotto salutare interessante e innovativo.

La FAO e l'OMS definiscono i "probiotici" come "microrganismi vivi che, se somministrati in quantità adeguate, conferiscono un beneficio per la salute all'ospite" (FAO/WHO 2002). I benefici dei probiotici si basano sulla sopravvivenza di queste colture batteriche o di lieviti nel tratto gastrointestinale e sulla loro capacità di idrolizzare i biopolimeri in metaboliti più piccoli e prontamente utilizzabili e di provocare una colonizzazione competitiva. I microrganismi probiotici esercitano effetti benefici a livello globale su diversi sistemi dell'ospite, rappresentando potenziali terapie contro le malattie legate alla colite, all'obesità, allo stress e ai disturbi neurologici (Cukkemane *et al.* 2020).

Un alimento probiotico dovrebbe contenere microrganismi probiotici vitali in numero di circa 10^6 e 10^7 ufc/g o ml fino al momento del consumo e devono rimanere vitali durante il passaggio attraverso il tratto gastrointestinale. Inoltre, i prodotti probiotici erano originariamente a base di latticini fermentati, ma ad oggi sono disponibili in commercio diversi integratori alimentari probiotici non caseari.

L'International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) ha definito i prebiotici dietetici come "un substrato che viene utilizzato selettivamente dai microrganismi ospiti conferendo un beneficio per la salute" (Gibson *et al.* 2017).

La pectina, il componente strutturale della parete cellulare di molte piante, è un polisaccaride eterogeneo costituito da legami lineari di acido galatturonico. Questo costituente è anche riconosciuto come prebiotico, cioè migliora la salute dell'ospite stimolando la crescita e l'attività di specifici batteri nel colon. Ad oggi può essere utilizzato non solo come agente gelificante e addensante in vari prodotti alimentari (Willats *et al.* 2006), ma anche nell'incapsulamento di farmaci e come vettore nell'essiccazione spray di estratti vegetali appiccicosi (Sansone *et al.* 2011).

L'essiccazione a spruzzo è un potente strumento utilizzato per trasformare prodotti alimentari liquidi in polvere secca di alta qualità ea basso costo. Il processo consiste nel pompaggio del campione liquido, che viene nebulizzato in piccole goccioline, che poi perdono la loro umidità a contatto con l'aria calda e secca. Per prevenire la collosità, che è un limite nell'essiccazione a spruzzo di prodotti alimentari ricchi di zucchero, è richiesto l'uso di agenti essiccanti ad alto peso molecolare come le maltodestrine (Fazaeli *et al.* 2012; Caliskan Koc, e Dirim 2013). In questo studio sono state utilizzate le

maltodestrine, anch'esse prebiotiche riconosciute, insieme alle pectine, che erano state ottenute dalla buccia d'arancia biologica. La sfida incoraggiante viene sia dalla produzione di un prodotto innovativo, a base di succo d'arancia integrato con probiotici e prebiotici, sia dalla possibilità di promuovere la valorizzazione di un sottoprodotto favorendo la sostenibilità della filiera alimentare, che ad oggi è una preoccupazione crescente. La buccia d'arancia rappresenta circa il 20% delle arance e nel 2018 è stata stimata una produzione di 15,10 Mt di buccia d'arancia (Ayala *et al.* 2021). Gli studi hanno riportato diverse potenziali strategie di valorizzazione della buccia d'arancia, dal suo utilizzo come mezzo di fermentazione e crescita (Carota *et al.* 2020), come fonte di oli essenziali a valore aggiunto (Gavahian *et al.* 2019) o come biocatalizzatore nella deacetilazione reazione (Fontana *et al.* 2020). È stata studiata la sopravvivenza di *L. casei shirota*, *L. casei immunitas* e *L. acidophilus johnsonii*, ottenuti da prodotti commerciali durante l'essiccazione tramite spray drying di un succo d'arancia commerciale, utilizzando maltodestrine con pectina, ottenuta da bucce d'arancia organiche, come agente essiccante. In questo studio sono stati considerati anche il colore e il contenuto di vitamina C delle polveri.

6.5.2. Materiali e metodi

6.5.2.1. Ceppi batterici

In questo studio sono stati utilizzati i ceppi probiotici *Lactobacillus casei shirota*, isolato da Yakult®, il *Lactobacillus casei immunitas* (DN-114 001), isolato da Actimel® e il *L. acidophilus johnsonii*, da GSE acidophilus (Prodeco pharma ®).

I microrganismi sono stati coltivati su 200 ml di de Man-Rogosa-Sharpe Broth (MRS, Oxoid Ltd, Hampshire, UK) per 16 ore a 37°C in condizioni aerobiche. Le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione a 5000 rpm, 30 min, 37°C, (Awel MF 20-R), lavate due volte con soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) prima dell'uso. La crescita cellulare è stata valutata attraverso la densità ottica a 600 nm (FLUOstar Omega BMG Labtech). I ceppi di lattobacilli sono stati preliminarmente trattati termicamente (52 °C, 15 min) prima del processo di essiccazione a spruzzo secondo Paéz *et al.* (2012).

6.5.2.2. Succo di arancia e pectine

È stato utilizzato succo d'arancia fresco commerciale (Simone Gatto s.r.l.). Campioni di succo di diversi lotti di produzione sono stati raggruppati in una bottiglia sterile. I frutti di arancia biologica (*Citrus sinensis*) utilizzati per l'estrazione della pectina sono stati ottenuti dal mercato locale della frutta. La loro buccia è stata rimossa, tritata grossolanamente (5-6 mm) ed essiccata in forno

alla temperatura di 105°C per 2 ore e poi macinata da un omogeneizzatore per ottenere una polvere. L'estrazione della pectina è stata eseguita secondo il metodo descritto da Kute *et al.*, (2020) utilizzando apparecchiature a microonde domestiche, a una frequenza di lavoro di 2450 MHz e una potenza massima di 800 W, con potenza delle microonde e tempo di irradiazione regolabili (Kute *et al.*, 2020). La buccia d'arancia è stata essiccata in forno ad una temperatura di 105°C per 2 ore e poi macinata da un omogeneizzatore per ottenere una polvere. Circa 50 g di polvere di buccia d'arancia essiccata sono stati aggiunti a 1000 mL di acqua distillata (pH 1,5) e la miscela è stata esposta al riscaldamento a microonde a 540 W per 5 min. Il campione è stato quindi raffreddato e centrifugato a 4°C, 8000 rpm per 10 min (Awel MF 20-R). Il residuo insolubile è stato recuperato e il surnatante è stato precipitato con un volume equivalente di etanolo al 95% (v/v). La massa di pectina coagulata è stata lavata tre volte con etanolo al 95% (v/v) per rimuovere i mono e i disaccaridi e liofilizzata in un liofilizzatore da laboratorio (Büchi B-191 Mini Spray Dryer, Büchi LaboratoriumsTecnik, Flawil, Svizzera) a - 40 °C per 24 ore. I campioni sono stati quindi pesati ed è stata calcolata la resa in pectina. La pectina secca è stata macinata in un mulino analitico, confezionata e sigillata in sacchetti laminati di alluminio.

6.5.2.3. Preparazione della soluzione e *spray drying*

Le cellule raccolte nella fase stazionaria sono state pretrattate e risospese in 200 ml della soluzione finale.

Gli agenti essiccanti, costituiti da maltodestrine con destrosio equivalente (DE) 10 e pectine, utilizzando un rapporto in peso M/P di 10:1 (11% p/v), sono stati aggiunti al succo in un rapporto di 1:1 (sostanza secca del succo:MP). Questa miscela è stata sciolta con agitazione magnetica a temperatura ambiente ed è stato aggiunto il 10% di etanolo (96% v/v) per aumentare l'evaporazione dell'acqua durante il processo di essiccazione a spruzzo.

La soluzione è stata alimentata in un mini-spray dryer Büchi B-191 su scala pilota (Büchi Laboratoriums-Technik, Flawil, Svizzera), mediante una pompa peristaltica a 10 rpm e una portata costante di 5 mL/min e nebulizzata in piccole goccioline sotto le seguenti condizioni sperimentali: temperatura di ingresso 120°C; temperatura di mandata 69÷71°C; portata spray 5 ml/min; diametro ugello 0,5 mm; flusso di azoto essiccante 30 - 40 l/h, aspiratore 100%, pressione del vuoto circa 500 MPa. Le polveri essiccate sono state raccolte in un unico sistema di separazione dell'aria a ciclone. Per ogni esperimento sono stati utilizzati 100 ml di mangime e ripetuto tre volte. Durante 180 giorni di conservazione, ogni campione essiccato è stato conservato in contenitori di plastica, ermeticamente chiusi in buste di plastica a temperatura ambiente ed a 4°C. Le polveri essiccate sono state analizzate

immediatamente e dopo il periodo di stoccaggio. La resa in essiccazione è stata determinata come rapporto % tra la polvere solida recuperata dopo l'essiccamento e la frazione in peso solido totale contenuta nella sospensione liquida (sostanza secca di succo d'arancia, maltodestrina e pectina).

6.5.2.4. Test di dissoluzione

In una provetta, 50 mg di ciascun campione sono stati miscelati con 1 mL di acqua distillata utilizzando un vortice a velocità dimezzata. La dissoluzione è stata misurata come il tempo (in secondi) impiegato per dissolvere completamente le polveri (Quek *et al.*, 2007).

6.5.2.5. Determinazione della vitamina C

La determinazione della vitamina C è stata condotta attraverso il metodo titrimetrico ufficiale AOAC (AOAC, 2005).

6.5.2.6. Enumerazione dei batteri lattici vitali

L'enumerazione dei microrganismi vitali è stata eseguita nel succo d'arancia, nelle polveri subito dopo l'essiccamento ed a 30-90-120 e 180 giorni di conservazione. I campioni essiccati sono stati reidratati con PBS per 1 ora a 37°C, quindi diluiti e piastrati su MRS agar (Oxoid). La conta cellulare è stata eseguita dopo incubazione a 37 °C per 48 h e il cfu/mL è stato calcolato. I test sono stati condotti in triplice copia.

6.5.2.7. Analisi statistica

I risultati sono stati presentati come media \pm deviazione standard (SD) eseguendo gli esperimenti in triplice copia. I calcoli statistici sono stati eseguiti utilizzando SigmaPlot. ANOVA unidirezionale con t-test sono stati utilizzati per testare il significato delle differenze nella sopravvivenza di *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei immunitas* (DN-114 001) e *Lactobacillus acidophilus johnsonii* durante le due condizioni di conservazione, temperatura ambiente e 4°C.

6.5.3. Risultati e discussioni

Lo studio è stato condotto al fine di promuovere l'innovazione di processo e di prodotto attraverso la produzione di un nuovo prodotto alimentare funzionale che promuova la sostenibilità della catena alimentare. Questo rappresenta l'aspetto più importante, ad oggi attivamente preso in considerazione dalla comunità scientifica (Smeriglio *et al.* 2016; Gervasi *et al.* 2018), non solo per la sua rilevanza dal punto di vista economico ma anche ambientale e pubblico quello sanitario. Studi precedenti hanno mostrato la possibilità di sviluppare una polvere di succo d'arancia con caratteristiche funzionali (Barbosa *et al.* 2015). Inoltre, diversi studi suggeriscono che alcuni ceppi di batteri dell'acido lattico possono essere essiccati a spruzzo senza una drastica perdita di vitalità e attività (Favaro-Trindade e Grosso 2002; Gomez *et al.* 2013). La resa in pectina era di circa il 14%, questi risultati sono

paragonabili a quelli riportati da Kute *et al.* (2020). Lo studio indaga la possibilità di utilizzare la pectina insieme alla maltodestrina come agenti essiccanti e la loro influenza sulla vitalità dei lattobacilli durante l'essiccazione a spruzzo in una matrice non casearia. Dato che la pectina è stata ottenuta da arance biologiche, non sono state effettuate analisi tossicologiche, tuttavia, per l'uso sicuro di questo sottoprodotto nell'industria alimentare, dovrebbe essere eseguita un'analisi completa dei pesticidi quando l'origine del prodotto è sconosciuta (Calvaruso *et al.* 2020). Le polveri testate contenenti *L. casei shirota*, *L. casei immunitas* e *L. acidophilus johnsonii* non hanno mostrato differenze significative per ciascuno dei parametri testati.

Il test di dissoluzione, che rappresenta il tempo necessario affinché la polvere ottenuta sia completamente ricostituita in acqua, è in linea con studi precedenti, in cui sono stati descritti i tempi di dissoluzione (circa 20 s) per le polveri spray dry, in particolare per quelle che erano state ottenute utilizzando temperature di ingresso più basse (Quek *et al.* 2007). Non sono state osservate differenze tra ciascun microrganismo nel recupero della vitamina C, nelle rese di essiccazione e nella conta cellulare. La resa secca e il contenuto di vitamina C sono stati studiati e sono presentati nella Tabella 1. La resa di essiccazione ottenuta per le polveri di succo d'arancia con *L. casei shirota* variava tra il 60% e il 65% con *L. casei immunitas* tra il 63% e il 68% e con *L. acidophilus johnsonii* tra il 59% e il 65%.

	<i>L. casei shirota</i>	<i>L. casei immunitas</i>	<i>L. acidophilus johnsonii</i>
Resa a secco	60-65%	63-68%	59-65%
Vitamina C	90-93%	89-92%	93-96%

Tabella 1: Resa a secco e contenuto di vitamina C.

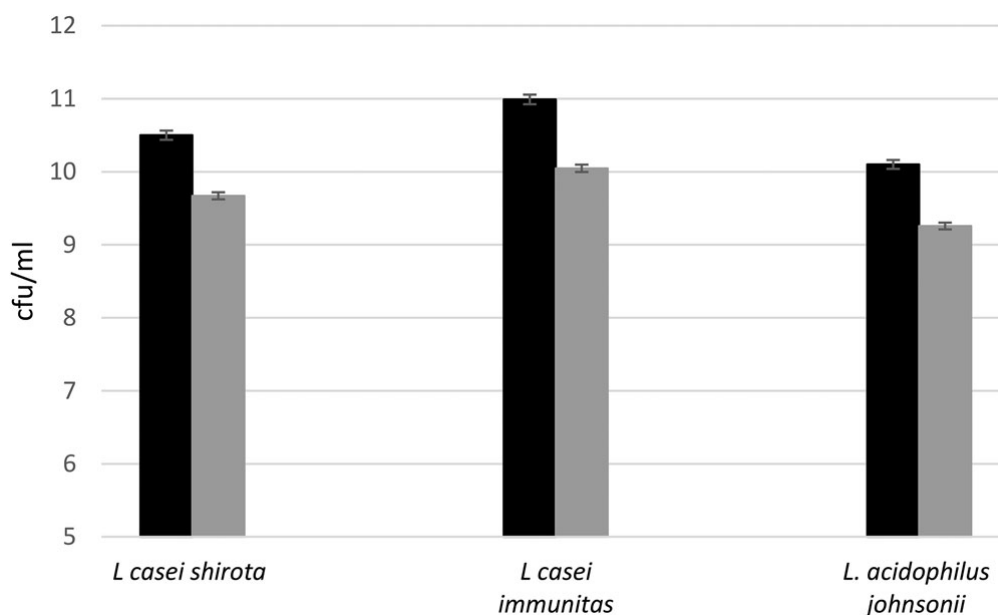


Figura 1: Conta cellulare di *L. casei shirota*, *L. casei immunitas* e *L. acidophilus johnsonii*, prima (barra nera) e dopo (barra grigia) essiccamento spray drying.

Come riportato da Bhandari, in un essiccatore spray drying su scala di laboratorio è considerato efficiente un recupero di polvere del 50% (Bhandari *et al.* 1997). Inoltre, il recupero di vitamina C potrebbe essere considerato efficiente oscillando tra il 90% e il 96% in tutte le polveri analizzate. I conteggi cellulari osservati per i tre LAB prima e dopo l'essiccazione e alla fine del periodo di conservazione sono riportati nelle Figure 1 e 2.

È stata osservata una piccola riduzione della vitalità cellulare dopo il processo di essiccazione e nessuna differenza significativa tra i

tre microrganismi ($P > 0.5$). Dopo l'essiccazione, tutte le polveri sono state poste in sacchetti di polietilene e conservate a 4°C ed a temperatura ambiente, durante le quali è stata valutata la vitalità probiotica (Figura 1).

La sopravvivenza sia durante la conservazione a temperatura ambiente che a 4°C è risultata significativamente elevata per tutti e tre i microrganismi fino a 60 giorni. La vitalità dei batteri durante la conservazione a 4°C ha mostrato differenze significative ($P < 0,5$) rispetto a quella osservata durante la conservazione a temperatura ambiente per ogni campione testato da 30 a 180 giorni (Figura 2a-c). In linea con studi precedenti (Gardiner et al. 2000; Barbosa et al. 2015) la conservazione a 4°C ha consentito le migliori condizioni di sopravvivenza.

È stato riportato che l'applicazione di un lieve trattamento termico prima dell'essiccazione e la scelta di utilizzare microrganismi raccolti nella fase stazionaria migliorano la sopravvivenza cellulare durante il processo di essiccazione a spruzzo e la successiva conservazione (Corcoran *et al.* 2004; Paez *et al.* 2012).

In precedenza, gli studi hanno dimostrato come l'essiccazione mediante *spray drying* sia uno strumento interessante per produrre un prodotto probiotico, come un succo d'arancia in polvere, preservando le caratteristiche fisiche e nutrizionali del prodotto e la sopravvivenza delle colture probiotiche aggiunte (Barbosa *et al.* 2015). Questo metodo risulta molto interessante sia per la tecnologia di essiccazione, che è un processo rapido, economico,

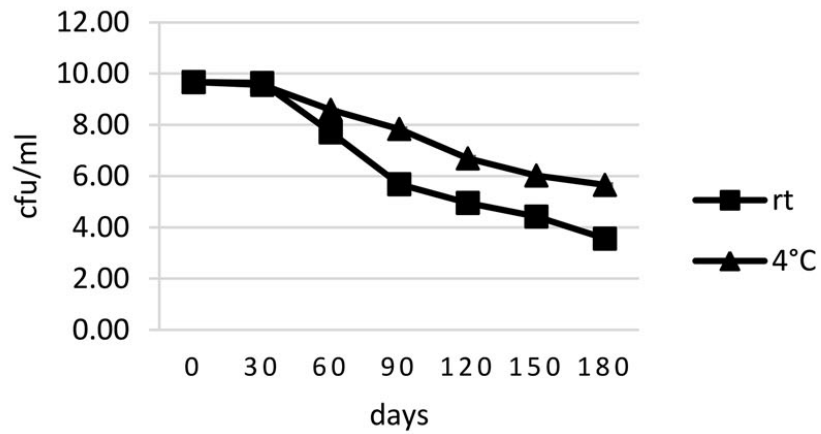
riproducibile e scalabile, sia per la produzione di pectina attraverso la valorizzazione della buccia d'arancia biologica.

In precedenza, l'uso di una matrice a base di maltodestrina/pectina per la sua capacità di incapsulare i batteri dell'acido lattico (Slavutsky *et al.* 2017; Rodrigues *et al.* 2020) o per trasportare estratti sensibili ricchi di polifenoli mediante essiccazione a spruzzo (Sansone *et al.* 2011). Negli ultimi anni, l'interesse della comunità scientifica per la valorizzazione dei sottoprodotti è rapidamente aumentato (Smeriglio *et al.* 2019; Gervasi *et al.* 2020; Mangano *et al.* 2021).

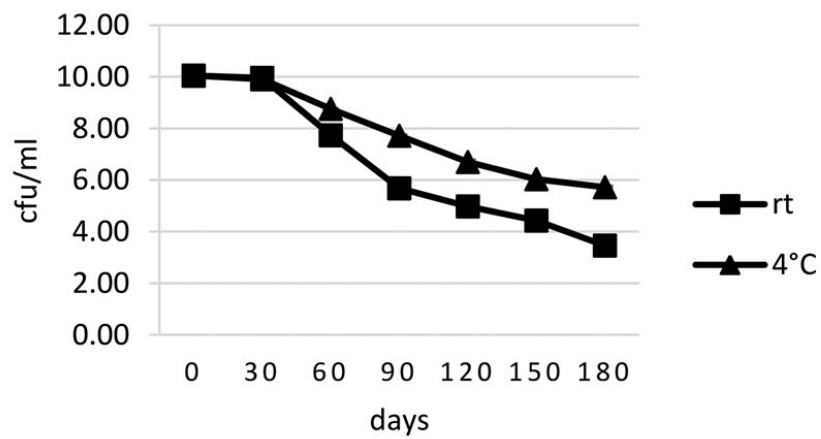
Questo studio è finalizzato a sostenere la ricerca applicata e l'innovazione tecnologica allo sviluppo economico, all'implementazione tecnologica e all'innovazione di prodotto nel campo delle biomolecole funzionali e, subordinatamente, in quello del recupero di sottoprodotti industriali.

In conclusione, questo studio, mostrando la produzione di una polvere di arancia funzionale, ha evidenziato la possibilità di potenziare la pectina ottenuta dall'agroindustria alimentare, utilizzando una miscela maltodestrina/pectina con un rapporto in peso 10:1 come supporto nel processo di atomizzazione.

(a)



(b)



(c)

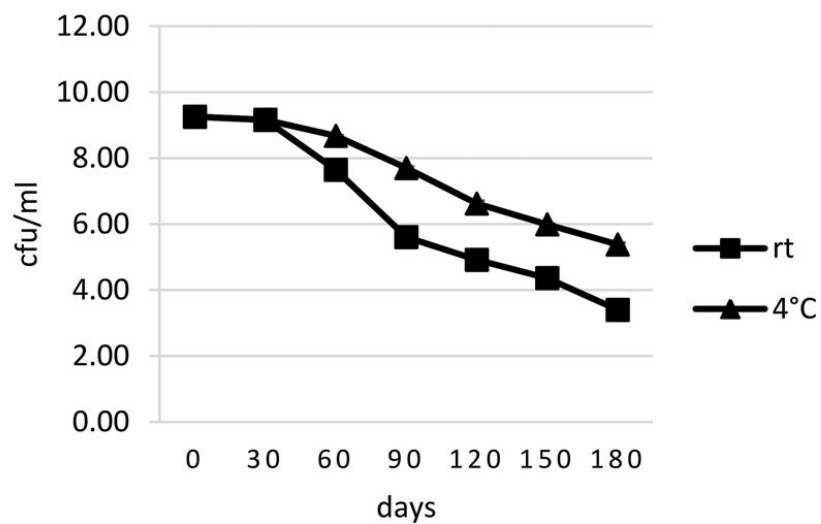


Figura 2: Sopravvivenza di *L. casei shirota* (a), *L. casei immunitas* (b) e *L. acidophilus johnsonii* (c), durante la conservazione a temperatura ambiente (quadrato) e 4 C (triangolo) fino a 180 giorni.

6.5.4. Bibliografia

- Ayala JR, Montero G, Coronado MA, Garc_ia C, Curiel-Alvarez MA, Le_on JA, Sagaste CA, Montes DG. 2021. Characterization of orange peel waste and valorization to obtain reducing sugars. *Molecules* (Basel, Switzerland). 26(5):1348.
- Barbosa J, Borges S, Teixeira P. 2015. Influence of sub-lethal stresses on the survival of lactic acid bacteria after spray-drying in orange juice. *Food Microbiol.* 52:77–83.
- Bhandari B, Datta N, Crooks R, Howes T, Rigby S. 1997. A semi-empirical approach to optimise the quantity of drying AIDS required to spray dry sugar-rich foods. *Drying Technol.* 15(10): 2509–2525.
- Caliskan Koc, G, Dirim N. 2013. The effects of the different drying conditions and the amounts of maltodextrin addition during spray drying of sumac extract. *Food Bioprod Process.* 91: 539–548.
- Calvaruso E, Cammilleri G, Pulvirenti A, Lo Dico GM, Lo Cascio G, Giaccone V, Vitale Badaco V, Cipr. V, Alessandra MM, Vella A, et al. 2020. Residues of 165 pesticides in citrus fruits using LC-MS/MS: a study of the pesticides distribution from the peel to the pulp. *Nat Prod Res.* 34(1):34–38.
- Cardile V, Graziano ACE, Venditti A. 2015. Clinical evaluation of Moro (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) orange juice supplementation for the weight management. *Nat Prod Res.* 29(23):2256–2260.
- Carota E, Petruccioli M, D'Annibale A, Gallo AM, Crognale S. 2020. Orange peel waste-based liquid medium for biodiesel production by oleaginous yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol.* 104(10):4617–4628.
- Cirimi S, Randazzo B, Russo C, Musumeci L, Maugeri A, Montalbano G, Guerrera MC, Lombardo GE, Levanti M. 2020. Anti-inflammatory effect of a flavonoid-rich extract of orange juice in adult zebrafish subjected to *Vibrio anguillarum*-induced enteritis. *Nat Prod Res.* 35(23): 5350–5354.
- Corcoran BM, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. 2004. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *J Appl Microbiol.* 96(5):1024–1039.
- Cukkemane A, Kumar P, Sathyamoorthy B. 2020. A metabolomics footprint approach to understanding the benefits of synbiotics in functional foods and dietary therapeutics for health, communicable and non-communicable diseases. *Food Res Int.* 128:108679.
- FAO/WHO. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food, (London Ontario, Canada). The Journal Impact Factor (JIF) is a journal-level metric calculated from data indexed in the Web of Science Core Collection. It should be used with careful attention to the many factors
- Favaro-Trindade CS, Grosso CR. 2002. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *J Microencapsul.* 19(4):485–494.
- Fazaeli M, Emam-Djomeh Z, Kalbasi-Ashtari A, Omid M. 2012. Effect of process conditions and carrier concentration for improving drying yield and other quality attributes of spray dried black mulberry (*Morus nigra*) juice. *Int J Food Eng.* 8(1):1–20.

- Fontana G, Bruno M, Maggio A, Rosselli S. 2020. Functional investigation and applications of the acetylsterase activity of the *Citrus sinensis* (L.) Osbeck peel. *Nat Prod Res*:1–6 35(22):4502- 4507
- Gavahian M, Chu Y-H, Mousavi Khaneghah A. 2019. Recent advances in orange oil extraction: an opportunity for the valorisation of orange peel waste a review. *Int J Food Sci Technol*. 54(4): 925–932.
- Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, Scott K, Stanton C, Swanson KS, Cani PD, et al. 2017. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 14(8):491–502.
- Gardiner G, O’Sullivan E, Kelly J, Auty M, Fitzgerald G, Collins J, Ross RP, Stanton C. 2000. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. *Appl Environ Microbiol*. 66(6):2605–2612.
- Gervasi T, Pellizzeri V, Benameur Q, Gervasi C, Santini A, Cicero N, Dugo G. 2018. Valorization of raw materials from agricultural industry for astaxanthin and b-carotene production by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Nat Prod Res*. 32(13):1554–1561.
- Gervasi T, Santini A, Daliu P, Salem AZM, Gervasi C, Pellizzeri V, Barrega L, De Pasquale P, Dugo G, Cicero N. 2020. Astaxanthin production by *Xanthophyllomyces dendrorhous* growing on a low cost substrate. *Agroforest Syst*. 94(4):1229–1234.
- Gomez B, Gull B, Ya~nez R, Parajo JC, Alonso JL. 2013. Pectic oligosacharides from lemon peel wastes: production, purification, and chemical characterization. *J Agric Food Chem*. 61(42): 10043–10053.
- Kute AB, Mohapatra D, Kotwaliwale N, Giri SK, Sawant BP. 2020. Characterization of pectin extracted from orange peel powder using microwave-assisted and acid extraction methods. *Agric Res*. 9(2):241–248.
- Mangano V, Gervasi T, Rotondo A, De Pasquale P, Dugo G, Macr_1 F, Salvo A. 2021. Protein hydrolysates from anchovy waste: purification and chemical characterization. *Nat Prod Res*. 35(3): 399–406.
- Paez R, Lavari L, Vinderola G, Audero G, Cuatrin A, Zaritzky N, Reinheimer J. 2012. Effect of heat treatment and spray drying on lactobacilli viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion. *Food Res Int*. 48(2):748–754.
- Quek SY, Chok NK, Swedlund P. 2007. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. *Chem Eng Process*. 46(5):386–392.
- Rodrigues FJ, Cedran MF, Bicas JL, Sato H. 2020. Encapsulated probiotic cells: relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications – a narrative review. *Food Res Int*. 137:109682.
- Sansone F, Mencherini T, Picerno P, d’Amore M, Aquino RP, Lauro MR. 2011. Maltodextrin/pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts. *J Food Eng*. 105(3): 468–476.
- Slavutsky AM, Ch_avez MC, Favaro-Trindade CS, Bertuzzi MA. 2017. Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* in a pilot-plant spray-dryer. effect of process parameters on cell viability. *J Food Process Eng*. 40(2): e12394.

- Smeriglio A, Cornara L, Denaro M, Barreca D, Burlando B, Xiao J, Trombetta D. 2019. Antioxidant and cytoprotective activities of an ancient Mediterranean citrus (*Citrus lumia* Risso) albedo extract: microscopic observations and polyphenol characterization. *Food Chem.* 279:347–355.
- Smeriglio A, Mandalari G, Bisignano C, Filocamo A, Barreca D, Bellocco E, Trombetta D. 2016. Polyphenolic content and biological properties of Avola almond (*Prunus dulcis* Mill. D.A. Webb) skin and its industrial byproducts. *Ind Crops Prod.* 83 :283–293.
- Terpou A, Papadaki A, Lappa IK, Kachrimanidou V, Bosnea LA, Kopsahelis N. 2019. Probiotics in food systems: significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value. *Nutrients.* 11(7):1591.
- Willats WGT, Knox JP, Mikkelsen JD. 2006. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. *Trends Food Sci Technol.* 17(3):97–104.

6.6. Caratterizzazione chimica, attività antibatterica e tossicità embrionale acuta di *Rhus coriaria* L. Genotipo della Sicilia (Italia)

6.6.1. Introduzione

Rhus coriaria L., comunemente nota come sommacco, è una pianta tipica originaria di un vasto areale che si estende dalle Isole Canarie sulla costa mediterranea fino all'Iran e all'Afghanistan. Il suo nome deriva da “sumaga”, che significa rosso in siriano (Wetherilt *et al.*, 1994). Tra le specie di sommacco, *R. coriaria* L. ha la maggiore importanza economica. In Sicilia questa specie asiatica fu importata per la prima volta dagli Arabi; in quest'isola cresce spontaneamente e acquisisce sorprendenti caratteristiche nutrizionali determinate dalle condizioni pedoclimatiche (Conti *et al.*, 2005). *R. coriaria* è un alto arbusto o alberello (1-3 m di altezza) con foglie imparipennate, villose e frutti rossi con drupa

monoseme e piccoli fiori bianco-verdastri organizzati in pannocchie (Shabbir *et al.*, 2012). Sono stati condotti diversi studi per identificare i componenti principali delle diverse parti della pianta di *R. coriaria* (Shabbir *et al.*, 2012), le sue molecole bioattive (Asgarpanah *et al.*, 2014) e la sua composizione in acidi grassi (Dogan *et al.*, 2005). Tuttavia, solo pochi studi sono stati condotti sul sommacco siciliano (Grassia *et al.*, 2021; Romeo *et al.*, 2015), e in particolare sulle drupe, che sono i principali *endpoint* dello studio proposto. Fin dall'antichità, dato il suo valore nutritivo e i suoi componenti fitochimici (flavonoidi, flavoni, antociani, tannini, acidi organici, fibre, proteine, oli volatili, nitriti e nitrati), è stato utilizzato sia come spezia schiacciando e mescolando i frutti disidratati con sale e come erba medicinale (Romeo *et al.*, 2015; Ardalani *et al.*, 2016). Il sommacco è economicamente interessante per il suo crescente utilizzo in diverse applicazioni biotecnologiche, dai settori nutraceutico e alimentare, all'industria cosmetica e farmaceutica, nonché negli studi veterinari e nella tintura del cuoio (Shabbir *et al.*, 2012; Asgarpanah *et al.*, 2014; Grassia *et al.*, 2021; Kizil *et al.*, 2010; Dabas *et al.*, 2018).

I componenti di *R. coriaria*, inclusi acidi grassi, minerali, fibre e sostanze fitochimiche, sono responsabili delle sue numerose proprietà benefiche. Il suo valore nutritivo rende questa pianta interessante come fortificante alimentare o alimento funzionale (Grassia *et al.*, 2021). Le sue proprietà antimicrobiche e

antiossidanti rendono questa pianta uno strumento promettente come conservante alimentare (Shabbir *et al.*, 2012; Sakhr *et al.*, 2020; Gulmez *et al.*, 2006). Inoltre, le sue proprietà coloranti e i tannini sono utilizzati nella tintura e nella concia delle pelli pregiate. I composti bioattivi, responsabili dell'attività antiossidante, antilipidemia, antimicrobica, antivirale, antimicotica e antinfiammatoria (Sakhr *et al.*, 2020; Abraham *et al.*, 2021), rendono questa pianta uno strumento interessante anche per il settore farmaceutico.

Ad oggi, non esiste uno studio che indaghi sull'attività antimicrobica del sommacco siciliano e, sebbene diversi studi abbiano riportato l'attività antimicrobica di *R. coriaria*, lo studio proposto è innovativo e aggiunge informazioni all'area di interesse. Al fine di indagare tutto il potenziale del sommacco siciliano, nel presente studio viene riportata una caratterizzazione completa di questo frutto, inclusa la determinazione della composizione prossimale, il contenuto fenolico e di antociani e il contenuto di minerali. È stato effettuato uno screening antibatterico comparativo preliminare di diversi estratti di sommacco e la sua non tossicità è stata dimostrata utilizzando lo Zebrafish Embryo Toxicity Test (ZFET). Ulteriori studi sono in corso per avere una migliore comprensione di questo genotipo vegetale e delle sue possibili applicazioni biotecnologiche.

6.6.2. Materiali e metodi

6.6.2.1. Reagenti e prodotti chimici

Eptano, metanolo, etanolo e acetone sono stati forniti da PanReac AppliChem (Barcellona, Spagna) e J.T. Baker (Phillipsburg, New Jersey, Stati Uniti). L'acqua ultrapura (18 mΩ cm di resistività e <5 ppb TOC) è stata prodotta da un sistema di purificazione dell'acqua Barnstead Smart2Pure 12 (Thermo Scientific, Milano, Italia). Gli standard di riferimento degli esteri metilici degli acidi grassi (FAME, C4-C24) e le soluzioni standard di elementi inorganici (1000 mg/L in 2% HNO₃) sono stati ottenuti da Supelco (Bellefonte, USA). Gli standard di zuccheri e polifenoli sono stati ottenuti da Extrasynthese (Genay, Francia) e Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Il catalizzatore Kjeldahl è stato fornito da Carlo Erba (Milano, Italia). Metanolo, acido gallico standard, cianidina-3-O-glucoside e reagente Folin Ciocalteu sono stati ottenuti da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germania). I filtri per siringa in PTFE (0,45 μm) sono stati acquistati da Gelman Sciences Inc. (Ann Arbor, MI, USA). Acqua ad elevata purezza con una resistività di 10 mΩ·cm, grado di analisi dei metalli in tracce di acido nitrico e perossido di idrogeno sono stati acquistati da J.T. Baker (Milano, Italia). Le soluzioni stock standard di B, Mg, Na, Al, K, Ti, Cr, Mn, Fe, Zn, Ni, As, Sr, Ba, Pb e Bi (1000 mg/L in acido nitrico al 2%) sono state acquistate da Fluka (Milano, Italia). La soluzione di Cd (1000 mg/L in acido nitrico al 2%) e la soluzione di Hg (1000 mg/L in acido cloridrico al 3%) sono state ottenute da Merck

(Darmstadt, Germania). Gli standard di grado MeOH HPLC, quercetina e acido gallico sono stati ottenuti da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

6.6.2.2. Materiale vegetale

Le drupe di *R. coriaria* (1 kg) sono state raccolte a Messina (38°13'31.4"N 15°32'21.7"E) nel settembre 2020. Il materiale fresco è stato subito essiccato al buio a bassa temperatura e poi polverizzato.

6.6.2.3. Composizione prossimale

La determinazione della composizione prossimale è stata effettuata secondo i metodi dell'AOAC (Association of Official Analytical Chemist, 2005). In particolare, sono stati utilizzati i seguenti metodi: sostanza secca (metodo 925.10), ceneri grezze (metodo 923.03), proteina grezza (metodo 990.03), fibra grezza (metodo 962.09), amido (metodo 996.11) e grasso grezzo mediante estrazione Soxhlet (metodo 960.39 con alcune modifiche). Il campione di sommacco è stato analizzato in triplice copia.

Per la profilazione degli acidi grassi, 15 g di campione sono stati estratti per 6 ore con un apparecchio Soxhlet utilizzando eptano come solvente. Dopo l'estrazione, il solvente è stato eliminato con un evaporatore rotante e conservato a -18 °C fino all'analisi cromatografica. L'analisi dei FAME è stata eseguita come descritto dal Regolamento UE n. 1833/2015 (Commissione Europea, 2015).

Un μL di ciascun estratto è stato analizzato da un gascromatografo (GC) (Dani Master GC1000) dotato di un iniettore split/splitless e di un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) (Dani Instrument, Milano, Italia). È stata utilizzata una colonna capillare Supelco SLB-IL100 da $60\text{ m} \times 0,25\text{ mm ID } 0,20\text{ }\mu\text{m}$ di spessore (Supelco, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Le condizioni cromatografiche utilizzate erano le seguenti: temperatura da $165\text{ }^\circ\text{C}$ a $210\text{ }^\circ\text{C}$ (10 min mantenuto) a $2\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, la temperatura dell'iniettore e del rivelatore era di $250\text{ }^\circ\text{C}$ e l'elio era a una velocità lineare di 30 cm/s . Il volume di iniezione era di $1\text{ }\mu\text{L}$ con un rapporto di divisione di 1:100. Il software Clarity Chromatography v4.0.2 (DataApex, Praga, Repubblica Ceca) è stato utilizzato per l'acquisizione e l'elaborazione dei dati. Il campione è stato analizzato in triplicato. I FAME sono stati identificati confrontando i tempi di ritenzione dei picchi con quelli degli standard. La percentuale di ciascun FAME è stata calcolata per confronto con l'area del picco del cromatogramma corrispondente. La precisione del metodo è stata valutata in termini di RSD% analizzando cinque volte ciascun campione (Nicolò *et al.*, 2021).

6.6.2.4. Determinazione degli antociani e fenoli totali

Il contenuto fenolico totale di *R. coriaria* L. è stato determinato utilizzando il metodo Folin-Ciocalteu (Dewanto *et al.*, 2002). In breve, 3 g di campione essiccato e tritato sono stati omogeneizzati con 8 mL di una soluzione acquosa di metanolo all'80% e posti in

un recipiente a -20 °C durante la notte. Il campione è stato quindi centrifugato (10000 rpm per 15 min) e il supernatante è stato filtrato con un filtro da 0,45 µM. Le misurazioni dell'assorbanza del contenuto fenolico totale sono state registrate utilizzando uno spettrofotometro UV-VIS Ultrospec 2100 Pro (GE Healthcare Ltd., Chicago, IL, USA) a una lunghezza d'onda di 760 nm. I valori di assorbanza sono stati convertiti in equivalenti di acido gallico ed espressi in mg/g. Il contenuto totale di antociani è stato valutato spettrofotometricamente, come descritto da Landi *et al.* (2014), in metanolo acidificato (0,1% HCl, v/v), e l'assorbanza è stata misurata a 535 nm. I valori di assorbanza sono stati convertiti in equivalenti di cianidina-3-O-glucoside ed espressi in mg/g.

6.6.2.5. Determinazione degli elementi minerali

La determinazione degli elementi minerali nei campioni di *Rhus coriaria* è stata effettuata utilizzando uno spettrometro ICP-MS iCAP-Qc (Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia) dotato di un generatore a stato solido a radiofrequenza 27 MHz a 1550 W. Un forno a microonde a vaso chiuso sistema di digestione Ethos 1 (Milestone, Bergamo, Italia) è stato utilizzato per la digestione del campione. Circa 0,50 g di campione di *R. coriaria* sono stati digeriti con 7 mL di HNO₃ (69% v/v) e 1 mL di H₂O₂ (30% v/v) in un recipiente di PTFE prelavato. Il campione è stato quindi raffreddato a temperatura ambiente, diluito fino a 25 mL con acqua ultrapura e filtrato con un filtro da 0,45 µm (Nicolò *et al.*, 2021; Panebianco *et al.*, 2021). I materiali di riferimento certificati sono

stati lavorati utilizzando le stesse condizioni. I parametri operativi dell'ICP-MS erano la potenza della radiofrequenza incidente 1500 W, il flusso di gas plasma argon (Ar) a 15 L/min, la portata del gas ausiliario (Ar) 0,9 L/min e la portata del gas di trasporto (Ar) 1,10 L/min. L'elio (He) era il gas della cella di collisione (4 mL/min) e la camera di nebulizzazione era impostata a $T = 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Il volume di iniezione e la velocità di introduzione del campione erano rispettivamente di 200 μL e 1 ml/min. Per l'acquisizione degli spettri è stata utilizzata una modalità di scansione completa (tempo di sosta 0,5 s punto 1). Tutti i campioni e i bianchi analitici sono stati analizzati in triplicato. L'acquisizione dei dati è stata eseguita utilizzando il software Qtegra™ Intelligent Scientific Data Solution™ (Thermo Scientific). Per la quantificazione è stata utilizzata una procedura di calibrazione esterna. La determinazione del mercurio è stata eseguita utilizzando l'analizzatore automatico di mercurio DMA-80 (Milestone Srl, Bergamo, Italia). Un'aliquota del campione (100 mg) è stata posta in un recipiente, essiccata per 3 minuti a 200 $^{\circ}\text{C}$ e decomposta a 650 $^{\circ}\text{C}$ per 2 minuti. Il contenuto di Hg è stato determinato misurando l'assorbanza a 253,7 nm.

6.6.2.6. Preparazione dell'estratto

I frutti essiccati e macinati sono stati estratti con diversi solventi ottenuti da Sigma-Aldrich: metanolo (SM), etanolo (SE), acetone (SA), metanolo e acqua (SMW), etanolo e acqua (SEW), acetone e acqua (SAW) e acqua (SW). I campioni (2 g) nei rispettivi solventi

di estrazione (20 mL) sono stati sonicati per 15 minuti, filtrati con un filtro Whatman, essiccati con un evaporatore rotante (BUCHI R-210, Merck KGaA, Darmstadt, Germania) e liofilizzati. Gli estratti secchi risultanti sono stati utilizzati per le analisi microbiologiche.

6.6.2.7. Determinazione del contenuto dei polifenoli nell'estratto in metanolo (SM)

Quantità di 229,16 mg e 224,29 mg di polvere di sommacco sono state aggiunte ad aliquote da 3 mL di MeOH di grado HPLC. L'estrazione assistita da ultrasuoni dei fenoli da ciascuna polvere è stata eseguita utilizzando un bagno ad ultrasuoni Transonic 460 H (Elma Hans Schmidbauer, Singen, Germania) a temperatura ambiente operando per 15 minuti a una frequenza ultrasonica di 35 kHz. Quindi, ciascun campione è stato centrifugato (5000 rpm, 6 min) utilizzando una centrifuga SL 16 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Il supernatante è stato recuperato e al residuo solido sono stati aggiunti due volte altri 3 mL di MeOH. Gli estratti metanolici sono stati essiccati a pressione ridotta. I campioni sono stati quindi aggiunti con 2 mL di MeOH, filtrati e trasferiti in un recipiente di vetro. Le analisi sono state condotte utilizzando un sistema HPLC Alliance e2695 (Waters, Milford, MA, USA) dotato di campionatore automatico, degasatore e riscaldatore a colonna accoppiato con uno spettrometro di massa a tempo di volo quadrupolare Q-ToF Premier (Waters, Milford, MA, STATI UNITI D'AMERICA). I composti sono stati separati

utilizzando una colonna HPLC Hypersil GOLD ID 50 × 2,1 mm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mantenuta a 20 °C. Il volume di iniezione era di 5 µl. È stato utilizzato un campionatore automatico termostato, mantenuto a 4 °C, e tutti i campioni sono stati iniettati in triplicato. L'eluente HPLC era una miscela di soluzione acquosa di acido formico allo 0,1% e acido formico allo 0,1% in MeOH, con una velocità di flusso di 0,25 mL/min. L'eluizione è iniziata con acido formico acquoso al 95% e acido formico metanolo al 5%, quindi isocratico per 1 minuto. Quindi, nei successivi 14 min, il solvente è diventato MeOH al 100%, rimanendo isocratico per i successivi 5 min (dal min 15 al min 20). Dopo 30 s, la miscela di solventi di eluizione è stata riportata al 95% di acido formico acquoso e al 5% di acido formico metanolico e mantenuta per altri 30 s. Ogni corsa è durata 21 min. Ogni campione è stato iniettato tre volte. I valori di concentrazione, riportati in Tabella 4, sono la media aritmetica dei valori osservati in ciascuna serie. Per la rilevazione dei flavonoidi e di altri fenoli sono state utilizzate le curve di calibrazione della quercetina e dell'acido gallico, entrambi di grado di purezza HPLC. Le curve di calibrazione sono state eseguite utilizzando rispettivamente una soluzione standard di quercetina in metanolo (1000 ppm 10 mg/10 mL) e una soluzione standard di acido gallico in metanolo (1000 ppm 10 mg/10 mL). Ciascuna curva di calibrazione è stata ottenuta utilizzando soluzioni da 0,5 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm e 20 ppm. Sono stati studiati i seguenti

composti: quercetina, quercetina 2'O-gallato, quercetina glucuronide, quercetina-esoso acido malico, metil diidroquercetina esoside, kaempferololo, miricetina-ramnosio acido malico, quercetina 3-O-esuronide, kaempferol 3-O-glucoside, quercetina 3-O-galattoside, miricetina, miricetina 3-O-esoside, apigenina glucoside, mirecetina O-ramnosilglucosio, fenoli, acido gallico, metildigallato, pentagalloil-esoside, acido p-cumarico, peonidina 3-O-esoside isomero e acido vanillico.

6.6.2.8. Attività antimicrobica

6.6.2.8.1.Ceppi batterici

Per lo studio sono stati selezionati cinque isolati di Enterobacteriaceae, quattro di *Escherichia coli* e uno di *Klebsiella pneumoniae*. I ceppi sono stati isolati da pollame proveniente dal Laboratorio Veterinario Regionale di Mostaganem, Algeria, e identificati utilizzando la spettrometria di massa a tempo di volo di desorbimento-ionizzazione laser assistita da matrice (MALDI-TOF-MS), come riportato in precedenza (Benameur *et al*, 2021). Sono stati testati anche *E. coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA).

6.6.2.8.2.Test di sensibilità antimicrobica

Il metodo di diffusione del disco è stato utilizzato per testare e confermare la suscettibilità antimicrobica degli isolati di *Enterobacteriaceae* utilizzando agar Muller-Hinton (MHA, Oxoid,

Milano, Italia) e un tempo di incubazione di 16-18 ore a 37 ° C, seguendo gli standard clinici e di laboratorio Linee Guida di Istituto (CLSI) (M02, 2017). Gli antimicrobici utilizzati sono stati: ciprofloxacina (CIP, 5 µg), acido nalidixico (NA, 30 µg), amoxicillina/acido clavulanico (AMC, 20/10 µg), amoxicillina (AML, 25 µg), levofloxacina (LEV, 5 µg), cefotaxime (CTX, 30 µg), sulfamidici (SSS, 300 µg), tetraciclina (TE, 30 µg), trimetoprim/sulfametossazolo (SXT, 1,25/23,75 µg), trimetoprim (TMP, 5 µg), cloramfenicolo (C, 30 µg) e neomicina (N, 30 µg) (Bio-Rad, Marnes la Coquette, Francia). I risultati sono stati valutati seguendo le linee guida del CLSI (M02, 2017).

6.6.2.8.3. Determinazione dell'attività antibatterica degli estratti mediante tecnica di diffusione su disco

L'attività antibatterica dei diversi estratti (SE, SM, SA, SEW, SMW, SAW e SW) contro gli isolati di *Enterobacteriaceae* selezionati è stata valutata mediante il metodo della diffusione su disco, come precedentemente descritto (Balouiri *et al*, 2016). In breve, le colonie batteriche sono state sospese in 10 mL di acqua salina e la torbidità della sospensione batterica è stata regolata a 0,5 McFarland standard. Le piastre MHA sono state inoculate con batteri diffondendo colture durante la notte su MHA utilizzando tamponi di cotone sterili. Dischi di carta da filtro (diametro 6 mm; Thermo Fisher, Italia) contenenti 10 µL di ciascun estratto a una concentrazione di 10 mg/mL sono stati quindi applicati sulle piastre di agar. La cefotaxime fungeva da controllo positivo e un

disco impregnato di acqua distillata sterile veniva utilizzato come controllo negativo. Le piastre sono state incubate per 24 ore a 37°C e l'attività antibatterica è stata valutata misurando i diametri delle zone di inibizione. Ciascun test è stato eseguito in triplicato.

6.6.2.8.4. Determinazione della concentrazione minima inibente (MIC) dell'estratto SM

Al fine di determinare la concentrazione minima inibente (MIC) di SM, è stato eseguito il metodo della doppia diluizione seriale secondo le linee guida CLSI (*M07-A10*, 2015). In breve, sono state utilizzate colture batteriche notturne in fase logaritmica per preparare la sospensione di cellule regolate a 10^6 CFU in Muller-Hinton Broth (MHB). Le diluizioni seriali sono state eseguite nel mezzo di crescita in un intervallo di concentrazione compreso tra 2000 e 2 µg/mL per l'estratto SM. Pozzetti contenenti MHB privo di composti con batteri sono stati usati come controllo positivo. Le piastre sono state incubate a 37°C per 24 ore. Il valore MIC è stato definito come la più bassa concentrazione del composto testato che inibisce la crescita dei batteri al termine dell'incubazione di 24 ore. Le MIC sono state determinate in triplicato. La MIC è stata definita come la concentrazione più bassa che inibisce la crescita visibile dei ceppi testati dopo l'incubazione.

6.6.2.9. Test di tossicità acuta dell'embrione

Il test di tossicità acuta per gli embrioni è stato eseguito secondo le linee guida dell'Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico (OCSE) per i test sulle sostanze chimiche (OECD, 2013). Lo ZFET è stato condotto su uova fecondate dal Centro Sperimentale di Patologia Ittica della Sicilia (CISS, Sicilia, Italia). Il pesce zebra adulto (*Danio rerio*) è stato tenuto in una struttura autonoma (ZebTec, Tecniplast, West Chester, PA, Stati Uniti) in condizioni controllate dall'acqua: temperatura 28 °C, conducibilità 600 µS/cm, pH 7,5 e 14/10 h regime scuro/chiaro. Due volte al giorno, i pesci sono stati nutriti con *Artemia salina* al 3% del peso corporeo e Gemma micro 300 (Skretting, Varese, Italia). Dopo l'accoppiamento, le uova sono state poste in griglie di acciaio all'interno di vasche per evitare la predazione da parte degli adulti e per garantirne la raccolta. Gli ovuli fecondati sono stati raccolti utilizzando uno stereomicroscopio (Leica M205 C) ed esposti all'estratto di *R. coriaria*, precedentemente preparato a una concentrazione di 9,37 µg/mL, in un mezzo embrionale sterilizzato (15 mM NaCl, 0,5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 0,15 mM KH₂PO₄, 0,05 mM Na₂HPO₄, 0,7 mM NaHCO₃; pH 7,3). Il gruppo di controllo è stato tenuto in un mezzo embrionale. È stata eseguita la Fish Embryo Acute Toxicity (FET), come descritto da Pecoraro *et al.* (2017). Subito dopo la fecondazione, gli embrioni sono stati raccolti, sbiancati come riportato da Westerfield (2007) e distribuiti come un embrione per pozzetto in piastre da 24 pozzetti

(LABSOLUTE, Th. Geyer GmbH & Co.KG, Berlino, Germania). Gli embrioni sono stati incubati con un regime buio/luce di 10/14 ore a 26 °C per 96 ore dopo la fecondazione (hpf). Le soluzioni di test e i controlli sono stati sostituiti giornalmente (OECD, 2013). Il periodo di esposizione è iniziato da 180 min dopo la fecondazione e si è concluso a 96 h. Per valutare la tossicità sono stati utilizzati i seguenti endpoint: coagulazione dell'embrione, non distacco della coda, mancanza di formazione di somiti, non rilevamento del battito cardiaco e numero di embrioni schiusi. La tossicità acuta è stata determinata al termine del periodo di esposizione.

6.6.2.10. Analisi statistica

L'esistenza di differenze significative nell'attività antimicrobica degli estratti è stata valutata mediante ANOVA unidirezionale utilizzando SIGMAPLOT, versione 14.0 (Systat Software Inc., San Jose, California, USA). L'HSD di Tukey è stato utilizzato come test post hoc. Il livello di significatività è stato fissato a $p \leq 0,05$.

6.6.3. Risultati e discussioni

6.6.3.1. Composizione prossimale

La composizione prossimale e il profilo degli acidi grassi di *Rhus coriaria* sono riportati rispettivamente nelle Tabelle 1 e 2.

g/100g	Drupe di <i>R. coriaria</i>
Fibre totali	33.21 ±1.02
Ceneri	4.78 ±0.29
Grassi totali	9.56 ± 0.72
Umidità	6.64 ± 0.03
Proteine totali	3.47 ± 0.19
Carboidrati	N. D
Energia (Kcal)	N. D

Tabella 1: Composizione prossimale delle drupe di *Rhus coriaria*.

N.D: Non determinato

I risultati, relativi alla composizione prossimale, mostrano che il sommacco rappresenta una buona fonte di fibra alimentare, che può essere utile per alleviare i disturbi gastrointestinali (Hariri *et al.*, 2020). In linea con studi precedenti, i grassi rappresentano i secondi composti più abbondanti (Dogan *et al.*, 2015; Kizil *et al.*, 2010). La composizione in acidi grassi è riportata in Tabella 2. Come si può osservare, i frutti di sommacco contengono il $65,09 \pm 1,67\%$ di acidi grassi polinsaturi, e il contenuto di acido linoleico (omega 6) e α -linolenico (omega 3) è $30,82 \pm 1,21 \%$ e $1,85 \pm 0,07\%$, rispettivamente. Questo risultato conferma che questo frutto potrebbe rappresentare una fonte di acidi grassi

insaturi, come riportato in precedenza (Kizil *et al.*, 2010). Inoltre, l'acido oleico è l'acido grasso più abbondante, rappresentando il $31,67 \pm 1,29\%$. Il contenuto totale di fenolici e antociani totali dell'estratto di *R. coriaria* è rispettivamente di $71,69 \pm 1,23$ mg/g come equivalente di acido gallico e di $6,71 \pm 0,12$ mg/g come equivalenti di cianidina-3-O-glucoside. Queste due classi di composti nel sommacco sono i principali costituenti responsabili della sua attività fitochimica. *R. coriaria* è, quindi, una fonte di sostanze salutari ed è utile in vari campi e applicazioni. In accordo con uno studio precedente (Ozcan *et al.*, 2001), i nostri risultati confermano che il sommacco è una buona fonte di minerali; quindi, potrebbe essere uno strumento adatto per aumentare l'assunzione di minerali nella dieta. Come riportato in Tabella 3, *R. coriaria* è principalmente ricca di potassio, calcio, magnesio e fosforo, seguiti da alluminio, ferro, sodio, boro e zinco. La composizione polifenolica dell'estratto metanolico di sommacco è riportata in Tabella 4. I polifenoli totali rappresentano 71,69 mg/g. I flavonoidi e i fenoli rappresentano rispettivamente il 18,48% e l'81,52%. Il primo componente identificato è stato l'acido gallico, seguito da quercetina, metil digallato, pentagalloyl-esoside e kaempferol 3-O-glucoside.

Acidi grassi (g/100g)	Drupe di <i>R. coriaria</i>
Acido miristico	0.38 ± 0.08
Acido palmitico	31.25 ± 0.47
Acido palmitoleico	0.75 ± 0.15
Acido stearico	3.28 ± 0.55
Acido oleico	31.67 ± 1.29
Acido linoleico	30.82 ± 1.21
Acido linolenico	1.85 ± 0.07
Σ TUFA	65.09 ± 1.67
Σ TSFA	34.91 ± 1.04

Tabella 2: Profilo degli acidi grassi di *R. coriaria*

Cr	B	Na	Mg	Al	K	Ti
0.040± 0.00	0,770±0.09	3.980±0.11	41.870±3.55	4.010±0.24	266.91±15.55	0.480± 0.56
Mn	Fe	Ni	Zn	As	Sr	Cd
0.410± 0.06	2.950± 0.13	0.020±0.00	0.360± 0.06	0.001±0.00	5.390±2.49	0.003± 0.00
Ba	Pb	Bi	Hg	Li	V	Co
0.270± 0.08	0.010± 0.00	0.004± 0.00	0.008± 0.00	0.010±0.00	0.010±0.00	0.001±0.00
Cu	Se	Mo	Sb	Tl	P	Ca
0.120±0.00	0.065±0.00	0.005±0.00	0.001±0.00	0.002±0.00	39.70±3.05	215.53±16.78

Tabella 3: Elementi minerali (Mg/Kg) delle drupe di *R. coriaria*

Compounds	Sumac (mg/g)
Flavonoids	
Quercetin	23.13
Quercetin 2''-O-gallate	5.30
Quercetin glucuronide	1.71
Quercetin-hexose malic acid	11.11
Methyl-dihydroquercetin hexoside	18.34
Kaempferolo	3.34
Myricetin-rhamnose malic acid	11.58
Quercetin 3-O-hexuronide	2.84
Kaempferol 3-O-glucoside	99.86
Quercetin 3-O-galactoside	160.53
Myricetin	2.71
Myricetin 3-O-hexoside	18.55
Apigenin glucoside	20.86
Myrecetin O-rhamnosylglucose	4.34
Phenols	
Gallic acid	1425.49
Methyl digallate	110.96
Pentagalloyl-hexoside	128.09
p-Coumaric acid	10.48
Peonidin 3-O-hexoside isomer	4.54
Vanillic acid	5.76

Tabella 4: Composti polifenolici nell'estratto metanolico (SM) di *Rhus coriaria*.

6.6.3.2. Attività antimicrobica

Al fine di analizzare l'attività antimicrobica del sommacco, è stato condotto uno studio comparativo valutando il potenziale antibatterico di sei diversi estratti contro i patogeni di origine alimentare. Gli isolati hanno coinvolto un isolato di *S. aureus*, un isolato di *K. pneumoniae* e cinque isolati di *E. coli*. Il test di sensibilità antimicrobica ha mostrato che gli isolati di *Enterobacteriaceae* dal pollame (ceppi di *E. coli* e *K. pneumoniae*) erano resistenti a AML e N. Gli isolati di *Enterobacteriaceae* testati sono risultati resistenti a tre o più agenti antimicrobici che

appartengono a classi di antibiotici dissimili e sono multifarmaco resistente (MDR). Il profilo antimicrobico dei microrganismi testati è riportato in Tabella 5.

Ceppi	Profilo di resistenza agli antibiotici
<i>E. coli</i> (S12/15)	NA, CIP, AML, AUG, SXT, TE, N
<i>E. coli</i> (S34/16)	NA, CIP, N
<i>E. coli</i> (S6/15)	NA, CIP, AML, AUG, TE, N
<i>E. coli</i> (S2/15)	NA, CIP, AML, AUG, SXT, TE, N
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AML, SXT, TE, C, N

Tabella 5: Profilo di resistenza agli antibiotici. NA, acido nalidixico; CIP, ciprofloxacina; AML, amoxicillina; AUG, acido amoxicillina-clavulanico; SXT, trimetoprim-sulfametossazolo; TE, tetraciclina; N, neomicina; C, cloramfenicolo.

Questi risultati, che mostrano la multiresistenza della maggior parte degli isolati, confermano studi precedenti che riportavano un alto livello di isolati di *Enterobacteriaceae* multiresistenti dal pollame in Algeria (Benameur *et al.*, 2021; Benklaouz *et al.*, 2020). Le cause, di questo fenomeno di resistenza agli antibiotici, sono molto diverse, e la causa importante è l'uso massiccio e inappropriato di antibiotici. Attualmente, la resistenza antimicrobica rappresenta una crescente preoccupazione globale e lo sviluppo di opzioni terapeutiche efficaci contro i batteri MDR è una priorità di salute pubblica. Gli estratti vegetali possono essere considerati valide alternative agli antibiotici (Aghraz *et al.*, 2018; Benameur *et al.*, 2021). Recentemente, il sommacco ha guadagnato maggiore attenzione grazie alla sua elevata quantità di polifenoli. Sono stati condotti numerosi studi per studiare l'efficacia antimicrobica in vitro degli estratti di *Rhus coriaria* contro diverse

specie batteriche Abraham et al., 2021; Gabr et al., 2019; Nostro *et al.*, 2016), mentre sono disponibili dati limitati sul loro effetto contro i batteri MDR. In questo studio, l'attività antibatterica degli estratti di *Rhus coriaria* è stata testata contro cinque isolati MDR *Enterobacteriaceae*, *S. aureus* ATCC 6538 ed *E. coli* ATCC 25922. I risultati dell'attività antibatterica degli estratti di *Rhus coriaria* sono riassunti nella Tabella 6, che indica che quasi tutti gli estratti hanno esercitato attività antibatterica contro tutti i ceppi testati.

Ceppi	Raggio di inibizione in mm (Media di tre repliche)						
	SA	SE	SM	SAW	SEW	SMW	SW
<i>S. aureus</i>	10 ^{A, B, C, D, H, P}	11 ^{D, E, F, G, I, R}	19 ^{H, I, L, N, O}	9 ^{A, E, L, N, Q}	10 ^{B, F, M, S}	17 ^{O, P, Q, R, S}	5 ^{C, M}
<i>E. coli</i> ATCC 25922	13 ^{A, B, C}	12 ^{A, D, E, G}	15	11 ^{D, F, H}	11 ^{B, E, F, I}	12 ^{C, G, H, I}	4
<i>K. pneumoniae</i>	9 ^{A, B}	14	22	8 ^{A, C}	11	19	8 ^{B, C}
<i>E. coli</i> (S12/15)	15 ^A	19 ^B	25 ^B	14	17 ^A	22	7
<i>E. coli</i> (S34/16)	16 ^{A, B}	17 ^B	24	8	14 ^A	21	5
<i>E. coli</i> (S6/15)	14 ^A	20 ^B	24	12 ^B	15 ^A	20	7
<i>E. coli</i> (S2/15)	12 ^{A, B}	23	22	11 ^A	16 ^B	19	6

Tabella 6: Attività antibatterica di estratti di *Rhus coriaria* valutata mediante analisi di diffusione su disco. SA, estratto di acetone; SE, estratto di etanolo; SM, estratto di metanolo; SAW, acetone + estratto acquoso; SEW, etanolo + estratto acquoso; SMW, metanolo + estratto acquoso; SW, estratto d'acqua. I mezzi che condividono le stesse lettere maiuscole nel grezzo non sono significativi a $p < 0,05$ secondo il test HSD di Tukey.

La maggiore attività antimicrobica è stata ottenuta utilizzando SM e SE. In particolare, SE presenta zone di inibizione della crescita comprese tra 14 e 16 mm e SM comprese tra 22 e 25 mm. Data la maggiore attività antimicrobica del SM, è stata valutata la sua MIC e i risultati sono riportati nella Tabella 7. Questi risultati sono in linea con uno studio sull'attività antimicrobica del sommacco

siriano, che riporta che l'attività antimicrobica dell'estratto di metanolo era la più efficace (Raodah *et al.*, 2014). Inoltre, ulteriori studi hanno riportato la maggiore quantità di fenoli e flavonoidi contenuti nell'estratto metanolico rispetto a quello etanolic (Raodah *et al.*, 2014; Almouwaly *et al.*, 2013). Diversi studi hanno descritto l'attività antibatterica delle frazioni dell'estratto di sommacco, evidenziando come alcuni composti, per la loro polarità, possano agire solo sui batteri Gram positivi, mentre altri, come l'acido gallico, possono agire sia sui batteri Gram positivi che su quelli Gram negativi; tuttavia, la loro attività antibatterica non è così forte (Almouwaly *et al.*, 2013).

Ceppi	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
Staphylococcus aureus ATCC 6538	9.37
<i>E. coli</i> ATCC 25992	9.37
Klebsiella pneumoniae	9.37
<i>E. coli</i> (S12/15)	9.37
<i>E. coli</i> (S34/16)	9.37
<i>E. coli</i> (S6/15)	9.37
<i>E. coli</i> (S2/15)	4.68

Tabella 7: Attività antibatterica di SM da *Rhus coriaria* valutata mediante metodo di doppia diluizione seriale.

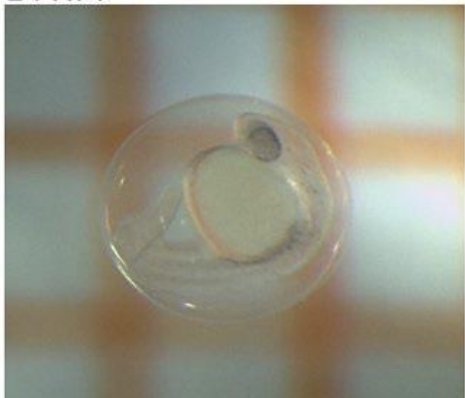
Diversi studi hanno anche riferito sull'efficacia dell'estratto totale e attribuiscono la sua attività biologica al suo contenuto in fenoli, che sono la frazione principale dell'estratto (Khanlarbeik *et al.*, 2011; Kosar *et al.*, 2007). La massima azione inibitoria è stata osservata a una concentrazione di 9,37 $\mu\text{g/mL}$ per tutti i ceppi ad eccezione di *E. coli* (S2/15), che presentava una MIC di 4,68 $\mu\text{g/mL}$. Questa scoperta supporta l'uso di *Rhus coriaria* nella

medicina tradizionale come agente battericida. Uno studio ha riportato che l'estratto acquoso di *R. coriaria* aveva un efficace potere antibatterico in vitro contro *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* (MRSA) (Gabr *et al.*, 2019). Un altro studio ha riportato che l'estratto ha mostrato una forte attività antibatterica contro i batteri Gram positivi e Gram negativi, con MIC <0,78% (Mahdavi *et al.*, 2018). Uno studio simile ha valutato il potere antibatterico dell'estratto metanolico di sommacco come avente la più alta attività inibitoria. In tutti gli estratti di sommacco, l'aumento della concentrazione di sommacco provoca un aumento del potere antibatterico (Abraham *et al.*, 2021). Inoltre, l'estratto metanolico di foglie di sommacco ha rivelato attività antibatterica contro *E. coli* e *S. aureus*. È stata segnalata una MIC di 312 µg/mL, sebbene l'effetto inibitorio fosse solo batteriostatico e l'effetto battericida sia stato osservato a una concentrazione di 2500 µg/mL (Nostro *et al.*, 2016). I risultati del nostro studio, evidenziano la maggiore attività dell'estratto metanolo, sono quindi in linea con precedenti studi comparativi che hanno dimostrato che gli estratti metanolici di sommacco contengono un contenuto più elevato di flavonoidi e fenoli rispetto ad altri estratti (Fereidoonfar *et al.*, 2018, Abraham *et al.*, 2021).

6.6.3.3. Tossicità acuta dell'embrione di pesce (FET)

La valutazione del profilo tossicologico dell'estratto di piante medicinali è della massima importanza. Il pesce zebra (*Danio rerio*) è uno dei principali modelli di studio (Pecoraro *et al.*, 2021). Dato che l'embrione si sviluppa rapidamente al di fuori della madre e che questo è visivamente evidente, è certamente utilizzabile per il test e l'osservazione. Essendo lo ZFET un valido metodo alternativo ai test sugli animali (Khan *et al.*, 2021; Jayasinghe *et al.*, 2019), la non tossicità del genotipo di *R. coriaria* della Sicilia è stata valutata e confermata analizzando l'effetto dell'estratto sulle larve di zebrafish. Ad oggi non ci sono prove della tossicità del sommacco siciliano. In questo studio, embrioni di zebrafish fecondati sono stati esposti all'estratto metanolico di *R. coriaria* ad una concentrazione di 9,37 µg/mL. Secondo i nostri risultati, l'estratto è risultato non tossico utilizzando il test FET di zebrafish. Durante le 96 ore di esposizione non sono stati osservati effetti tossici visibili di questo estratto sullo sviluppo degli embrioni (Figura 1). La mortalità è stata del 5% (una larva) per l'intero periodo di prova. Durante l'osservazione allo stereomicroscopio, è stato osservato che a 48 hpf (ore dopo la fecondazione), le larve schiuse erano il 95%.

24 HPF



48 HPF



72 HPF



96 HPF



Figura 1: Sviluppo degli embrioni. Hpf: ore post-fecondazione.

Secondo le linee guida dell'OCSE, l'estratto di *R. coriaria* ottenuto dal genotipo siciliano non ha indotto alcun effetto tossico sugli embrioni di zebrafish e sullo sviluppo larvale. Questi risultati sono in linea con altri risultati che riportano gli effetti sicuri e persino benefici dell'estratto di *R. coriaria* sia sull'uomo che sugli animali (Dogan *et al.*, 2005). Altri studi non hanno evidenziato alcuna tossicità acuta dell'estratto in esperimenti su modelli di ratto e, inoltre, hanno mostrato proprietà benefiche cardioprotettive ed epatoprotettive in condizioni ipercolesterolemiche (Shafiei *et al.*, 2011). Un altro studio utilizzando un modello di ratto diabetico e testando 250, 500 e 1000 mg/kg dell'estratto vegetale ha riportato

una buona tolleranza e un assorbimento orale non letale di questo estratto, anche a 1000 mg/kg, mostrando non solo nessun segno di tossicità e mortalità dopo 3 giorni di somministrazione giornaliera dell'estratto, ma anche un effetto positivo sul diabete e sulle complicanze correlate al diabete (Doğan *et al.*, 2012).

6.6.4. Conclusioni

Questo studio fornisce una caratterizzazione delle drupe di sommacco siciliane, compresa la determinazione della composizione prossimale, il contenuto fenolico e di antociani e il contenuto di minerali, e suggerisce il suo potenziale utilizzo nell'area degli integratori alimentari (Durazzo *et al.*, 2020). Inoltre, offre per la prima volta uno screening preliminare della sua attività antimicrobica contro MDR *Enterobacteriaceae* e dimostra la non tossicità di questa matrice alimentare. Presi insieme, i risultati mostrano il potenziale del sommacco come integratore alimentare funzionale e l'applicazione dell'estratto di sommacco nell'industria alimentare, non solo come additivo alimentare ma anche come conservante alimentare efficiente e naturale.

6.6.5. Bibliografia

- Abraham, A. M., Quintero, C., Carrillo-Hormaza, L., Osorio, E., Keck, C. M. Production and Characterization of Sumac Plant Crystals: Influence of High-Pressure Homogenization on Antioxidant Activity of Sumac (*Rhus coriaria* L.) Plants **2021** 10 (6),1051.
- Aghraz, A.; Benameur, Q.; Gervasi, T.; Ait Dra, L.; Ben-Mahdi, M.H.; Larhsini, M.; Markouk, M.; Cicero, N. Antibacterial activity of *Cladanthus arabicus* and *Bubonium imbricatum* essential oils alone and in combination with conventional antibiotics against Enterobacteriaceae isolates. *Lett. Appl. Microbiol.* **2018**, 67, 175–182. <https://doi.org/10.1111/lam.13007>.
- Almouwaly, K.; Alflayeh, K.; Ali, A. Antioxidant and free radical scavenging effects of Iraqi sumac *Rhus coriaria* L. *Baghdader Sci. J.* **2013**, 10, 921–933.
- Alsamri, H.; Athamneh, K.; Pintus, G.; Eid, A.H.; Iratni, R. Pharmacological and Antioxidant Activities of *Rhus coriaria* (Sumac). *Antioxidants* **2021**, 10, 73. <https://doi.org/10.3390/antiox10010073>.
- Ardalani, H.; Hassanpour Moghadam, M.; Hadipanah, A.; Fotovat, F.; Azizi, A.; Soltani, J. Identification and Characterization of Chemical Composition of *Rhus Coriaria* L. Fruit from Hamadan, Western Iran. *Journal of Herbal Drugs* **2016**, 6(4), 195-198.
- Asgarpanah, J.; Saati, S. An Overview on Phytochemical and Pharmacological Properties of *Rhus Coriaria* L. *Research Journal of Pharmacognosy* **2014**, 1, 47–54.
- Association of Official Analytical Chemist (AOAC). **2005** Official Method of Analysis (18th Edition). Washington DC, USA.
- Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibsouda, S.K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* **2016**, 6, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- Benameur, Q.; Gervasi, T.; Giarratana, F.; Vitale, M.; Anzà, D.; La Camera, E.; Nostro, A.; Cicero, N.; Marino, A. Virulence, Antimicrobial Resistance and Biofilm Production of *Escherichia coli* Isolates from Healthy Broiler Chickens in Western Algeria. *Antibiotics* **2021**, 10, 1157. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10101157>.
- Benameur, Q.; Gervasi, T.; Pellizzeri, V.; Pľuchtová, M.; Gruľová, D.; Cicero, N.; Meriem-Hind, B. Comparison of Sensitivity to a Commercial *Origanum Vulgare* Essential Oil between Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBL-) and Non-ESBL-Producing Enterobacteriaceae Isolates. *Nat. Prod. Res.* **2021**, 1–6. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1933969>.
- Benklaouz, M.B.; Aggad, H.; Benameur, Q. Resistance to Multiple First-Line Antibiotics among *Escherichia coli* from Poultry in Western Algeria. *Vet. World* **2020**, 13, 290–295. <https://doi.org/10.14202/vetworld>.
- Conti, F.; Abbate, G.; Alessandrini, A.; Blasi, C. An Annotated Checklist of the Italian Vascular Flora. **2005**. ISBN 88-7621-458-5.
- Dabas, D. Polyphenols as Colorants. *Advances in Food Technology and Nutritional Sciences - Open Journal* **2018**, SE, S1–S6. doi:10.17140/AFTNSOJ-SE-2-101.

- Dewanto, V.; Wu, X.; Adom, K.K.; Liu, R.H. Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 3010–3014. <https://doi.org/10.1021/jf0115589>.
- Doğan, A.; Çelik, İ. Healing Effects of Sumac (*Rhus coriaria*) in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Pharm. Biol.* **2016**, 54, 2092–2102. <https://doi.org/10.3109/13880209.2016.1145702>.
- Dogan, M.; Akgul, A. Characteristics and fatty acid composition of *rhus coriaria* cultivars from southeast Turkey. *Chemistry of Natural Compounds* **2005**, 41, 724–725.
- Durazzo, D.; Lucarini, M.; Santini, A. Nutraceuticals in Human Health. *Foods* **2020**, 9, 370. <https://doi.org/10.3390/foods9030370>.
- Dziki, D.; Cacak-Pietrzak, G.; Hameed Hassoon, W.; Gawlik-Dziki, U.; Suleke, A.; Różyło, R.; Sugier, D. The fruits of sumac (*Rhus coriaria* L.) as a functional additive and salt replacement to wheat bread. *LWT* **2021**, 136, 110346. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110346>.
- Fereidoonfar, H.; Salehi-Arjmand, H.; Khadivi, A.; Akramian, M.; Safdari, L. Chemical variation and antioxidant capacity of sumac (*Rhus coriaria* L.). *Ind. Crop. Prod.* **2019**, 139, 111518.
- Gabr, S.A.; Alghadir, A.H. Evaluation of the Biological Effects of Lyophilized Hydrophilic Extract of *Rhus coriaria* on Myeloperoxidase (MPO) Activity, Wound Healing, and Microbial Infections of Skin Wound Tissues. *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* **2019**, 2019, 5861537. <https://doi.org/10.1155/2019/5861537>.
- Gabr, S.A.; El-Metwally, M.M.; Al-Ghadir, A.H. Antioxidant and antibacterial active constituents of *Rhus coriaria*. *Biotechnology* **2014**, 13, 37–45. <https://doi.org/10.3923/biotech.2014.37.45>.
- Grassia, M.; Sarghini, F.; Bruno, M.; Cinquanta, L.; Scognamiglio, M.; Pacifico, S.; Fiorentino, A.; Geraci, A.; Schicchi, R.; Corona, O. Chemical Composition and Microencapsulation Suitability of Sumac (*Rhus Coriaria* L.) Fruit Extract. *European Food Research and Technology* **2021**, 247. doi:10.1007/s00217-021-03694-1.
- Gulmez, M.; Oral, N.; Vatansever, L. The Effect of Water Extract of Sumac (*Rhus coriaria*) and Lactic Acid on Decontamination and Shelf Life of Raw Broiler Wings. *Poult. Sci.* **2006**, 85, 1466–1471.
- Hariri, N.; Darafshi Ghahroudi, S.; Jahangiri, S.; Borumandnia, N.; Narmaki, E.; Saidpour, A. The Beneficial Effects of Sumac (*Rhus coriaria* L.) Supplementation along with Restricted Calorie Diet on Anthropometric Indices, Oxidative Stress, and Inflammation in Overweight or Obese Women with Depression: A Randomized Clinical Trial. *Phytother. Res.* **2020**, 34, 3041–3051. <https://doi.org/10.1002/ptr.6737>.
- Jayasinghe, C. D.; Jayawardena, U. A. Toxicity assessment of herbal medicine using zebrafish embryos: A systematic review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2019**, Article ID 7272808. <https://doi.org/10.1155/2019/7272808>.
- Khan, F.R.; Alhewairini, S. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism. In *Current Trends in Cancer Management*; IntechOpen: London, UK, 2018; ISBN

978-1-83880-005-5. Available online:
<https://www.intechopen.com/chapters/64178> (accessed on 25 November 2021).

- Khanlarbeik, M.; Fazeli, M.R.; Jamalifar, H.; Ahmadian-Attari, M.M.; Shakiba, R.; Hajimiri, H. Synergistic effects of *Rhus coriaria* L. (sumac) and some commercial antibiotics against Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In: Proceedings of the 71st FIP Congress, Hyderabad, India, 3–8 September **2011**. Available online: <https://www.fip.org/abstracts?page=abstracts&action=item&item=6260> (accessed 25 November 2021).
- Kizil, S.; Haşimi, N.; Tolan, V.; Kilinc, E.; Yuksel, U. Mineral Content, Essential Oil Components and Biological Activity of Two *Mentha* Species (*M. Piperita* L., *M. Spicata* L.). *Turkish Journal of Field Crops* **2010**, 15, 148–153.
- Kosar, M.; Bozan, B.; Temelli, F.; Baser, K.H.C. Antioxidant activity and phenolic composition of sumac (*Rhus coriaria* L.) extracts. *Food Chem.* **2007**, 103, 952–959. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.049>.
- Landi, M.; Guidi, L.; Pardossi, A.; Tattini, M.; Gould, K.S. Photoprotection by Foliar Anthocyanins Mitigates Effects of Boron Toxicity in Sweet Basil (*Ocimum Basilicum*). *Planta* **2014**, 240, 941–953.
- M02; Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 27th ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Wayne, PA, USA, 2017.
- M07-A10; Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard, 10th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Wayne, PA, USA, 2015.
- Mahdavi, S. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Iranian Sumac (*Rhus coriaria* L.) Fruit Ethanolic Extract. *J. Appl. Microbiol. Biochem.* **2018**, 2, 2–5. <https://doi.org/10.21767/2576-1412.100021>.
- Nasar-Abbas, S.M.; Halkman, A.K. Antimicrobial effect of water extract of sumac (*Rhus coriaria* L.) on the growth of some food borne bacteria including pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, 97, 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.04.009>.
- Nicolò, M.S.; Gugliandolo, C.; Rizzo, M.G.; Zammuto, V.; Cicero, N.; Dugo, G.; Guglielmino, S. Nutritional conditions of the novel freshwater *Coccomyxa* AP01 for versatile fatty acids composition. *J. Appl. Microbiol.* **2021**, 132(1), 401–412. <https://doi.org/10.1111/jam.15223>.
- Nostro, A.; Guerrini, A.; Marino, A.; Tacchini, M.; di Giulio, M.; Grandini, A.; Akin, M.; Cellini, L.; Bisignano, G.; Saraçoğlu, H.T. In Vitro Activity of Plant Extracts against Biofilm-Producing Food-Related Bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, 238, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.024>.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test no. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test. In OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2; Organisation for Economic Co-operation and Development: Paris, France, 2013; ISBN 9789264203709.
- Ozcan, M. The Neighboring Keidel Mineral Contents of Same Plants Used as Condiments in Turkey Food. *Chem. Nat. Compd.* **2004**, 84, 74–84.
- Panebianco, F.; Nava, V.; Giarratana, F.; Gervasi, T.; Cicero, N. Assessment of Heavy- and Semi-Metals Contamination in Edible Seaweed and Dried Fish Sold

in Ethnic Food Stores on the Italian Market. *J. Food Compos. Anal.* **2021**, 104, 104150. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104150>.

- Pecoraro, R.; Salvaggio, A.; Marino, F.; di Caro, G.; Capparucci, F.; Lombardo, B.M.; Messina, G.; Scalisi, E.M.; Tummino, M.; Loreto, F.; D'Amante, G., Avola, R., Tibullo, D., Brundo, M. V. Metallic Nano-Composite Toxicity Evaluation by Zebrafish Embryo Toxicity Test with Identification of Specific Exposure Biomarkers. *Curr. Protoc. Toxicol.* **2017**, 74, 1.14.1–1.14.13. <https://doi.org/10.1002/cptx.34>.
- Pecoraro, R.; Scalisi, E.M.; Iaria, C.; Capparucci, F.; Rizza, M.T.; Ignoto, S.; Salvaggio, A.; Fiorenza, R.; Impellizzeri, G.; Brundo, M.V. Toxicological assessment of CeO₂ nanoparticles on early development of zebrafish. *Toxicol. Res.* **2021**, 10, 570–578.
- Raodah, M.; Alia, Z.; Feleeha, H. The antioxidant and antimicrobial activity of Syrian sumac (*Rhus coriaria*) fruits extract. *J. Nat. Sci. Res.* **2014**, 4, 36–40.
- Romeo, F. V.; Ballistreri, G.; Fabroni, S.; Pangallo, S.; Li, M.G.; Nicosia, D.; Schena, L.; Rapisarda, P. Molecules Chemical Characterization of Different Sumac and Pomegranate Extracts Effective against *Botrytis Cinerea* Rots. *Molecules* **2015**, 20, 11941–11958. doi:10.3390/molecules200711941.
- Sakhr, K., El Khatib, S. Physicochemical properties and medicinal, nutritional and industrial applications of Lebanese Sumac (*Syrian Sumac -Rhus coriaria*): A review. *Heliyon* **2020**, 6 (1), e03207. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03207>.
- Santini, A.; Tenore, G.C.; Novellino, E. Nutraceuticals: A paradigm of proactive medicine. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, 96, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.09.003>.
- Shabbir, A. *Rhus Coriaria* Linn, a Plant of Medicinal, Nutritional and Industrial Importance: A Review. *Journal of Animal and Plant Sciences* **2012**, 22, 505–512.
- Shafiei, M.; Nobakht, M.; Moazzam, A.A. Lipid-Lowering Effect of *Rhus coriaria* L. (Sumac) Fruit Extract in Hypercholesterolemic Rats. *Pharmazie* **2011**, 66, 988–992. <https://doi.org/10.1691/ph.2011.1555>.
- Shahryari, F.; Rabiei, Z., Sadighian, S. Antibacterial activity of synthesized silver nanoparticles by sumac aqueous extract and silver-chitosan nanocomposite against *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Journal of Plant Pathology* **2020**, 102(2), 469-475.
- Wali, A.F.; Jabnoun, S.; Razmpoor, M.; Najeeb, F.; Shalabi, H.; Akbar, I. Account of Some Important Edible Medicinal Plants and Their Socio-Economic Importance. In *Edible Plants in Health and Diseases*; Masoodi M.H., Rehman M.U., Eds.; Springer: Singapore, 2022; https://doi.org/10.1007/978-981-16-4880-9_14.
- Westerfield, M. *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio Rerio)*, 5th ed.; University of Oregon Press: Eugene, OR, USA. **2007**.
- Wetherilt, H.; Pala, M. Herbs and Spices Indigenous to Turkey. In: Charalambous, G. Ed.: *Spices, Herbs and Edible Fungi: Developments in Food Science*, Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands. **1994**, 34, 285–307.

6.7. Produzione di bioetanolo da scarti di agrumi

6.7.1. Introduzione

La produzione annuale mondiale di agrumi supera attualmente i 143 milioni di tonnellate (FAO. 2021). Circa il 40-60% degli agrumi è costituito da bucce, polpa esausta e semi, che non sono commestibili e vengono quindi gettati via. La gestione impropria degli scarti di agrumi (Citrus Waste, CW) causa problemi ambientali mentre una gestione appropriata può contribuire al raggiungimento degli obiettivi di sostenibilità globale (Russo *et al.* 2021; Raimondo *et al.* 2018). Tale biomassa di scarto ha un potenziale interessante nei processi di fermentazione grazie al suo alto contenuto di zuccheri fermentescibili. Tuttavia, le bucce degli agrumi contengono anche quantità considerevoli dell'idrocarburo monoterpenico chiamato limonene più un pool di metaboliti bioattivi che ostacolano del tutto la fermentazione. Inoltre, l'elevato contenuto di umidità (~ 75-85%) rende necessaria una fase di degrado non dispendiosa sia in termini energetici che economici (Mahato *et al.* 2019). In sostanza, i recenti tentativi di valorizzare e dare nuova vita agli scarti degli agrumi consistono nella produzione di mangimi pellettati, destinati principalmente ai bovini (Suri *et al.* 2022; Alnaimy *et al.*, 2017). Tuttavia, questa tipologia apparentemente vantaggiosa di recupero da un rifiuto non rispetta il requisito di sostenibilità ambientale (Negro *et al.* 2017). La pellettizzazione dei rifiuti di agrumi è un processo costoso,

accompagnato dall'emissione di gas, come zolfo e anidride carbonica, ossidi di azoto, metanolo formaldeide, tra gli altri, rilascio di particolato; inquinanti derivati dalla decomposizione della materia organica e dal processo di essiccazione. I composti organici volatili (COV) rilasciati dai rifiuti di agrumi sono stati stimati in 9000-18000 tonnellate/anno a livello globale (Mahato *et al.* 2018). Negli ultimi decenni, gli sforzi scientifici sono stati diretti verso la scoperta di metodologie efficienti per l'estrazione di bioattivi dalle risorse naturali (Yaqoob *et al.* 2021; John *et al.* 2020). Dopo la rimozione dei bioattivi e del limonene, la massa di CW può essere ulteriormente lavorata per ottenere prodotti utili, come biocarburanti e materiali assorbenti (Mahato *et al.* 2019). I processi di biotrasformazione coinvolgono fermentazione microbica e/o strategie fisico-chimiche (Sabater *et al.* 2021). In particolare, i biocarburanti ottenuti da CW si sono dimostrati una valida ed efficiente alternativa ai carburanti convenzionali, confermando quindi CW come fonte di energia rinnovabile e sostenibile (Satari & Karimi, 2018). Tra i carburanti alternativi per i motori a combustione, l'etanolo è stato ampiamente studiato negli ultimi anni (Roukas *et al.*, 2022; Patsalou *et al.* 2019) portando a una crescente domanda di questa sostanza chimica soprattutto quando proviene da fonti ecologiche. Una panoramica della letteratura evidenzia che il pretrattamento della biomassa di CW è obbligatorio per l'ottenimento di una buona qualità e resa effettiva di bioetanolo (Patsalou *et al.*, 2017; Boluda-Aguilar *et al.* 2010).

Tale pretrattamento include una serie di procedure fisiche, chimiche, fisico-chimiche e biologiche. La bontà del pretrattamento è un fattore cardine che sostanzialmente influenza la durata della fermentazione, e la produzione di etanolo nel suo complesso (Mahato *et al.* 2019; Mahato *et al.*, 2021; Kundu *et al.* 2021). I rifiuti di agrumi contengono carboidrati che potrebbero essere idrolizzati in zuccheri e utilizzati come materia prima per la produzione di biocarburanti. Considerando il contenuto di carboidrati di CW (70% del contenuto solido totale), esiste un potenziale di produzione mondiale di etanolo di 1,2 miliardi di litri di bioetanolo da CW (Pourbafrani *et al.* 2013). Il bioetanolo, infatti, deriva dalla fermentazione degli zuccheri presenti nei vegetali; è comunemente utilizzato in miscela con la benzina, previa trasformazione in etileter-butiletere (ETBE) o puro al 100% come carburante per autotrazione (Bautista-Herrera *et al.* 2021). Tuttavia, la tecnologia di produzione del bioetanolo di CW non è ancora matura dal punto di vista industriale. I processi convenzionali mostrano evidenti punti di debolezza in termini di resa finale e sostenibilità di alcuni passaggi operativi. In particolare, l'idrolisi acida che viene condotta per minimizzare la degradazione degli zuccheri è una fase dispendiosa dal punto di vista energetico, inoltre gli acidi o le basi utilizzati non sono ecologici. Al contrario, l'idrolisi enzimatica, se non è preceduta da un efficace pretrattamento fisico (cioè microonde, sonicazione, alta

pressione e idrotermia) è un processo più lento e più costoso (Gohain *et al.* 2021).

Questo lavoro mirava a sviluppare, su scala di laboratorio, una strategia sostenibile per l'ottenimento di bioetanolo (BioEt) mediante fermentazione di rifiuti di agrumi (CW). Le attività sperimentali, orientate a massimizzare sia l'eco-efficienza che la resa del processo, sono state applicate a campioni di scarti di arance e mandarini, preventivamente deterpenati (cioè privi di limonene), e provenienti da impianti di lavorazione degli agrumi siciliani. Il processo convenzionale è stato ridisegnato con una “visione green”, superando così i punti di debolezza descritti. In particolare, le fasi chiave del nostro approccio sono state focalizzate su: i) selezione di ceppi batterici ottimali; ii) sostituzione del trattamento di idrolisi acida con metodi fisici e meccanici; iii) aumento della resa finale di bioetanolo attraverso il recupero circolare della sostanza secca residua.

6.7.2. Materiali e metodi

6.7.2.1. Campioni

I rifiuti di agrumi (arance e mandarini) sono stati consegnati attraverso la catena del freddo da un'industria locale di lavorazione degli agrumi a Messina, in Italia. Il CW era precedentemente deterpenizzato attraverso la macinazione criogenica, una nuova tecnica che aumenta l'area superficiale, superando così la perdita di composti volatili, dovuta all'uso di temperature più basse. Ogni

tipologia di CW deterpenizzato è stata conservata in laboratorio a -20°C; quindi è stato omogeneizzato in un frullatore per 10 min. I campioni sono stati analizzati per la loro composizione prossimale.

6.7.2.2. Reagenti

I prodotti chimici sono stati acquistati da Sigma Aldrich (Bellefonte, PA, USA), ad eccezione dell'acido galatturonico e del glucosio, che sono stati acquistati da Fluka Biochemical (Buchs, Svizzera); glicerolo, MgSO₄·7H₂O, KCl e Ca-pantotenato, forniti da Fisher Scientific (UK Ltd., Loughborough, UK); e biotina, fornita da Calbiochem. Enzima commercialmente β-glucosidasi, pectinasi e cellulasi di Novozyme. L'etanolo (grado analitico, 99,5%) è stato acquistato da Sigma-Aldrich (Israele) e successivamente utilizzato senza alcun pretrattamento.

6.7.2.3. Substrato di fermentazione

Il substrato di fermentazione è stato preparato come segue: i CW sono stati omogeneizzati in un frullatore di frutta per 10 min. L'omogenato risultante è stato diluito con acqua distillata al 17% di sostanza secca, in un volume di lavoro di 3,5 L e immediatamente trattato a 121 °C per 10 minuti sotto miscelazione continua per inattivare gli enzimi endogeni e ridurre il deterioramento microbico. Il mezzo di fermentazione è stato integrato con sale fosfato di urea 2,3 g/L, KCl 0,2 g/L, MgSO₄·7H₂O 3,8 g/L, Ca-pantotenato 0,0833 mg/L e biotina 0,0833 mg/L.

6.7.2.4. Microrganismi impiegati nella fermentazione

Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763 e *Saccharomyces bayanus* BCS103 (Manassas, VA, USA) sono stati coltivati e mantenuti su terreno di lievito (YM) agar (estratto di lievito 3 g/L, estratto di malto 3 g/L, peptone 5 g/L, glucosio 10 g /L, agar 20 g/L; Oxoid, Basingstoke, UK) a 4 °C. *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces bayanus* sono stati coltivati separatamente per una notte a 30 °C su un agitatore rotante (INNOVA 44, Incubator Shaker Series, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) a 250 rpm, in provette contenenti 20 mL YM. Dopo l'incubazione notturna, le sospensioni cellulari sono state raccolte in modo asettico mediante centrifugazione (3000 rpm, 5 min, Centrifuge 5810 R, Eppendorf UK Ltd., Stevenage, UK), il supernatante (YM media) è stato scartato e le cellule di lievito sono state lavate due volte in 5 ml di NaCl allo 0,9% (p/v) per ridurre al minimo il trasferimento di nutrienti dalla coltura del seme al mezzo di fermentazione. Le cellule di lievito vitali totali sono state misurate utilizzando un lettore di conta cellulare (Nucleocounter® YC 100™, Chemo Metec, Allerød, Danimarca). La coltura di lievito standard conteneva 10^8 cellule per mL di *S. cerevisiae* ATCC 9763.

6.7.2.5. Composizione prossimale

Le determinazioni delle proteine grezze e dell'umidità sono state eseguite su scarti di agrumi secondo i protocolli di analisi ufficiali dell'AOAC (AOAC, 2012). La proteina grezza è stata determinata

utilizzando il metodo ufficiale AOAC 976.05. In breve, il residuo è stato digerito con acido solforico (98%), selenito di rame (II) diidrato e solfato di potassio mediante SpeedDigester K-439 (Büchi, Svizzera) e quindi analizzato mediante KjellMaster System K-375 (Büchi, Svizzera) dotato di gas e scrubber a vapore (Scrubber K-415, Büchi, Svizzera). La soluzione risultante è stata trattata con idrossido di sodio (40%), per sviluppare ammoniaca, che è stata successivamente distillata e raccolta in 50 mL di acido borico (1%). Quindi, la quantità di azoto è stata determinata mediante titolazione con acido cloridrico (0,1 N). Le percentuali di proteine sono state ottenute dalla percentuale di azoto attraverso un fattore di conversione di 6,25. Per la valutazione dell'umidità sono stati pesati 2 g di campione in una bilancia termica e la temperatura è stata mantenuta a 110°C per 60 min, dopodiché lo strumento ha restituito il contenuto di umidità e sostanza secca.

6.7.2.6. Zuccheri insolubili

Gli zuccheri insolubili sono stati rilasciati dai campioni prelevati al tempo 0, 1, 2 e 3, rispettivamente al tempo 0 il substrato prima dell'inoculo, al tempo 1, 2 e 3 a 24h, 48h, 72h di fermentazione, mediante idrolisi e analizzati mediante fiamma di gas cromatografia a ionizzazione (GC-FID) dopo la conversione nei loro acetati di alditolo. La quantificazione è stata eseguita utilizzando il 2-desossiglucosio come standard interno (Blakeney, 1983).

I monosaccaridi sono stati rilasciati dai polisaccaridi mediante pre-idrolisi dei campioni utilizzando 0,2 mL di H₂SO₄ al 72% (p/p) per 3 ore a temperatura ambiente, seguite da 2,5 ore di idrolisi in 1 M H₂SO₄ a 100 °C. Dopo 1 ora di idrolisi, sono stati raccolti 0,5 mL per la determinazione degli acidi uronici. Dopo l'idrolisi, sono state eseguite la riduzione e l'acetilazione dei monosaccaridi e gli acetati di alditolo sono stati analizzati dal gascromatografo Shimadzu GC2010 dotato di un rivelatore a ionizzazione di fiamma (GC/FID) (Kyoto, Giappone) con una colonna capillare DB-225 (lunghezza 30 m, 0,25 mm ID e 0,15 µm df, 50% cianopropilfenildimetilpolisilossano) (Agilent Technologies, Folsom, CA, USA).

L'analisi delle frazioni surnatanti per la determinazione degli zuccheri solubili residui ha seguito lo stesso protocollo partendo però da un'idrolisi in H₂SO₄ 1 M. Il programma di temperatura del forno era il seguente: da 200 °C a 220 °C a una velocità di 40 °C/min (7 min), aumentando a 230 °C a una velocità di 20 °C/min (1 min). La temperatura dell'iniettore era di 220 °C e quella del rilevatore era di 230 °C. Il gas di trasporto era idrogeno e la portata era fissata a 1,7 mL/min. Gli zuccheri liberi sono stati identificati e quantificati in base ai tempi di ritenzione e ai fattori di risposta ottenuti mediante iniezione standard. Il contenuto di acido uronico è stato determinato con il metodo colorimetrico m-fenilfenolo (Blumenkrantz, 1973) modificato da Rae *et al.* (1985), utilizzando l'acido galatturonico come standard. A 0,5 mL di campione

idrolizzato diluito (1: 4) sono stati aggiunti 3 mL di acido borico 50 mM H₂SO₄ 98% (p/p), dopo aver agitato le provette sono state riscaldate a 100 ° C per 10 min. Dopo raffreddamento, sono stati aggiunti 100 µL di m-fenilfenolo, facendo reagire 30 minuti al buio, e l'assorbanza è stata misurata a 520 nm. Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato.

6.7.2.7. Idrolisi con trattamenti termomeccanici

I campioni sono stati diluiti in acqua distillata per portare la sostanza secca 10% e 17% e successivamente ridotti meccanicamente utilizzando un omogeneizzatore, seguito da un trattamento in autoclave a 121°C per 15 min; bagno ad ultrasuoni per 30 min (Gli ultrasuoni hanno un grande effetto meccanico con una frequenza superiore a 20 KHz, e inferiore a 100 KHz ed esercitano onde d'urto e forza idrodinamica verso la superficie solida, aumentando la grande penetrazione del solvente); trattamento in microonde a 450 W per 8 min.

6.7.2.8. Idrolisi enzimatica

Gli idrolizzati sono stati portati a pH 5 sostituendo l'utilizzo di NaOH 30% come base con NH₄OH, che oltre a non permettere la formazione di sali nocivi nel prodotto finale, rappresenta una fonte di azoto utile per i ceppi utilizzati nel successivo processo di fermentazione. Agli enzimi cellulasi, pectinasi e β-glucosidasi sono stati aggiunti rispettivamente 1,9 mg, 0,8 mg e 1,6 mg/g di

zuccheri riducenti presenti e il tutto è stato incubato a 50°C sotto agitazione (300rpm) per 48 h.

6.7.2.9. Processo di fermentazione

I test di fermentazione sono stati condotti in un fermentatore discontinuo da 5 L (Biostat Biotech B, Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germania). Il fermentatore era dotato di una turbina Rushton a quattro pale e dei consueti sistemi di controllo come segue: temperatura, pH, pO₂, pCO₂ e un rilevatore di schiuma. I parametri di fermentazione erano 30°C, pH 5 e agitazione costante a 300 rpm. Il valore del pH è stato precedentemente regolato da 3,8 a 5, utilizzando 2 M KOH. L'evoluzione della CO₂ è stata misurata durante tutti i test di fermentazione utilizzando un analizzatore BioPAT® Xgas 1 per il sistema BIOSTAT® B-DCU II (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germania) e campioni di brodo duplicati a 24, 48 e 72 ore del processo di fermentazione sono stati prelevati dal recipiente di reazione utilizzando una siringa da 20 ml. I campioni per l'analisi dell'etanolo sono stati immediatamente congelati a -18 °C fino all'analisi, mentre i campioni per le altre determinazioni sono stati riscaldati a 100 °C per 10 minuti, per inattivare gli enzimi e fermare ogni ulteriore fermentazione, e quindi congelati a -18 °C fino all'analisi. Tutte le fermentazioni sono state eseguite fino a quando non sono state osservate ulteriori fluttuazioni di CO₂. Il pH non è stato controllato dall'aggiunta di un alcali durante la fermentazione.

6.7.2.10. Determinazione dell'etanolo prodotto

Il campione è stato prelevato, centrifugato e il surnatante filtrato con filtra da 45 µm per le successive analisi gascromatografiche.

L'analisi dell'etanolo è stata condotta utilizzando un gascromatografo (GC) dotato di un iniettore split/splitless e un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) (Dani Master GC1000, Dani Instrument, Milano, Italia). È stata impiegata una colonna capillare Supelco SLB IL100, 60 m × 0,25 mm ID, 0,20 µm di spessore del film (Supelco, Sigma Aldrich, USA). La temperatura del forno (e quindi la temperatura della colonna e dell'iniettore) è stata inizialmente impostata a 50 °C e quindi aumentata alla velocità da 7°C/min a 100°C, fornendo così un tempo di esecuzione totale di 7 min. Inoltre, 1 µl di campione è stato iniettato manualmente al tempo 0, utilizzando una siringa Hamilton da 5 µl ed è stato avviato il ciclo di temperatura. La siringa è stata accuratamente lavata con acetato di etile tra le iniezioni per evitare la contaminazione incrociata. Ogni iniezione è stata ripetuta tre volte, l'etanolo è uscito di routine a un tempo di ritenzione equivalente a 65°C. (Gerchman *et al.*, 2012). Un semplice metodo rapido gascromatografico a ionizzazione di fiamma (GC-FID) per la determinazione dell'etanolo dai processi di fermentazione.

6.7.3. Risultati e discussioni

6.7.3.1. Composizione prossimale

In linea con precedenti lavori, (Tamburino *et al.*, 2009) la percentuale di proteina grezza era di 6,25 g/100g di prodotto.

La percentuale di sostanza secca del campione di pastazzo era di 20,20±1,5 g/100g. I risultati delle analisi relative al contenuto di zuccheri riducenti dopo la prima e la seconda idrolisi sono nella tabella 1.

Campione	Zuccheri riducenti (g/L)
Dopo la I idrolisi	62,55±3,37
Dopo la II idrolisi	79,51±4,89

Tabella 1: Zuccheri riducenti dopo la I e la II idrolisi. I valori rappresentano la media ± la deviazione standard calcolata da tre determinazioni.

6.7.3.2. Identificazione dei migliori ceppi per la produzione di etanolo

Nonostante siano stati impiegati diversi lieviti e ceppi batterici per la produzione di bioetanolo a partire da scarti lignocellulosici, è emerso che *Saccharomyces cerevisiae* risulta essere il ceppo di elezione in quanto la sua crescita non viene inibita da alte concentrazioni di etanolo e a vari intervalli di pH (Harris *et al.*, 2001). In seguito alle prove di fermentazione è stato visto che i ceppi *S. bayanus* BCS103 e *S. cerevisiae* ATCC 9763 hanno dato una resa maggiore in termini di bioetanolo prodotto; rispettivamente 1,1 % V/V e 1,5 % V/V.

6.7.3.3. Fermentazione

I risultati ottenuti dai test condotti nel fermentatore, impostando i parametri come riportato nella sezione materiali e metodi, indicano che la produzione di bioetanolo diminuiva dopo le 48h di fermentazione, di conseguenza la resa potrebbe essere incrementata con un processo in continuo o semicontinuo, aggiungendo ogni 48h del nuovo substrato idrolizzato in modo da mantenere elevato il contenuto di zuccheri riducenti disponibili nel mezzo per favorire la fermentazione da parte di *S. cerevisiae* ATCC 9763. Le attività svolte hanno dato una resa in termini di EtOH di 15 g/170g di sostanza secca dopo 48h di produzione. Il grafico riportato in figura 1 indica che la fermentazione è avvenuta correttamente, tutti i parametri sono stati mantenuti costanti per tutta la durata del processo.

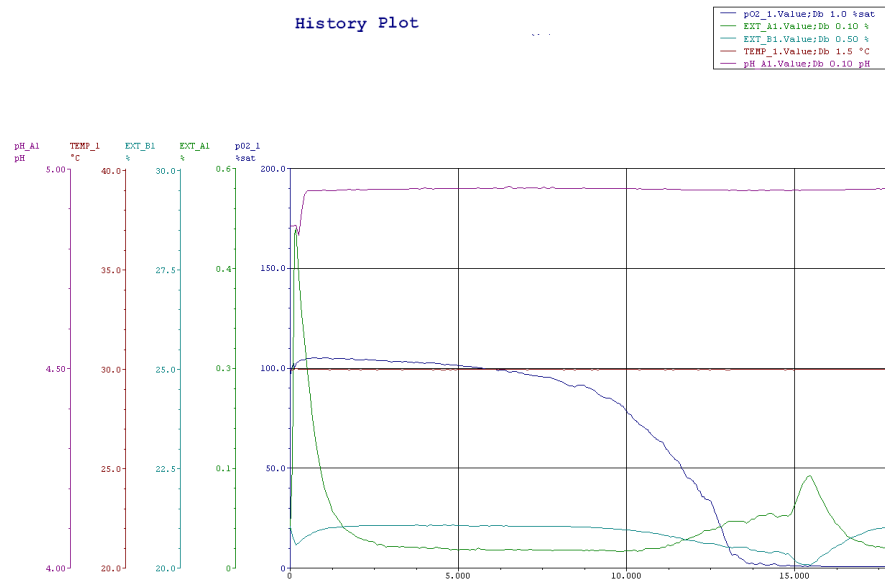


Figura 1: Andamento dei parametri durante il processo di fermentazione

6.7.4. Conclusioni

Le risultanze delle attività sperimentali svolte restituiscono l'evidenza che il processo di idrolisi con trattamenti fisici e meccanici del pastazzo consente il raggiungimento di un'ottima resa in zuccheri riducenti (79,5 %).

I ceppi *S. cerevisiae* ATCC 9763 e *S. bayanus* BCS 103 sembrano essere i migliori per la produzione di bioetanolo con una resa di rispettivamente di 1,5 % V/V e 1,1 % V/V. Inoltre, lo scale-up in fermentatore, a determinate condizioni, ha permesso di avere una resa di EtOH maggiore rispetto al processo in beuta (15 g/170 g di sostanza secca). Per aumentare ulteriormente l'efficienza del processo potrebbe essere utile l'utilizzo di fermentatori in continuo con l'aggiunta di substrato idrolizzato ogni 24h.

6.7.5. Bibliografía

- Alnaimy A, Gad AE, Mustafa MM, 2017. Using of citrus by-products in farm animals feeding. *Open Access J Sci.* 1(3):58-67. DOI: [10.15406/oajs.2017.01.00014](https://doi.org/10.15406/oajs.2017.01.00014).
- Bautista-Herrera, Adrián, Francisco Ortiz-Arango, and José Álvarez-García. 2021. "Profitability Using Second-Generation Bioethanol in Gasoline Produced in Mexico" *Energies* 14, no. 8: 2294. <https://doi.org/10.3390/en14082294>
- Boluda-Aguilar, M., Garcia-Vidal, L., del, Pilar, Gonzalez-Castaneda, F., & Lopez- Gomez, A. 2010. Mandarin peel wastes pretreatment with steam explosion for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 101 (10), 3506–3513. 10.1016/j.biortech.2009.12.063.
- FAO. 2021. Citrus Fruit Statistical Compendium 2020. Rome.
- Gohain, Minakshi & Hasin, Maskura & Eldiehy, Khalifa & Bardhan, Pritam & Laskar, Khairujjaman & Phukon, Hridoyjit & Mandal, Manabendra & Kalita, Dipul & Deka, Dhanapati, 2021. Bio-ethanol production: A route to sustainability of fuels using bio-based heterogeneous catalyst derived from waste. *Process Safety and Environmental Protection*. 146. 190-200. 10.1016/j.psep.2020.08.046.
- Harris Group Inc. 2001. Liquid/solid separation, presented to National Renewable Energy Laboratory, report 99-10600/14, March 2001.
- John, I., Pola, J., Thanabalan, M., & Appusamy, A. 2020. Bioethanol production from musambi peel by acid catalyzed steam pretreatment and enzymatic saccharification: Optimization of delignification using taguchi design. *Waste and Biomass Valorization*, 11 (6), 2631–2643. 10.1007/s12649-018-00565-x.
- Kundu, D., Banerjee, S., Karmakar, S., Banerjee, R., 2021. Valorization of citrus lemon wastes through biorefinery approach: an industrial symbiosis. *Bioresour. Technol. Reports* 15, 100717. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100717>.
- Mahato, N., Sharma, K., Sinha, M., Cho, M.H., 2018. Citrus waste derived nutra-/ pharmaceuticals for health benefits: current trends and future perspectives. *J. Funct. Foods* 40, 307–3164
- Mahato, N., Sharma, K., Sinha, M., Dhyani, A., Pathak, B., Jang, H., ... & Cho, S. 2021. Biotransformation of citrus waste- I: Production of biofuel and valuable compounds by fermentation. *Processes*, 9(2), 220.
- Mahato, N., Sinha, M., Sharma, K., Koteswararao, R., Cho, M.H., 2019. Modern extraction and purification techniques for obtaining high purity food-grade bioactive compounds and value-added co-products from citrus wastes. *Foods* 8 (11), 523.
- Negro, V., Ruggeri, B., Fino, D., Tonini, D., 2017. Life cycle assessment of orange peel waste management. *Resour. Conserv. Recycl.* 127, 148–158. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.08.014>.
- Patsalou, M., Menikea, K.K., Makri, E., Vasquez, M.I., Drouza, C., Koutinas, M., 2017. Development of a citrus peel-based biorefinery strategy for the production of succinic acid. *J. Clean. Prod.* 166, 706–716.
- Patsalou, M., Samanides, C.G., Protopapa, E., Stavrinou, S., Vyrides, I., Koutinas, M., 2019. A citrus peel waste biorefinery for ethanol and methane production. *Molecules* 24, 2451.

- Pourbafrani, M., McKechnie, J., Maclean, H.L., Saville, B.A., 2013. Life cycle greenhouse gas impacts of ethanol, biomethane and limonene production from citrus waste. *Environ. Res. Lett.* 8 (1) <https://doi.org/10.1088/1748-9326/8/1/015007>.
- Raimondo, M., Caracciolo, F., Cembalo, L., Chinnici, G., Pecorino, B., D'Amico, M., 2018. Making virtue out of necessity: managing the citrus waste supply chain for bioeconomy applications. *Sustainability* 10, 4821. <https://doi.org/10.3390/su10124821>.
- Roukas, Triantafyllos & Kotzekidou, Parthena, 2022. From food industry wastes to second generation bioethanol: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 21. 1-31. 10.1007/s11157-021-09606-9.
- Sabater, C., Blanco-Doval, A., Montilla, A., Corzo, N., 2021. Optimisation of an enzymatic method to obtain modified artichoke pectin and pectic oligosaccharides using artificial neural network tools. In silico and in vitro assessment of the antioxidant activity. *Food Hydrocolloids* 110, 106161. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106161>.
- Satari, B., Karimi, K., 2018a. Citrus processing wastes: environmental impacts, recent advances, and future perspectives in total valorization. *Resour. Conserv. Recycl.* 129, 153–167.
- Satari, B., Karimi, K., 2018b. Citrus processing wastes: environmental impacts, recent advances, and future perspectives in total valorization. *Resour. Conserv. Recycl.* 129, 153–167. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.10.032>.
- Suri, Shweta & Singh, Anupama & Nema, Prabhat, 2022. Current Applications of Citrus Fruit Processing Waste: A Scientific Outlook. *Applied Food Research*. 2. 100050. 10.1016/j.afres.2022.100050.
- Tamburino, Vincenzo & Zema, Demetrio. 2009. I sottoprodotti dell'industria di trasformazione: il pastazzo di agrumi.
- Yaqoob, H., Teoh, Y.H., Goraya, T.S., Sher, F., Jamil, M.A., Rashid, T., Yar, K.A., 2021a. Energy evaluation and environmental impact assessment of transportation fuels in Pakistan. *Case Stud. Chem. Environ. Eng.* 3, 100081.

7. Conclusioni finali e prospettive future

Questo elaborato ha preso in considerazione le problematiche relative ai rifiuti alimentari, soprattutto dei sottoprodotti derivanti dalle produzioni che possono essere ulteriormente sfruttati, producendo componenti ad alto valore aggiunto e allo stesso tempo causando un minor impatto ambientale.

Dalle ricerche condotte durante il triennio di dottorato mi sono concentrate sulla possibilità di utilizzare scarti provenienti da varie fasi di produzione dell'industria alimentare, attraverso tecniche analitiche e fermentative sono stati ottenuti promettenti risultati, alcuni oggetto di pubblicazioni su riviste scientifiche.

L'economia circolare, principio cardine sul quale si basa la prospettiva futura, racchiude un ciclo di tematiche da soddisfare per consentire la "sostenibilità". Sostenibilità definita come la possibilità di garantire i quattro capitali (umano, naturale, economico e ambientale) nel tempo e nello spazio. Erroneamente, quando si pensa all'economia circolare, oggi, si sintetizza riferendosi al singolo pensiero dell'impatto ambientale. In realtà, il benessere dell'individuo e dell'ambiente dipende dalla soddisfazione dei 4 capitali. Il mio percorso di dottorato, in Scienze chimiche, mi ha consentito di ampliare le mie conoscenze

sull'utilizzo delle tecniche analitiche per la valorizzazione degli scarti, con il fine di contribuire, ad ogni livello della filiera produttiva, allo sviluppo di un pensiero di sostenibilità. La ricerca potrebbe rappresentare un anello di congiunzione tra la teoria e la messa in atto di determinati comportamenti che potrebbero consentire in un futuro di prevenire e gestire le problematiche legate all'” *insostenibilità*”.

8. Ringraziamenti

Ci tengo a ringraziare i miei docenti, facenti parte del laboratorio di chimica degli alimenti dell'Università Degli studi di Messina. In particolare, il Prof. Giacomo Dugo, il Prof. Nicola Cicero e la professoressa Teresa Gervasi. Ho trovato in loro dei mentori e dei punti di riferimento che mi saranno da guida anche negli anni futuri;

Ringrazio i miei colleghi per il supporto, i sorrisi e le collaborazioni, tra loro Vincenzo Nava, Laura De Maria, Laura Messina, Rita De Pasquale, Rossana Rando e Giovanni Bartolomeo;

Ringrazio mia madre, la donna che mi ha insegnato il valore dell'impegno;

Ringrazio Alberto che è riuscito a sopportarmi e supportarmi durante i momenti più impegnativi.