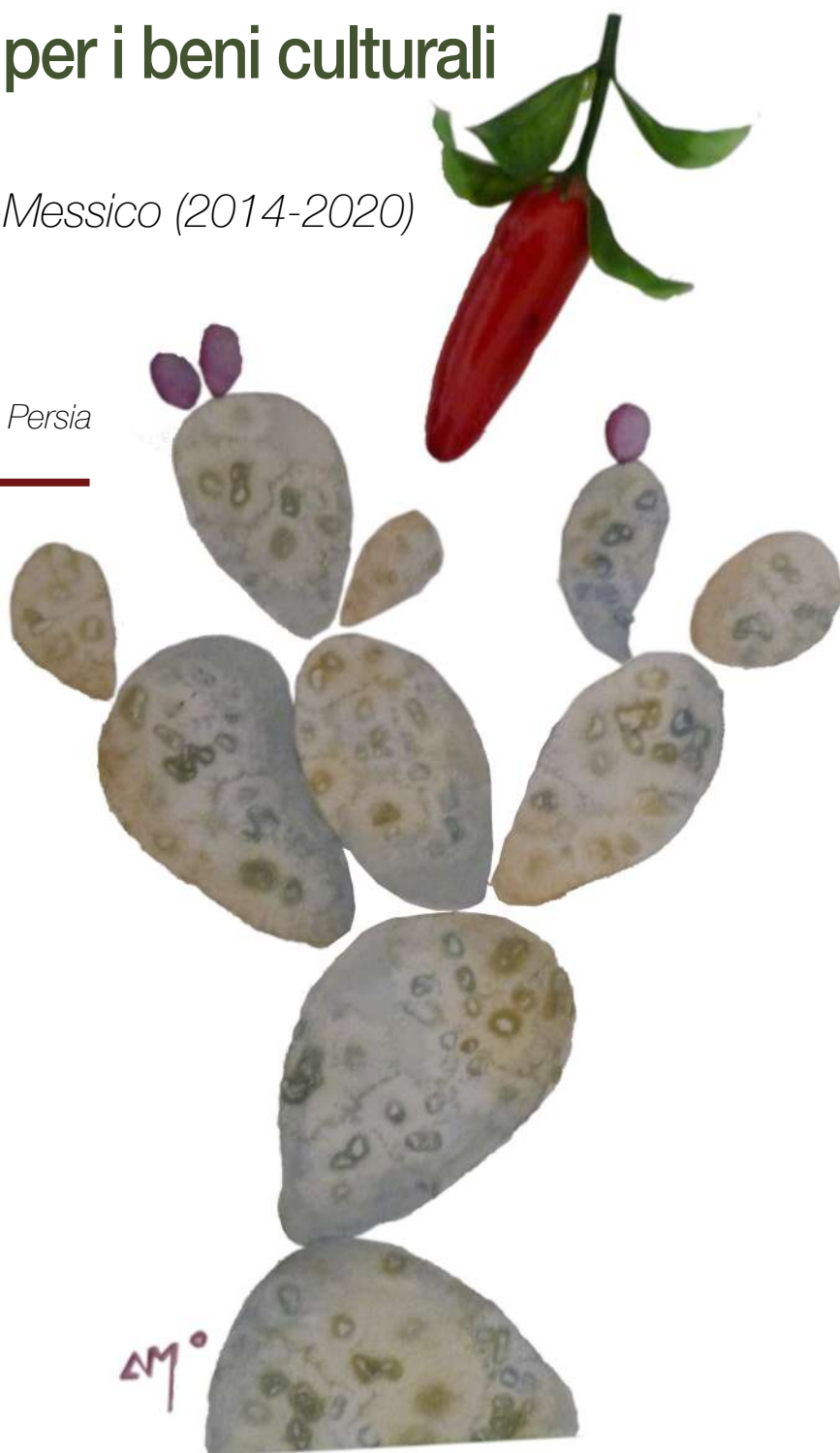


Da *Opuntia ficus-indica* e *Capsicum spp.* prodotti sostenibili per i beni culturali

Il Programma Bilaterale Italia-Messico (2014-2020)

A cura di

Chiara Alisi, Loretta Bacchetta, Franca Persia



This report includes the activities carried out in the framework of the Mobilità between Italy and Mexico, the Ministry of Foreign Affairs and International Cooperation and ENEA, concerning the use of natural products derived from *Opuntia ficus-indica* and *Capsicum spp.* for a sustainable restoration.

*Da Opuntia ficus-indica e Capsicum spp. prodotti sostenibili per i beni culturali
Il Programma Bilaterale Italia-Messico (2014-2021)*

A cura di Chiara Alisi, Loretta Bacchetta, Franca Persia

2021 ENEA
Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia
e lo sviluppo economico sostenibile

ISBN: 978-88-8286-407-1

Progetto grafico: Cristina Lanari

Revisione editoriale: Giuliano Ghisu

Stampa: Laboratorio tecnografico – Centro Ricerche ENEA Frascati

Immagine di copertina: acquarello di Alejandro Meza Orozco, foto di Chiara Alisi

"La memoria es el deseo satisfecho"

Carlos Fuentes (1962)

Scrivendo Carlos Fuentes nel suo libro Terra nostra del 1975: "La tradizione e il passato sono reali soltanto quando vengono toccati, e a sua volta sottomessi, dall'immaginazione poetica del presente". In questo passaggio si percepisce un nuovo concetto, per cui la storia è presente, perché quello che succede oggi è già storia e sorprendentemente 'l'origine del passato è il presente'. L'analogia con questo volume che parla di Beni Culturali è il tentativo di dare validità scientifica a una tradizione popolare addirittura di epoca preispanica, il passato e il presente che si riconciliano nella evidenza scientifica.

L'idea della ricerca descritta in queste pagine nasce dal valore dei saperi tradizionali di specie multifunzionali come l'Opuntia ficus-indica (nopal) e il Capsicum spp., originarie della Mesoamerica e che sono migrate e adattate nelle diverse aree del mondo, seguendo le esigenze e le intuizioni umane.

L'importanza delle piante per la vita dell'uomo è nota da sempre e, così come per ogni altra forma animale, la vita umana dipende dal mondo vegetale. Diversi studi di archeobotanica identificano l'uso di componenti organiche nelle opere d'arte di epoca Romana e, nello specifico, l'impiego della gomma del nopal è stato documentato nei siti archeologici precolombiani di Monte Albán e Suchilquitongo così come l'uso della mucillagine ricavata dal fico d'India. Per comprenderne le ragioni, in questo volume sono riportati alcuni degli studi realizzati durante la collaborazione scientifica bilaterale tra Italia e Messico, con lo scopo di entrare nel merito delle proprietà fisico-chimiche dei bio-prodotti utilizzati e di descriverne il loro effetto, anche in casi studio concreti. Se le popolazioni originarie sono state attratte da un'intuizione empirica, oggi l'uso di prodotti vegetali estratti da sottoprodotti (come ad esempio la mucillagine dai cladodi) segna il passo verso una maggiore 'sostenibilità' della coltivazione stessa, per l'economia circolare che attiva e per l'operatore/restauratore che impiegherà sostanze meno impattanti per l'ambiente e per la salute.

Lo sforzo multidisciplinare che ha coinvolto competenze umanistiche e scientifiche in questo lavoro ha portato a un mutuo trasferimento tra le culture messicana e italiana, a una contaminazione reciproca, che hanno arricchito lo sguardo e aperto nuove prospettive di ricerca.

La ricerca che si presenta in questo volume ci mostra un altro utilizzo e un'altra vocazione del nopal, aggiungendo un ulteriore valore a questa pianta che ha accompagnato i messicani in tutta la loro storia: un alimento che li ha nutriti e un medicamento che li ha curati. Ma il nopal è anche uno dei simboli più nitidi della nostra identità nazionale. Il nopal fa parte della dieta messicana dal periodo preispanico fino ai giorni nostri. Da questa pianta, in Messico, non soltanto si mangia il frutto, il fico d'India, ma anche le foglie tenere (i nopalitos) servono da complemento alimentare.

Nel lungo percorso dalla mitica terra di Aztlan per arrivare alla fondazione di Tenochtitlan, l'attuale Città del Messico, il nopal fu un'importante fonte di nutrimento e di acqua della popolazione indigena in movimento. E fu anche uno dei segni che gli Dei indicarono ai na-

tivi per identificare il luogo dove fondare la loro città e lo Stato: in quel posto avrebbero avvistato un'aquila che afferrava e divorava una serpe poggiata su una pianta di nopal. Oggi quest'immagine è diventata l'emblema nazionale e caratterizza il tricolore della bandiera del Messico.

Il nopal ogni volta di più sta diventando un significativo comparto economico dell'agricoltura del Messico e fonte di reddito della popolazione rurale. Ci sono più di 3 milioni di ettari dove le varie specie di questa cactacea crescono in modo spontaneo ed è crescente il numero di ettari dedicati alla coltivazione del nopal (ca. 500 mila ettari negli ultimi anni). La diversificazione dell'uso comprende il consumo umano (frutto e foglie), il consumo animale, gli integratori alimentari, i prodotti farmaceutici e la cosmetica. La sola produzione di fico d'India si aggira intorno a 500 mila tonnellate all'anno (dato 2017) con la partecipazione di più di 20 mila produttori.

Le migrazioni del nopal hanno anche interessato la Sicilia durante il periodo della colonizzazione spagnola, ma in tempi più recenti sono state fondamentali per il consumo animale in Brasile e in Sudafrica. I nostri fratelli brasiliani ci rendono un affettuoso omaggio chiamando il nopal: palma messicana.

Il nopal, come ho accennato, nasconde anche un vero tesoro per la salute umana: aminoacidi, vitamine, minerali (calcio, rame, fosforo, potassio, magnesio, sodio e ferro), così come di fibre alimentari solubili e insolubili. In sintesi, da tutti questi elementi derivano le virtù antinfiammatorie e antiossidanti di questa grande pianta che giustamente le popolazioni indigene consideravano sacra.

Vorrei congratularmi e ringraziare l'ENEA ed El Colegio de Michoacán per questo importante contributo scientifico che rafforza i rapporti di cooperazione fra il Messico e l'Italia. Ringrazio di cuore infine il supporto ricevuto dal Ministero degli Affari Esteri e della Cooperazione Internazionale (MAECI) e dal Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Carlos García de Alba

Ambasciatore del Messico in Italia

Vicepresidente dell'IILA – Organizzazione Internazionale Italo-Latinoamericana

SOMMARIO

1. Breve storia del Bilaterale e Grande Rilevanza	7
2. La tradizione messicana nelle applicazioni delle mucillagini di <i>Opuntia ficus-indica</i> e del <i>Capsicum spp.</i> per i beni culturali e l'importanza economica delle specie	10
3. Estrazione e caratterizzazione di mucillagine da cladodi di <i>Opuntia ficus-indica</i> e di capsaicinoidi da frutti di <i>Capsicum spp.</i>	15
4. I prodotti NopalGel e NopalCap: <i>shelf life</i> del prodotto fresco, liofilizzazione, <i>spray dryer</i>	36
5. Applicazioni sperimentali in laboratorio	46
6. La biorecettività dei materiali trattati con NopalGel e NopalCap	66
7. Casi studio di applicazioni di NopalGel e NopalCap in lavori di restauro	73
8. Conclusioni	84



1. Breve storia del Bilaterale e Grande Rilevanza

di Franca Persia, Chiara Alisi, Loretta Bacchetta

Questo volume è il frutto dell'attività svolta in ENEA sull'applicazione della mucillagine di fico d'India (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller, OFI) e poi dell'estratto di frutti di *Capsicum* spp. (peperoncino, la specie più comune *Capsicum annuum*), nel settore dei beni culturali. L'applicazione di queste sostanze vegetali nel campo della conservazione è stata sviluppata all'interno di progetti finanziati dal Programma Esecutivo di Cooperazione Scientifica e Tecnologica tra l'Italia e gli Stati Uniti del Messico, promossi e finanziati dal Ministero per gli Affari Esteri e della Cooperazione Internazionale (MAECI). Per il Messico il finanziamento è avvenuto da parte del CONACYD e il nostro partner è stato El Colegio de Michoacán, un'istituzione pubblica messicana che, tra le sue linee di ricerca, ha anche lo sviluppo e la ricerca nel settore del patrimonio culturale. Ai due progetti, il primo con il titolo "Recupero di antiche tecnologie messicane per lo sviluppo di prodotti sostenibili per il restauro dei beni culturali" (2014-2017) e il secondo "Realizzazione di biomateriali per il restauro sostenibile dei beni culturali attraverso la valorizzazione di specie vegetali multifunzionali: *Opuntia ficus-indica* e *Capsicum* spp." (2018-2020) che hanno finanziato lo scambio dei ricercatori, negli anni 2016-2020 si è aggiunta un'altra modalità di sostegno alla ricerca, attraverso il cofinanziamento dei progetti "Grande Rilevanza" per lo svolgimento di attività congiunte con il nostro partner messicano.

Prima di procedere a illustrare le attività svolte e i risultati ottenuti, riteniamo utile presentare brevemente la nascita di questa collaborazione, per mezzo della quale è stata trasferita dal Messico in Italia l'applicazione della mucillagine di fico d'India (OFI) come additivo nel restauro, con la finalità di migliorare la durabilità di alcune tipologie di beni culturali, attraverso la formazione di malte più compatte e con il contributo dell'attività biocida di estratti di peperoncino.

L'idea di indagare scientificamente un uso della tradizione empirica mesoamericana, che si ritiene risalga all'epoca preispanica, ci è stata proposta nel 2014 dalla restauratrice italo-messicana Fernanda Falcon, che è così entrata a far parte del gruppo di ricerca, dando un contributo applicativo a questo tema. L'essere venuti a conoscenza del fatto che le popolazioni indigene del Messico mescolavano alla calce l'estratto dei cladodi del fico d'India (in Messico chiamato *nopal*) per la preparazione dell'intonaco per dipinti murali, ha fornito la base per costruire un progetto di ricerca con la finalità di trasferire l'uso di estratti vegetali al settore della conservazione italiano. Questo uso tradizionale è tuttora impiegato da gran parte dei restauratori messicani. Gli studi pionieristici di Diana Magaloni negli anni '90 indicavano che la possibile causa dell'eccellente stato di conservazione e della brillantezza dei pigmenti di molti dipinti murali preispanici risiedesse nella presenza di mucillagine di OFI nella calce.

Si è così utilizzato lo strumento del Programma Bilaterale del MAECI per mettere a punto un progetto di ricerca che studiasse le basi scientifiche di questo fenomeno, per poter proporre anche in Italia l'uso della mucillagine di *nopal* come prodotto naturale e sostenibile per il restauro, in un partenariato che comprendesse l'ENEA per la parte italiana e El Colegio de Michoacán per la parte messicana, con Fernanda Falcon a fare da ponte tra le due istituzioni.

L'esperienza nel campo della qualificazione di prodotti commerciali per il restauro, anche modificati con nanoparticelle, la competenza nell'utilizzo di tecniche diagnostiche non distruttive per il controllo della durabilità e dell'efficacia dell'applicazione di consolidanti e protettivi per i materiali lapidei, ci ha permesso di cogliere le prospettive di tale applicazione. Inoltre l'interdisciplinarietà presente nel Centro Ricerche ENEA Casaccia ha permesso di mettere in piedi un gruppo di ricerca dove le varie competenze di chimica, biologia, fisica, agronomia hanno consentito di affrontare a tutto tondo le problematiche scaturite nello sviluppo di un pro-



dotto a base vegetale, dalla sua preparazione fino all'applicazione, curando in particolare il controllo della biorecettività.

Nel secondo bando del Programma Esecutivo (2018-2020), spinte dall'idea di ampliare lo studio delle applicazioni del *nopal* nel campo del restauro e conservazione, abbiamo pensato di realizzare un prodotto che combinasse le caratteristiche della mucillagine di OFI con quelle di un'altra pianta proveniente dalle Americhe, il *Capsicum*, genere che comprende molte specie, di cui sono note in campo medicinale le proprietà antibatteriche degli estratti. Con il progetto "Realizzazione di biomateriali per il restauro sostenibile dei beni culturali attraverso la valorizzazione di specie vegetali multifunzionali: *Opuntia ficus-indica* e *Capsicum spp.*" si è ampliato il campo alla tematica della sostenibilità nel settore della conservazione, puntando alla messa a punto di prodotti naturali per il restauro ed estendendo le applicazioni a materiali diversi dalle malte aeree.

Nel corso della realizzazione dei due progetti ci siamo poste domande diverse e sulla base di esse, di conseguenza, ci siamo posti obiettivi differenti. Il presente lavoro riassume quindi, nel capitolo 2, la tradizione dell'utilizzo di estratti di fico d'India nell'arte e nei beni culturali raccogliendo le informazioni storiche disponibili, accennando all'importanza antropologica delle due piante (*Opuntia* e *Capsicum*), nonché alla loro importanza economica e multifunzionale del contesto europeo dell'economia circolare e della bioeconomia. Partendo dalla necessità di riuscire a mettere a punto una efficiente metodologia estrattiva della mucillagine dai cladodi di *Opuntia* (con valutazione delle rese e delle caratteristiche dell'estratto ottenuto con diversi metodi) si è passati alla caratterizzazione chimico-fisica degli estratti. Del NopalGel (ossia dell'estratto di fico d'India), del NopalCap (NopalGel addizionato di estratto di *Capsicum*) e della loro stabilizzazione (*shelf life*), vengono forniti dettagli nei capitoli 3 e 4.

Prima di passare alle applicazioni del NopalGel e del NopalCap sui beni culturali reali, abbiamo

voluto verificare in laboratorio su provini preparati *ad hoc*, alcune loro proprietà: nel capitolo 5 sono presentate le sperimentazioni realizzate su campioni di malta aerea, come supporto di dipinti murali, su malte idrauliche, su mattoni di terra cruda, sul supporto di una tela per dipinti, su carta moderna e su film di amido termoplastico.

Un altro obiettivo che ci siamo poste già all'inizio dell'attività, una volta analizzata la composizione della mucillagine sia negli estratti messicani che in quelli italiani, è stato quello di verificare la biorecettività di tale miscela, per poterla applicare su beni storico-artistici senza correre il rischio di favorire l'attacco biologico di specie biodeteriogene. Le prove di biorecettività realizzate su materiali trattati con i nuovi prodotti NopalGel e NopalCap (provini di malte aeree e idrauliche e carta) sono illustrate nel capitolo 6.

Il capitolo 7 illustra infine alcuni tra i casi di restauro più significativi che hanno visto l'applicazione dei prodotti NopalGel e NopalCap.

Il capitolo 8 trae le conclusioni e indica alcune prospettive future.

Molte delle attività sperimentali sono state oggetto di tesi di laurea, di dottorato e di stage del progetto "Torno subito". Inoltre questa iniziativa segue un precedente libro in spagnolo più focalizzato sugli aspetti antropologici del fico d'India, realizzato in collaborazione con i nostri partner e pubblicato dal Colegio di Michoacan¹.

Nel corso degli anni abbiamo riscontrato molto interesse da parte dei restauratori per questa attività di ricerca. Ciò ci ha indotto a perseguire la strada della messa a punto di un prodotto caratterizzato, disponibile sul mercato e facile da utilizzare. Siamo pertanto impegnati nello sforzo di

1 Innovar desde la tradición: Desarrollo de productos sostenibles para la restauración del patrimonio cultural, a partir de la *Opuntia ficus-indica* y las antiguas técnicas mexicanas. Edición de El Colegio de Michoacán, A.C. Mexico. *In press.*



confrontare le caratteristiche del liofilizzato con quelle del prodotto fresco. Inoltre la collaborazione nata con i produttori siciliani di fico d'India sta dando spunti per ulteriori e diverse applicazioni. Di prospettive, ad esempio applicazioni diverse da quelle del settore della conservazione, i due progetti bilaterali ne hanno fatte nascere molte, e speriamo che quelle che in questo testo sono

indicate come conclusioni, in realtà non lo siano affatto, ma rappresentino spunti per ulteriori applicazioni. Il valore aggiunto è stato indubbiamente lo scambio culturale che, anche nelle visite reciproche, ha creato possibilità di confronto e sinergia nelle capacità professionali, arricchendo così l'esperienza scientifica e umana.



2. La tradizione messicana nelle applicazioni delle mucillagini di *Opuntia ficus-indica* e del *Capsicum* per i beni culturali e l'importanza economica delle specie

di Mirta Insaurralde, Alejandro Meza Orozco, Emanuel Bojorquez-Quintal, Maria Fernanda Falcon Martinez, Loretta Bacchetta

Fin dal tempo preispanico, gli abitanti del Messico hanno sfruttato le qualità delle numerose specie della flora locale; alcune furono apprezzate per le proprietà medicinali, altre furono impiegate come alimenti e altre furono utilizzate per produrre oggetti artistici. In virtù della ricerca di prodotti adatti al restauro che fossero compatibili con i materiali originali, efficienti e con basso impatto ambientale, ci interessa indirizzare uno sguardo alla produzione artistica e al sapere tradizionale lungamente radicato in Messico, per riprendere prodotti che, una volta caratterizzati e sottoposti a prove di laboratorio, possano integrarsi al repertorio di materiali impiegati nel restauro. Tra le pratiche artistiche antiche si trova ad esempio l'uso della mucillagine dell'orchidea, chiamata *tzautli* in nahuatl (e *tatzingui* in purépecha), spesso utilizzata nell'elaborazione di figure di pasta di canna di mais o utilizzata come adesivo per decorazioni con piume. Questa tecnica fu successivamente adattata alla produzione d'immagini cristiane. Anche l'uso dell'olio di chía è documentato in opere pittoriche precolombiane, perché migliorava le qualità dell'asciugatura delle pitture e delle vernici. Fray Pablo Beaumont, nella "Crónica de Michoacán" (1792) ha mostrato che le pitture realizzate dai "Purépechas" (nativi di Michoacán) si mantenevano in perfetto stato grazie proprio all'uso dell'olio estratto dai semi della chía. Di seguito sono illustrati alcuni riferimenti sugli usi tradizionali e sull'importanza economica delle specie di interesse di questo lavoro: *Opuntia ficus-indica* e *Capsicum*.

La mucillagine del fico d'India

Il fico d'India, chiamato *nopal* in messicano, è una cactacea del genere *Opuntia*, che include più di 300 specie, molte di queste distribuite in grande scala in Messico. Documentato fin dai tempi preistorici è il suo uso nelle opere pittoriche. La pioniera degli studi sui materiali della pittura murale preispanica Diana Magaloni ha caratterizzato la tecnica murale precolombiana utilizzando strumenti e metodologie d'analisi scientifica. Magaloni ha identificato la gomma di fico d'India come agglutinante delle pitture murali di Cacaxtla², localizzate nell'attuale stato di Tlaxcala. L'uso della gomma di *Opuntia* come legante sarebbe una caratteristica distintiva dei dipinti murali di Cacaxtla, infatti se compariamo la tecnica pittorica utilizzata a Teotihuacán, o quella utilizzata nell'area Maya, si nota che i prodotti vegetali utilizzati erano diversi e provenivano da altri tipi di piante.

Sempre dalle indagini di Magaloni è emerso inoltre che la malta per intonaci era realizzata impastando la calce con mucillagine di *nopal*³. In genere l'aggiunta di derivati vegetali alle malte di calce, compreso il *nopal*, migliora la plasticità degli impasti oltre a trattenere l'umidità più a lungo, il che si traduce in un processo di presa più lento e una carbonatazione più uniforme. Secondo l'autrice, i monosaccaridi della mucillagine promuovono l'aumento della solubilità dell'idrossido di calcio, il quale permette la cristallizzazione omogenea e compatta del carbonato di calcio. Diana Magaloni e Tatiana Falcón hanno identificato anche la presenza di gomma vegetale di *nopal* come legante nella pittura murale di diverse tombe del sito archeologico di Monte Albán e Suchilquitongo, nell'attuale stato di Oaxaca⁴.

2 Diana Magaloni, Claudia Brittenham, Piero Baglioni, Rodorico Giorgi y Lorenza Bernini, "Cacaxtla, la elocuencia de los colores", en *La pintura mural prehispánica en México V. Oacaxtla*. Tomos 2 y 3, ed. María Teresa Uriarte Castañeda y Fernanda Salazar Gil, 147-197 (México: UNAM, Instituto de Investigaciones Estéticas, 2013), p. 153.

3 Magaloni, et. al., "Cacaxtla, la elocuencia de los colores", 150.

4 Diana Magaloni Kerpel, y Tatiana Falcón Álvarez,



Molto importante è la distinzione tra i due differenti prodotti utilizzati nelle opere: la gomma del fico d'India è un essudato naturale della pianta, prodotto in risposta a una lesione meccanica o patogena, la mucillagine è un prodotto del normale metabolismo delle cellule mucillaginose nel parenchima dei cladodi e di altre parti della pianta, che ha la funzione fisiologica di ritenzione idrica. La tradizione di aggiungere mucillagine di *nopal* ai colori a calce per dipingere le pareti negli edifici vernacolari potrebbe anche essere stata la fonte di ispirazione per il muralista del XX secolo, Diego Rivera. È documentato che Rivera sperimentò in alcuni dei suoi affreschi le mucillagini di *nopal*⁵, in particolare in quelli che dipinse al Ministero della Pubblica Istruzione e all'Università di Chapingo, entrambi del 1923⁶.

La pratica tradizionale dell'uso della mucillagine del fico d'India come additivo alle malte è stata ed è tuttora impiegata dai restauratori messicani per migliorare le proprietà della malta in termini di plasticità, di tempo di indurimento, duttilità e la resistenza⁷. Inoltre si utilizza come impermeabilizzante, come rafforzamento nella produzione di mattoni e come fissatore di coperture pittoriche di pittura murale, date le sue proprietà adesive e coesive.

Peperoncino (*Capsicum spp.*)⁸

Il genere *Capsicum* è originario del Sud America; chiamato "*Uchu*" dagli Incas, "*Pimiento de las Indias*" dagli spagnoli, e più tardi "*Aji*" dal popolo delle Indie Occidentali, un nome che oggi è diventato molto comune nelle Ande. Quando gli spagnoli sbarcarono sul suolo americano alla fine del XV secolo, era stato addomesticato da migliaia di anni.⁹ È documentato infatti che in Sud America il peperoncino era già conosciuto e usato nel 7500 a.C. L'archeobiologa Linda Perry è stata in grado di identificare resti di peperoncino in siti archeologici in America Latina attraverso test biologici; in tal modo elementi riconducibili al peperoncino sono state ritrovate su pietra di fresatura, cocci di ceramica e sedimenti presso due villaggi preistorici nel sud-ovest dell'Ecuador, occupati 6100 anni fa.

La pianta e il frutto del peperoncino sono fin dall'antichità legati a varie divinità, credenze, rituali e sistemi economici in Mesoamerica, in particolare sono fortemente interconnessi all'identità messicana. Diversi cronisti ne hanno descritto l'uso come alimento e anche come medicinale, per le sue proprietà antinfiammatorie. I Maya lo usavano per curare i problemi dei denti. Secondo lo storico L.E Valcarcel, i peperoncini erano così apprezzati dalla società Inca che furono probabilmente usati anche come moneta.

In occidente il peperoncino fu inizialmente utilizzato solo a scopo ornamentale, ma ben presto ne venne riconosciuto il valore alimentare. Si ipotizza che i monaci del monastero reale di Santa Maria de Guadalupe, in Estremadura, Spagna, fu-

"Pintando otro mundo: técnicas de pintura mural en las tumbas zapotecas", en *La pintura mural prehispánica en México III. Oaxaca*, Tomos 3 y 4, ed. Beatriz de la Fuente, 177-225 (México: UNAM-IIE, 2008).

- 5 Andrea Kettenmann, Diego Rivera, 1887-1957: *A Revolutionary Spirit in Modern Art* (Köln: Taschen, 2003), 26.
- 6 Frances Flynn Paine, Diego Rivera (New York: Museum of Modern Art, 1931), 29-31.
- 7 Sandra Cruz Flores, "El mucílago de *nopal* como aditivo de las pastas de cal empleadas en conservación", en *La cal: historia, propiedades y usos*, eds. Luis Barba Pingarrón e Isabel Villaseñor Alonso, 83-202 (México: UNAM, Instituto de Investigaciones Antropológicas, 2013).

- 8 La bibliografia sul peperoncino è molto ampia. Per un approccio generale Araceli Aguilar-Meléndez, Marco Antonio Vázquez Dávila, Esther Katz y María Reyna Hernández Colorado (eds.), *Los chiles que le dan sabor al mundo* (Marseille: IRD Éditions, Universidad Veracruzana, 2018); Janet Long Towell, "Los senderos prehispánicos del capsicum", en *Caminos y mercados de México*, Janet Long Towell y Amalia Attolini Lecón (coord), 79-106 (México: IIH-UNAM / INAH, 2009).
- 9 Emily McClung de Tapia, et. al., "Los orígenes prehispánicos de una tradición alimentaria en la cuenca de México", *Anales de Antropología* 48 (2014): 97-121.



rono i primi europei a scoprire il sapore piccante dei peperoncini e ad aggiungerli alla loro cucina. Fu nel 1600 che, attraverso rotte commerciali provenienti dal Sud America, esploratori commercianti portoghesi e spagnoli introdussero il peperoncino anche in Africa, India e Asia diventando il "pepe dei poveri" perché era una pianta facilmente coltivabile ad ogni latitudine e clima, e i suoi frutti essiccati potevano sostituire egregiamente il pepe nero, che era riservato solo alle persone più agiate. Oggi il *Capsicum* è presente in molte aree ed è largamente utilizzato nelle cucine tradizionali (il Messico è il paese che ha il consumo pro-capite più elevato).

La caratteristica principale del peperoncino è che i suoi frutti producono metaboliti secondari come i capsaicinoidi, il cui principale componente è la capsaicina, la causa del sapore piccante anche nota per l'azione antimicrobica e deterrente nei confronti di potenziali predatori/patogeni¹⁰. In virtù di queste caratteristiche, la capsaicina potrebbe trovare un utilizzo anche nel restauro, per trattare gli agenti biologici presenti nei beni culturali, i quali sono la causa di vari tipi di alterazioni sulla struttura e composizione dei materiali originali. Tuttavia, l'applicazione di questo alcaloide nel campo del restauro necessita ancora di ulteriori sperimentazioni che attestino la sua efficacia contro diversi bio-deterioramenti della pietra¹¹ e altri materiali (ancora non studiati). La capsaicina risulta efficace contro alghe, cianobatteri, diatomee e protozoi presenti nelle pietre, come riportato da alcuni autori¹², ma non è stata ancora dimostrata nessuna attività antifungina in deteriogeni isolati

da affreschi presenti in diverse chiese¹³.

Cenni sull'importanza economica delle due specie

L'interesse per le diverse applicazioni di *Opuntia ficus-indica* e di *Capsicum* risiede quindi nel fatto che sono colture 'multifunzionali': la loro straordinaria ricchezza in metaboliti attivi rende possibile lo sviluppo di nuovi bio-prodotti (Bacchetta *et al.*, 2019) e l'avvio di nuove filiere produttive. L'utilizzazione sostenibile di risorse naturali rinnovabili e la loro trasformazione in beni e servizi finali o intermedi è il fulcro del concetto di bioeconomia che nell'ambito dell'economia circolare può rappresentare una risposta a gran parte delle sfide sociali che dovremmo affrontare nei prossimi anni (Bacchetta, 2019).

Un'altra riflessione nasce inoltre dal fatto che i cladodi di fico d'India, mentre rappresentano una risorsa alimentare in Messico e in altri Paesi, in Italia rappresentano uno scarto di potatura con costi di smaltimento per gli agricoltori (Bacchetta e Balducchi, 2019). In impianti specializzati la potatura produttiva (scozzolatura) porta alla produzione di diverse tonnellate di pale (con un minimo di 6 t/ha) che, alla luce di quanto discusso, possono essere il punto di partenza di nuovi cicli produttivi e redditi aggiuntivi per i produttori. In Sicilia si dice da sempre che il fico d'India è "come il maiale, non si butta niente, che è un tesoro sotto le spine". Inoltre come la chía, il fico d'India ha una valenza ecologica (è in grado di contenere l'erosione del suolo), tradizionalmente è una specie usata come recinzione naturale e come frangi fuoco. I suoi frutti, ma anche le pale (in Messico), sono utilizzati per l'alimentazione umana e in molti paesi del Mediterraneo i cladodi (ossia le pale, fusti trasformati) sono impiegati come foraggio. In anni recenti il fico d'India è ricercato per il valore nutraceutico ma anche per la capacità della

10 Tewksbury JJ, Reagan KM, Machnicki NJ, Carlo TA, Haak DC, Penaloza ALC, Levey DJ (2008) Evolutionary ecology of pungency in wild chilies. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:11808–11811

11 Fidanza, M.R., Caneva, G. (2019). Natural biocides for the conservation of stone cultural heritage: a review. *Journal of Cultural Heritage*, 38:271-286. <https://doi.org/10.1016/j.culher.2019.01.005>

12 Cuzman, O.A., Camaiti, M., Sacchi, B., Tiano, P. (2011). Natural antibiofouling agents as new control method for phototrophic biofilms dwelling on monumental stone surfaces. *International Journal of Conservation Science*, 2 (1):3-16.

13 Maxim, D., Bucs, L., Moza, M.I., Chachula, O. (2012). Preliminary antifungal investigation of ten biocides against moulds from two different church frescoes. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 17(2):139-146.





Fig. 2.1 - Monolite che rappresenta il simbolo della fondazione di Tenochtitlan, capitale dell'impero azteco fondato nel 1325 sulle cui macerie è nata Città del Messico

sua mucillagine di formare complessi in grado di sequestrare metalli pesanti in acque inquinate.

Originaria del Messico (Fig. 2.1), leader della produzione mondiale, questa cactacea ha un areale molto diffuso, ma a livello europeo la filiera produttiva del fico d'India è quasi esclusiva della Sicilia, che copre oltre il 90% della produzione¹⁴.

Il forte legame con il territorio siciliano è espresso dalle produzioni di origine controllata: il "Fico d'India dell'Etna", DOP dal 2003 e il "Fico d'India di San Cono", DOP dal 2012. In itinere anche il DOP del "Fico d'India di Santa Margherita del Be-

14 Inglese, Paolo, "Orchard planting management", In *Agro-ecology cultivation and uses of cactus pear*, eds. Giuseppe Barbera, Paolo Inglese y Eulogio Pimienta, pp. 78-91. (Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1995). Plant Production and Protection Paper No. 132. Rome, FAO.



Fig. 2.2 - Impianti produttivi in Sicilia

lice". Nonostante sia praticamente presente in forma spontanea nel centro sud, soprattutto in Puglia (300 ettari), Calabria (50 ettari) e Campania, in Sicilia è concentrata la maggior parte della coltura specializzata (la superficie totale è di circa 4.000 ettari) (Fig. 2.2).

Il genere *Capsicum* fa parte della famiglia delle *Solanaceae* ed è originario dell'America subtropicale e tropicale. La sua coltivazione negli ultimi anni ha mostrato un trend positivo incrementando da 2 a 4,5 milioni di tonnellate di prodotto secco e da 17 a 36 milioni di tonnellate per il prodotto fresco negli ultimi 10 anni¹⁵. Anche le superfici sono aumentate del 35% in 20 anni. Il produttore principale è la Cina seguito dal Messico, ma risulta coltivato in più di 70 paesi nel mondo.

Il Messico coltiva numerose varietà come: chile de arbol, jalapeño, habanero, serrano, poblano, solo per citarne alcuni (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2016). Secondo le statistiche del *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP)*¹⁶, nel paese sono coltivati circa 151.600 ettari, con una produzione stimata di 3 milioni 188 mila tonnellate.

15 1997-2017, www.fao.org/faostat

16 <https://www.gob.mx/siap>



late. Le principali aree di produzione in ordine di importanza sono: Sinaloa, Chihuahua, Zacatecas, San Luis Potosí e Sonora. Più di 50.000 produttori partecipano in Messico alla coltivazione e alla raccolta del peperoncino, che rappresenta una fonte di occupazione e benessere per migliaia di famiglie che vivono nelle zone rurali. Il peperone habanero detiene da un decennio la Denominazione di Origine nella penisola dello Yucatan, offrendo vantaggi competitivi ai produttori della regione (Nancy Ruiz-Lau *et al.*, 2016).



Fig. 2.3 - *Capsicum annuum* varietà cv. Padrón

In Italia la produzione del peperoncino interessa soprattutto la Calabria (100 ettari, con il 25% del totale), Basilicata, Campania, Lazio e Abruzzo che nell'insieme soddisfano solo il 30% del fabbisogno nazionale. Il resto è importato da Cina, Egitto, Turchia. Anche in Italia sono coltivate numerose varietà che si distinguono per la piccantezza, forma dei fiori e frutti, colore e caratteristiche qualitative. Una specie conosciuta dal punto di vista commerciale è il *Capsicum annuum*, nota perché comprende accessioni, piccanti e non, caratterizzate da un'ampia variabilità di forme e colorazioni dei frutti (Fig. 2.3).

Bibliografia

L. Bacchetta, S. Procacci, G. Platamone, O. Maccioni, 2019. Il fico d'India una coltura multifunzionale. *Kiwi informa*, anno 15 n 10-12, pp. 42-45.

L. Bacchetta, 2019. "Il fico d'India: un esempio di economia circolare", pubblicato su "AgriCulture" <https://www.fidaf.it/index.php/presentazione-di-agriculture/>

Bacchetta L., R. Balducchi, 2019. Il fico d'India dagli scarti alla bioeconomia. *Informatore Agrario*, 38 V 36 pp.. 38-41.

E. Bojórquez-Quintal, N. Ruiz-Lau, A. Velarde-Buendía, I. Echevarría-Machado, I. Pottosin and M. Martínez-Estévez, 2016. *Natural variation in primary root growth and K⁺ retention in roots of habanero pepper (Capsicum chinense) under salt stress. Functional Plant Biology*, 43, 1114–1125 <http://dx.doi.org/10.1071/FP15391>

N. Ruiz-Lau, E. Bojórquez-Quintal, B. Begoña, I. Echevarría-Machado, L. A. Sánchez-Cach, María de Fátima Medina-Lara and M. Martínez-Estévez, 2016. *Molecular Cloning and Functional Analysis of a Na⁺-Insensitive K⁺ Transporter of Capsicum chinense Jacq. Frontiers in plant Science*. Volume 7, pp.1-14



3. Estrazione e caratterizzazione di mucillagine da cladodi di *Opuntia ficus-indica* e di capsaicinoidi da frutti di *Capsicum spp.*

di Loretta Bacchetta, Silvia Procacci, Vittorio Martina, Serena Gagliardi, Emanuel Bojorquez-Quintal, Oliviero Macconi, Mauro Falconieri, Margherita Moreno, Fabio Zaza, Giovanbattista Platamone, Chiara Alisi

Le mucillagini, sostanze idrocolloidi, sono complessi polimeri costituiti da carboidrati, con una struttura molto ramificata (Matsushiro *et al.*, 2006; Bacchetta *et al.*, 2019), che contengono quantità variabili di L-arabinosio, D-galattosio, L-ramnosio e D-xilosio e acidi uronici, come ad esempio l'acido galatturonico e l'acido glucuronico, in diverse proporzioni (Sepùlveda *et al.*, 2007). Il termine

“mucillagine”, in particolare, indica sostanze che sono solubili, o meglio, che si rigonfiano sensibilmente a contatto con l'acqua e che dopo l'aggiunta di etanolo precipitano in una massa amorfa globulare. La presenza di molti idrossili favorisce in modo evidente l'entità del legame

con l'acqua, rendendo questi composti idrofili. A causa inoltre della tendenza delle grandi macromolecole di polisaccaridi a sovrapporsi e unirsi in reti intrecciate, la maggior parte degli idrocolloidi ha la capacità di funzionare come modificatori di viscosità e addensanti in mezzi acquosi a concentrazioni relativamente basse. In natura le mucillagini si possono trovare in diverse strutture vegetali ed assolvono ad una moltitudine di funzioni. Nei rizomi, nelle radici e nell'endosperma dei semi, ad esempio, possono fungere da riserve energetiche primarie; mentre, se localizzate in altri organi o tessuti vegetali, non svolgono più il ruolo di deposito di carboidrati ma assumono funzioni più complesse, come ad esempio tolleranza al gelo, trasporto e riserva idrica. Il mercato globale degli idrocolloidi, e quindi l'importanza economi-

ca in funzione dei numerosi campi applicativi, è stato calcolato intorno a 7.9 miliardi di dollari nel 2019, con un valore stimato nel 2022 di oltre 8.5 miliardi¹. L'*Opuntia ficus-indica* (OFI) è una specie succulenta coltivata in Italia principalmente per la produzione dei frutti; il Messico è il centro di origine della specie ed è il principale produttore mondiale, ma è possibile trovare il fico d'india in molti aerali grazie alle sue capacità produttive anche in condizioni aride. In Italia la coltura specializzata è localizzata soprattutto in Sicilia (90% della produzione nazionale) con tre varietà principali. La mucillagine nella pianta è accumulata soprattutto nelle pale o cladodi (fusti modificati), ma anche nei frutti, con la funzione di ritenzione idrica. In Fig. 3.1 è riportata la sezione trasversale di un cladodio di 2 anni: si distinguono il clorenchima esterno e il parenchima interno, costituito da un tessuto di cellule mucillaginoso.



Fig. 3.1 - Sezione trasversale di un cladodio, visualizzazione del clorenchima esterno e del parenchima interno

L'interesse per l'estrazione e l'utilizzo di questo bio-prodotto nasce dal fatto che i cladodi rappresentano uno scarto di potatura, che ad esempio in Sicilia, durante la 'scozzolatura' (potatura specializzata per la produzione dei frutti più tardivi), porta alla produzione di circa 6-10 tonnellate/ettaro di materiale che deve essere smaltito dall'agricoltore.

Nel Progetto Bilaterale Italia-Messico, l'attività di ricerca è stata ampliata a specie del genere *Cap-*

1 Market and Market (2018). Hydrocolloids Market by Type, Function, Source, Application, & by Region GlobalForecast to 2020, available on <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/hydrocolloid-market-1231.html>



sicum: l'interesse deriva non solo dall'importanza economica che queste specie hanno nei due paesi, ma anche dalle spiccate proprietà antimicrobiche che caratterizzano i principi attivi contenuti nei frutti e che possono rappresentare un valore aggiunto per gli obiettivi del progetto. *Capsicum spp.* è un genere economicamente importante nella famiglia delle solanacee e comprende almeno 32 specie originarie delle regioni tropicali dell'America. Per quanto riguarda forma, dimensione, colore e piccantezza del frutto, il genere *Capsicum* presenta una notevole varietà tra le specie e tra i genotipi all'interno della stessa specie.

La capsaicina (trans-8-metil-N-vanillyl-6-nonamide) e la diidrocapsaicina (8-metil N-vanillylnonanamide) sono i principali capsaicinoidi presenti nel peperoncino e contribuiscono per circa il 90% alla sua piccantezza. I capsaicinoidi vengono sintetizzati e si accumulano principalmente nel tessuto epidermico della placenta durante lo sviluppo del frutto, ma si trovano anche in altre parti del peperoncino, come il pericarpo e il seme.

Come è noto, molte piante possono produrre come strumento di difesa una vasta gamma di sostanze tossiche, al fine di inibire la crescita di

organismi patogeni. Proprio per questo motivo, la capsaicina sembrerebbe essere prodotta nei frutti di *Capsicum* per proteggere i semi nel momento della loro dispersione nel terreno: tale sostanza li preserverebbe infatti dall'attacco di alcuni funghi del genere *Fusarium* che, presenti nel suolo, sono responsabili del marciume di semi e radici (Veloso *et al.*, 2014).

Estrazione e caratterizzazione della mucillagine da cladodi di

Opuntia ficus-indica

• Estrazione in acqua

Il metodo di estrazione per macerazione, secondo la tradizione messicana, consiste nel mettere a macerare in acqua il parenchima di cladodi raccolti nelle ore antecedenti l'alba, ridotto in piccoli pezzi, per 24 ore e a temperatura ambiente in un rapporto matrice/acqua normalmente 1:1 (kg/L oppure g/ml). Il processo di macerazione si basa sul principio della diffusione passiva: quando i frammenti di matrice vegetale vengono immersi in acqua deionizzata, le cellule mucillaginose, trovandosi in una soluzione ipotonica, si rigonfiano assorbendo acqua fino a rompersi e riversano all'esterno il loro contenuto. Trascorso l'intervallo di tempo prestabilito, la matrice vegetale viene

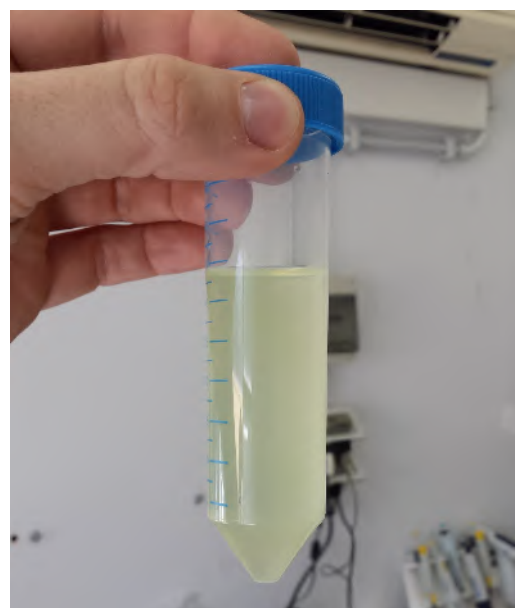


Fig. 3.2 - Esempio di estrazione per macerazione di mucillagine dai cladodi



separata dall'acqua mediante un filtro a maglie larghe, lasciandola percolare per il tempo necessario a raccogliere la mucillagine per analizzarla (Fig. 3.2).

► *Effetto del rapporto biomassa/acqua, pH, forza ionica e temperatura*

Con lo scopo di ottimizzare il processo, sono stati considerati e studiati i seguenti fattori: a) rapporto biomassa/acqua; b) tempo di macerazione; c) variazioni del pH della soluzione; d) concentrazione salina nella soluzione di estrazione (acqua di estrazione addizionata con NaCl o CaCl₂). Come indice di riferimento per la valutazione dell'efficienza estrattiva è stato considerato il contenuto in polisaccaridi solubili determinato con metodo di DuBois *et al.* (1956), modificato secondo Bacchetta *et al.* (2019). Il risultato è stato espresso in g equivalenti di glucosio o di xilosio per ml di mucillagine utilizzando rette di taratura derivate dalle assorbanze a 490 nm di concentrazioni note dei due standard.

Per studiare il rapporto ottimale per l'estrazione della mucillagine, sono stati adottati cinque rapporti crescenti di biomassa e acqua. Brevemente, una quantità pari a 200 g di parenchima fresco, è stata messa a macerare in acqua distillata per 24 ore al buio, alla temperatura di circa 25 °C, nei seguenti volumi di acqua: 200 ml per il rapporto 1:1, 600 ml per l'1:3, 1000 ml per l'1:5, 1400 ml per l'1:7 e 1800 ml per l'1:9. Ogni soluzione ottenuta è stata sottoposta alla quantificazione dei carboidrati; il prelievo è stato eseguito tenendo la mucillagine in agitazione per rendere i campioni il più possibile omogenei. I risultati ottenuti hanno evidenziato correlazioni significative tra le diverse diluizioni e la percentuale di resa in mucillagine. La resa di estrazione, molto bassa nel rapporto 1:1 (0.7%) a causa della rapida saturazione del solvente, è aumentata progressivamente con l'incremento percentuale massimo nel rapporto 1:9 che è pressoché quadruplicato (3.8%). L'incremento in percentuale della resa tra le diverse diluizioni, considerando la diluizione 1:1 come termine di paragone, indicato con la linea dello zero, è riportato nella Fig. 3.3. Si nota che la resa

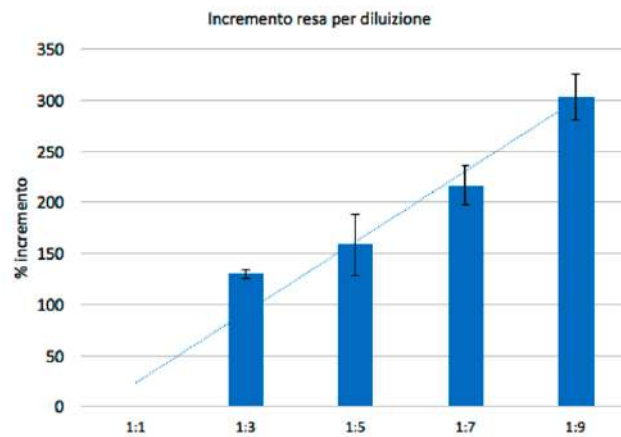


Fig. 3.3 - Incremento della resa in polisaccaridi in funzione del fattore diluizione. I valori riportati rappresentano la media \pm DS

migliora di circa il 130% nella diluizione 1:3 con effetti crescenti nelle diluizioni successive, fino a raggiungere un incremento del 303.5% nel campione con rapporto 1:9.

Il tempo di macerazione è stato testato considerando 3 intervalli distanti 24 ore uno dall'altro nei tre rapporti biomassa/acqua maggiori (1:5, 1:7 e 1:9). Allo scadere delle 24, 48 e 72 ore sono stati prelevati 10 ml in triplicato da ogni diluizione e avviati alla procedura di quantificazione. La Fig. 3.4 rappresenta l'incremento della resa rispetto al tempo di estrazione e mostra quanto l'adozione di tempi superiori possa influenzare positivamente la resa nei medesimi campioni. Il controllo a 24 ore di ogni diluizione è riportato sulla linea dello zero. Con un rapporto biomassa/

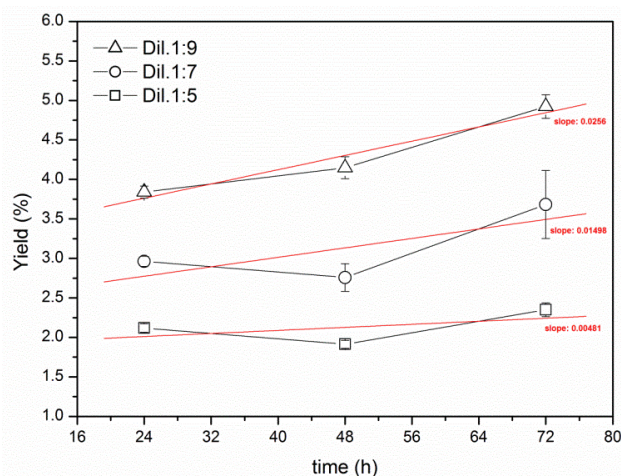


Fig. 3.4 - Incremento della resa in polisaccaridi in funzione del tempo di macerazione. I valori riportati rappresentano la media \pm DS



acqua di 1:9 si osserva dopo 72 ore un aumento di resa del 27% circa rispetto all'identica condizione delle 24 ore, mentre nella diluizione 1:5 l'incremento è del 20% circa.

Non è stato rilevato alcun effetto plateau, mostrando ulteriore potenziale di estrazione della mucillagine. Questi risultati concordano con Sepúlveda *et al.* (2007) che hanno riportato come la migliore resa di mucillagine sia stata ottenuta con rapporto parenchima/acqua 1:7 (a 40 °C). Nelle nostre prove sperimentali le diluizioni con rapporti maggiori, a parità di tempo, hanno mostrato risultati fino a 3 volte superiori rispetto la soluzione 1:1. Questi risultati indicano che la macerazione 1:1 non porta ad una resa ottimale dalla matrice fresca; infatti, sottoponendo nuovamente a macerazione una biomassa che già ha subito un processo di 24 ore si ottiene ulteriore mucillagine. Il rapporto 1:1 non è soddisfacente in resa perché, probabilmente, crea un effetto di saturazione della mucillagine in soluzione e ne impedisce ulteriori fuoriuscite. Si può ipotizzare che l'acqua di macerazione fornisca lo "spazio" entro il quale la mucillagine si concentra, trasferendosi dalle cellule mucillaginose alla soluzione. Ciò implica che utilizzando una maggiore quantità di liquido, si fornisce uno "spazio chimico" più ampio per ottenere rese superiori. La macerazione 1:1 anche se non ottimale in termini di resa di estrazione, come vedremo di seguito, consente di ottenere buoni risultati applicativi quando utilizzata nella preparazione di malte.

È noto che anche il pH può esercitare un effetto sul rilascio di metaboliti in soluzione. Dal momento che la mucillagine ha capacità tampone (Corrales-García *et al.*, 2004), l'intervallo di pH da 2 a 12 è stato studiato con e senza buffer². Nelle soluzioni contenenti tamponi sono stati usati i soluti riportati nella tabella di Mc Ilvaine (Sigma-Aldrich)³.

2 Le condizioni desiderate in assenza di tampone sono state raggiunte disciogliendo 2.5 ml e 7.9 µl di HCl 1M in 250 ml rispettivamente per i valori di pH 2 e 4.5, mentre per le soluzioni a pH 9.5 e 12 sono stati sciolti 7.9 µl e 2.5 ml di NaOH 1M nel volume finale.

3 Quantità di soluti nei diversi campioni con pH tamponati:

Gli esperimenti sono stati condotti macerando 50 g di matrice fresca in 250 ml di acqua deionizzata (rapporto di diluizione 1:5) a differenti pH. Le prove sperimentali sono state in totale 10, adottando 5 soluzioni a pH noto (2.0, 4.5, 7.0, 9.5 e 12.0) e 5 soluzioni contenenti tampone agli stessi valori di pH. Il controllo di tutti i trattamenti è stato il campione a pH 7 non tamponato, contenente H₂O distillata.

Come mostrato in Fig. 3.5, il pH ha mostrato un effetto positivo sull'estrazione della mucillagine con valori statisticamente significativi. La condizione di estrazione ottimale è stata trovata a pH 12 con tampone (5.2%), seguito dal trattamento a pH 2 senza tampone (4.3%). In assenza di tampone, la percentuale di mucillagine estratta mostrava una tendenza della campana invertita, a causa della capacità di tamponamento della mucillagine, ricca di molecole organiche tipiche delle piante CAM (*Crassulacean Acid Metabolism*) come gli acidi organici, in grado di agire come tampone nell'intervallo di pH fisiologico (Corrales-García *et al.*, 2004)

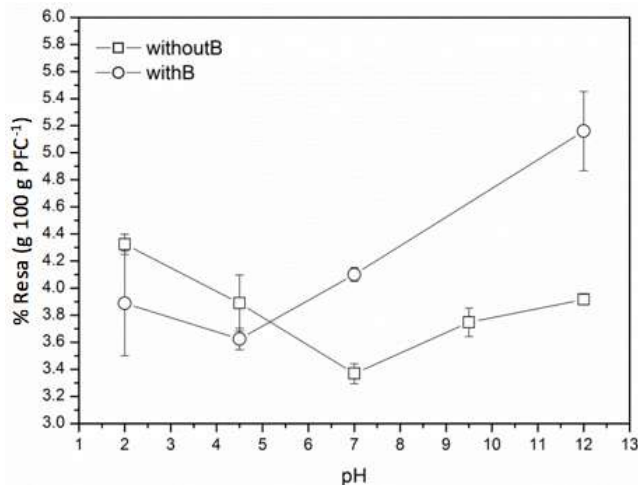


Fig. 3.5 - Effetto del pH senza o con tampone sulla resa di mucillagine. I quadrati e i cerchi rappresentano l'effetto del pH senza buffer ($F = 8.91$; $P = 3.1E-05$) o con buffer ($F = 12.74$; $P = 1.9E-06$) rispettivamente. I punti rappresentano la media della resa% al pH indicato, media \pm DS ($n = 9$)

pH 2: 0.441 ml HCl 12M + 3.34 g KCl; pH 4.5: 1.80 ml HOAc 17.43M + 1.517 g NaOAc; pH 7: 0.847 g Acido citrico + 5.85 g Na₂HPO₄; pH 9.5: 1.47 g NaHCO₃ + 0.795 g Na₂CO₃; pH 12: 8.745 ml NaOH 1M + 1.15 g Na₂HPO₄.



I nostri risultati hanno mostrato un'influenza positiva sull'estrazione (resa %) della mucillagine sia a pH acido che a pH alcalino, probabilmente perché condizioni di pH estreme contribuiscono a rompere la struttura delle cellule, permettendo loro di liberarne una grande quantità.

Trachtenberg e Mayer (1981) hanno dimostrato che le molecole di mucillagine sono chiaramente influenzate dal pH, con perdita di viscosità in condizioni acide. In condizioni alcaline la solubilità in acqua e la viscosità sono migliori consentendo una migliore resa di estrazione (Felkai-Haddache *et al.*, 2015).

La Fig. 3.6 riassume gli incrementi in percentuale delle rese, ottenute nelle diverse condizioni sperimentali di estrazione a differenti pH, considerando come riferimento la resa del campione di controllo a pH 7, riportato sulla linea dello zero. I valori riportati sono elaborati a partire dalle medie della Fig. 3.5.

Per i test con sali disciolti, volti a individuare gli effetti della concentrazione salina sulla resa in mucillagine, si è deciso di utilizzare NaCl e CaCl₂ in soluzioni separate alle concentrazioni di 0.1 mM, 1 mM, 10 mM e 100 mM ciascuno. Il controllo è stato preparato con una soluzione contenente 50 g di biomassa in 250 ml di acqua distillata. Dopo 24 ore di macerazione, per le sperimentazioni relative a pH e forza ionica, sono stati prelevati 10 ml in triplicato da ogni campione per la quantifi-

cazione dei carboidrati. I risultati sono stati moltiplicati per il fattore di diluizione in modo da poter calcolare la resa totale da 100 g di matrice vegetale.

Come riportato nella Fig. 3.7 è evidente l'effetto della forza ionica sull'estrazione della mucillagine (resa %). La presenza di NaCl o CaCl₂ migliora il recupero della mucillagine dai cladodi di *Opuntia ficus indica*; l'estrazione più efficiente è stata osservata alle concentrazioni 1 mM di NaCl o CaCl₂, con valori di resa compresi tra il 5.2% e il 4.6%, rispettivamente e un incremento del 35% e del 22% rispetto al controllo (Fig. 3.8). Tuttavia, all'aumentare della forza ionica, la resa della mucillagine diminuisce. Questo comportamento è più pronunciato quando si usano ioni bivalenti, che sono in grado di influenzare i parametri fisici della mucillagine come la viscosità. La mucillagine può pertanto essere considerata un polielettrolita che in soluzioni alcaline o in acqua possiede tutti o la maggior parte dei gruppi carbossilici in forma dissociata; ciò causa l'insorgenza di repulsioni elettrostatiche tra le varie cariche negative creando un effetto macromolecolare di maggiore viscosità. L'interazione di queste cariche con cationi provenienti da sali, o da acidi, muta questo equilibrio elettrostatico influenzando sia sulle proprietà meccaniche sia sul rapporto assiale delle macromolecole che la compongono. In sintesi la presenza di acidi crea una diminuzione della dimensione delle catene polimeriche che collasano.

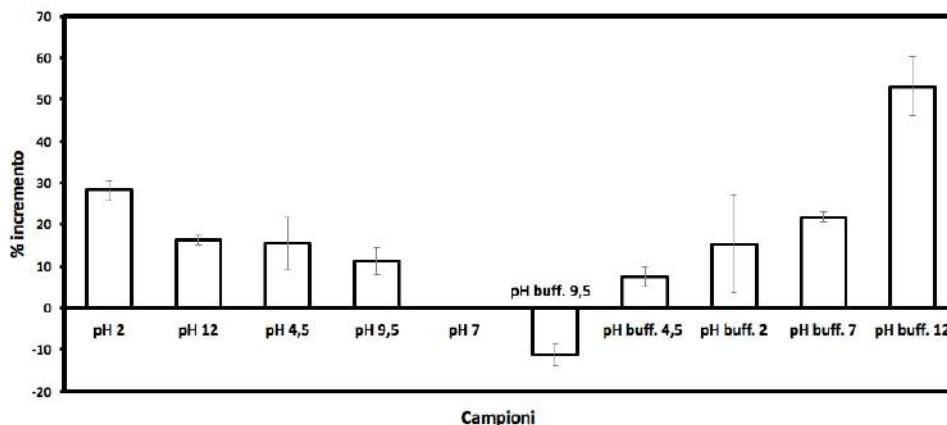


Fig. 3.6 - Incremento della resa in polisaccaridi in funzione del pH. I valori riportati rappresentano la media \pm DS (Martina, 2018)



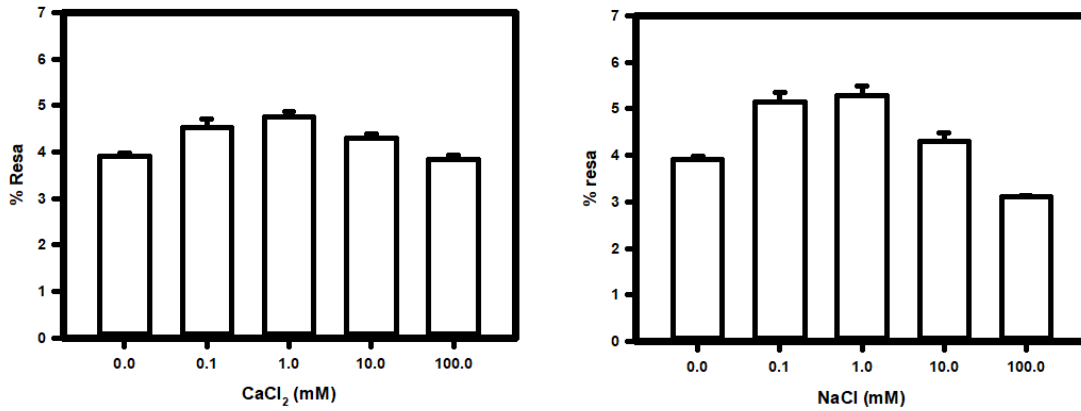


Fig. 3.7 - Effetto della forza ionica sulla resa della mucillagine (%) rapporto cladodio/acqua 1:5 usando diverse concentrazioni di NaCl ($F = 11.43$; $P = 2.8E-6$) o $CaCl_2$ ($F = 29.14$; $P = 2.2E-11$)

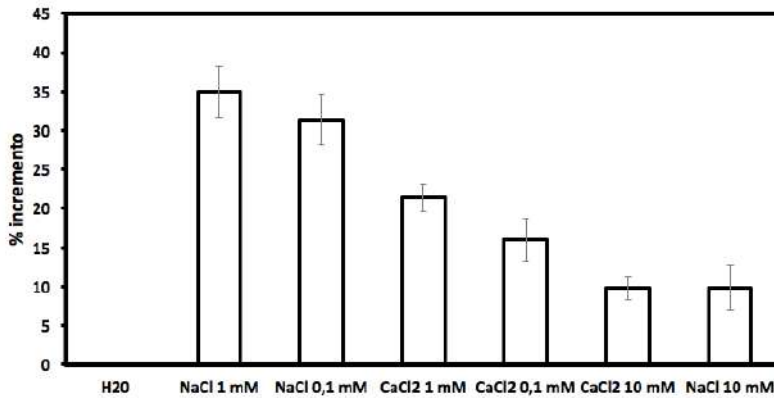
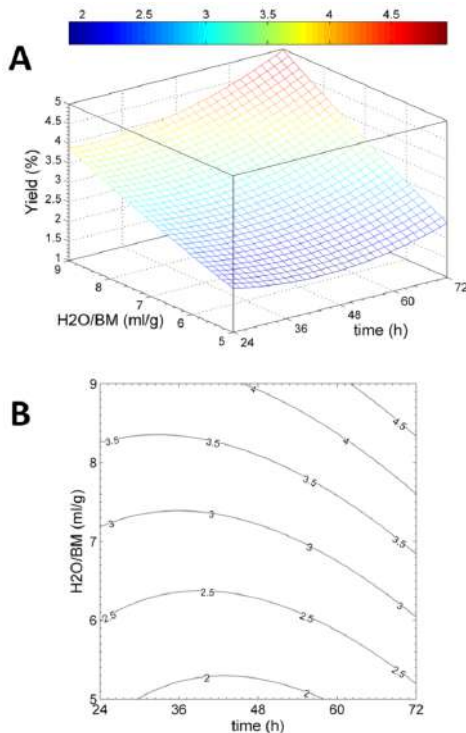


Fig. 3.8 Incremento della resa in polisaccaridi in funzione della concentrazione salina. Il campione di controllo è sulla linea dello zero (H_2O). I valori riportati rappresentano la media ($\pm DS$) (Martina, 2018)



► **Response Surface Methodology (RSM):**
analisi dei fattori critici di estrazione

L'analisi dei fattori critici è stata quindi effettuata con la Response Surface Methodology (RSM). Lo sviluppo di un modello multivariato (Plackett-Burman Design) ha permesso di prevedere il recupero della mucillagine sulla base del rapporto biomassa/acqua, del tempo di estrazione, del pH, della forza ionica, ossia di quelle variabili di processo che sono risultate critiche in seguito all'applicazione del Plackett-Burman Design. Le condizioni operative ottimali ottenute sono state così definite: rapporto biomassa/acqua 1:9, pH 12.0, forza ionica 1.0 mM di NaCl. In particolare, la Fig. 3.9 mostra la superficie di risposta tridimensionale (A) e il corrispondente diagramma di contorno (B) con l'andamento della resa (%) della mucillagine in funzione delle condizioni di diluizione e del tempo di estrazione.

Fig. 3.9 - Analisi di regressione multipla relativa che evidenzia la dipendenza della resa in mucillagine rispetto al fattore diluizione e tempo di estrazione A. diagramma 3D con superficie di resa, B. diagramma di contorno con livelli della linea di resa



Nelle curve di livello del diagramma di contorno, l'effetto del rapporto acqua/biomassa sull'estrazione di mucillagini risulta più comprensibile. Come previsto dal disegno sperimentale fattoriale, l'effetto della diluizione è più efficace del tempo di macerazione. I nostri risultati hanno mostrato che un rapporto acqua/biomassa più elevato promuove non solo l'efficacia del processo, migliorando il limite di soglia della mucillagine disciolta, ma anche la velocità del processo, mantenendo alti gradienti di concentrazione di mucillagine vicino all'interfaccia cladodio/acqua. Per questo motivo, il tempo necessario per l'estrazione diminuisce aumentando il rapporto acqua/biomassa.

► *Estrazione assistita*

Felkai-Haddache *et al.* (2015) e Bayar *et al.* (2017) hanno riportato un incremento nella resa in mucillagine da cladodi di *Opuntia* utilizzando una estrazione assistita con microonde o ultrasuoni. L'esperimento condotto nel Laboratorio Bioprodotti e bioprocessi, nel Centro ENEA Casaccia, è stato realizzato considerando un rapporto matrice/acqua 1:5 (in tre repliche). Un primo set di campioni è stato sottoposto a un bagno ad ultrasuoni a 40 kHz per 30 minuti ed un secondo set è stato trattato con microonde a 500 W per 5 minuti.

Nella Fig. 3.10 è riportato il confronto tra la resa in polisaccaridi al tempo zero, dopo 16 e 24 ore di estrazione nei due trattamenti e nel controllo non trattato.

Differenze significative sono state osservate tra i trattamenti e il tempo di estrazione: al tempo t_0 il microonde si è rivelato più efficiente degli ultrasuoni nell'estrazione della mucillagine, con un incremento della resa rispettivamente di +0.43% e +0.31% rispetto al controllo. Dopo 16 ore di estrazione, la resa è stata del 7.5% in peso nel materiale trattato con ultrasuoni e del 3.5% in peso utilizzando microonde. Sebbene la resa di idrocolloide da materiale trattato con microonde sia aumentata del +29% dopo 24 ore di macerazione, gli ultrasuoni sembra-

no essere più efficaci consentendo una migliore estrazione in tempi più brevi. Tuttavia, questi dati preliminari hanno dimostrato che entrambe sono tecnologie interessanti per migliorare l'efficienza di estrazione, migliorando il recupero della pectina strettamente legata alle pareti cellulari. Utilizzando *Arabidopsis* come modello vegetale per l'estrazione di mucillagine da semi, Zhao *et al.* (2017) hanno riportato come il trattamento a ultrasuoni sia un metodo efficace per rimuovere in brevissimo tempo (20 sec) la mucillagine idrofobica aderente alle pareti cellulari e resistente alla capacità estrattiva dell'acqua. Comunque è importante considerare che diverse caratteristiche come la frequenza, la lunghezza d'onda e l'ampiezza, oltre che la potenza assorbita possono influenzare in maniera significativa l'efficienza dell'estrazione (Pingret *et al.*, 2013) e quindi la resa. Nel nostro esperimento abbiamo inoltre osservato una perdita di viscosità della mucillagine estratta con microonde, come anche riportato da altri autori (Zheng *et al.*, 2011), imputabile probabilmente a un possibile degrado delle molecole di polisaccaridi.

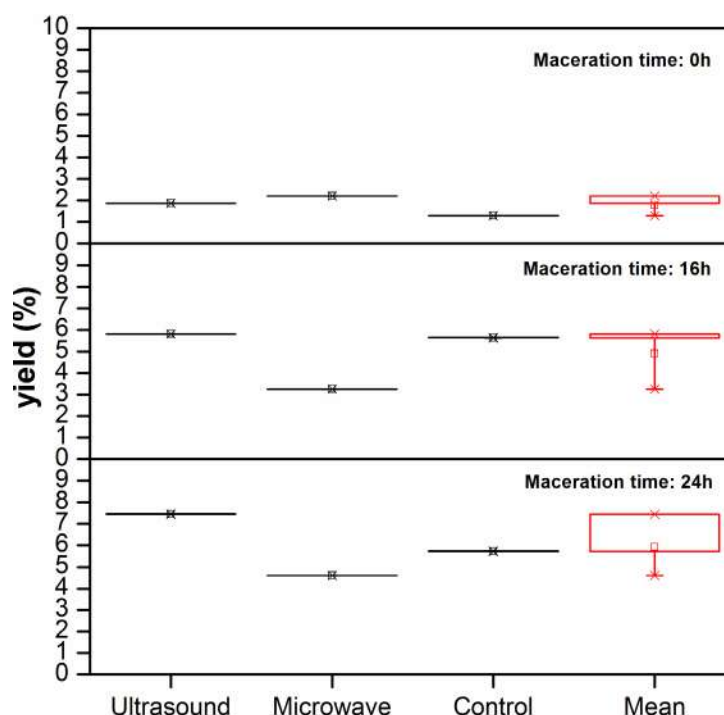


Fig. 3.10 - Confronto tra le rese in polisaccaridi (%) del materiale trattato con microonde e ultrasuoni rispetto all'estrazione convenzionale



► *Caratterizzazione chimica della mucillagine estratta in acqua*

Le mucillagini ottenute con i processi di estrazione descritti nei paragrafi precedenti sono state sottoposte ad analisi per studiarne le caratteristiche chimiche.

Nella Tabella 3.1 sono riportati i valori medi del contenuto in polisaccaridi, proteine e acidi uronici determinati come riportato da Bacchetta *et al.* (2019) in idrocolloidi ottenuti per macerazione a diversi rapporti biomassa/acqua (1:1, 1:3, 1:5) a pH 12 e pH 2 e con estrazione assistita (da trattamento con ultrasuoni e con microonde). In particolare, tra le componenti polisaccaridiche reattive, gli acidi uronici sono in grado di determinare alcune caratteristiche fisiche importanti della mucillagine, come la viscosità, la capacità di inglobare acqua nei tessuti, la chelazione di ioni Ca^{2+} .

I valori confermano l'effetto positivo del pH e dell'estrazione assistita nella resa in polisaccaridi evidenziando un contenuto variabile di proteine e acidi uronici.

Estrazione meccanica e composizione chimica della mucillagine

Nell'ottica della sostenibilità, il metodo tradizionale, sebbene migliorato, resta un processo impegnativo per un'applicazione industriale, in quanto richiede tempi lunghi e utilizzo di ingenti volumi di acqua. Il metodo chiamato "estrazione a freddo" consiste nella spremitura meccanica dei cladodi freschi di *Opuntia* a temperatura ambiente.

La scelta di questo metodo è dovuta principalmente alla sua semplicità e rapidità, ma anche alla caratteristica di continuità del flusso lavorativo, che è un requisito fondamentale per ogni applicazione industriale. A differenza delle 24 ore impiegate dal metodo di macerazione in acqua, in questo caso sono necessarie poche ore per completare l'estrazione.

Una prima prova è stata effettuata nel Laboratorio Bioprodotto e Bioprocessi (ENEA Casaccia) utilizzando un estrattore domestico (H. Koenig GSX12): la matrice vegetale (cladodi tagliati a cubetti) è stata introdotta nell'estrattore a intervalli regolari raccogliendo l'estratto in flusso continuo. L'estrazione avviene all'interno di un comparto dell'elettrodomestico mediante la rotazione di una coclea

Campione	Polisaccaridi (mg/L)	Proteine (mg/L)	Acidi uronici (mg/L)
1:1	9.51±0.3	0.026±0.01	0.42±0.06
1:3	7.48±0.1	0.081±0.01	0.15±0.01
1:5	6.73±0.02	0.006±0.01	0.06±0.01
pH 12 (1:1)	7.85±0.2	0.011±0.04	0.18±0.01
pH2	8.67±0.4	0.005±0.01	0.07±0.02
Ultrasuoni 1:1	11.62±0.1	0.002±0.02	0.01±0.01
Microonde 1:5	9.19±0.1	0.018±0.01	0.19±0.05

Tab. 3.1 - Contenuto in polisaccaridi, proteine e acidi uronici (valori medi ± dev. standard) in idrocolloidi ottenuti per macerazione a diverse condizioni di rapporto biomassa/acqua, pH e trattamento di estrazione assistita



che esercita una pressione sulla biomassa inserita. In questo modo la parte liquida della matrice viene indirizzata verso un'uscita e raccolta dopo pochi secondi dall'introduzione, mentre la parte fibrosa viene separata e recuperata in un contenitore differente.

Ottenuto il succo, questo è stato sottoposto ad una centrifugazione a 5000 rpm (centrifuga HERMLE Z 326 K) della durata di 2 h, per concentrare nel pellet i residui vegetali rimasti in soluzione, costituendo con il surnatante il campione finale da analizzare (Fig. 3.11).

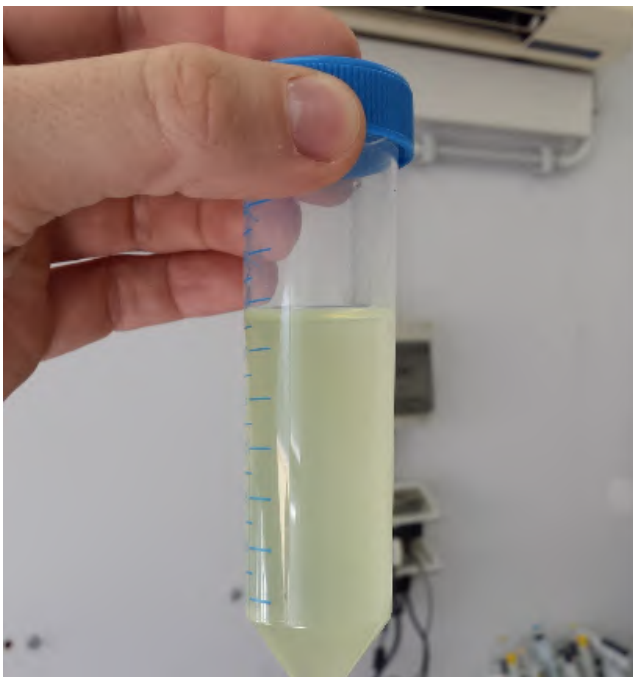


Fig. 3.11 Campione ottenuto con estrazione a freddo

Per quanto riguarda il processo di estrazione meccanica, da 100 g di cladodio è stato ottenuto un volume di mucillagine pari a circa 86.5 ml, considerando che parti vegetali sono rimaste aderenti alle pareti interne dell'estrattore. Il successivo passaggio in centrifuga della mucillagine estratta, ha prodotto un residuo di circa 14.6 ml (pellet) ed un campione finale del volume di 71.8 ml (surnatante). La resa è di circa il 2.7% di equivalenti in mucillagine liofilizzata, che se confrontata con la resa ottenuta da estrazione per macerazione 1:5 (1.30%) equivale a circa il doppio. Utilizzando estrattori più potenti e professionali adatti ad elaborare fluidi viscosi, è ipotizzabile che si possano

raggiungere sia miglioramenti nella resa, con una maggiore efficienza rispetto alla matrice iniziale, che semplificazioni in fase di lavorazione.

Nella Fig. 3.12 sono riportati i contenuti in polisaccaridi comparando i bio-prodotti ottenuti da estrazione meccanica e da macerazione nei rapporti 1:1; 1:3; 1:5. L'analisi statistica (test Duncan's separazione delle medie) conferma una differenza significativa nei trattamenti messi a confronto evidenziando la maggior resa ottenuta mediante estrazione a freddo. Il processo meccanico consente quindi di migliorare la resa di prodotto di circa il 170%, mentre la diluizione 1:5 di circa il 70%.

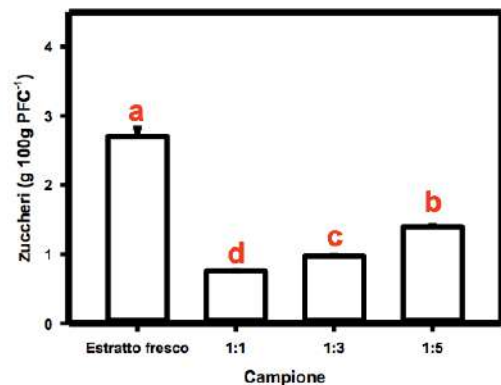


Fig. 3.12 Contenuto in polisaccaridi in mucillagine estratta da processo meccanico e da macerazione (rapporto biomassa/acqua 1:1; 1:3; 1:5). Per le singole tesi, le stesse lettere sono associate a valori statisticamente equivalenti con un livello di significatività $p=0.01$ (Martina, 2018)

Nelle Figg. 3.13 e 3.14 sono riportati i valori del contenuto in acidi uronici e proteine degli estratti. Differenze significative sono evidenti per entrambi i parametri considerati, comparando il colloide estratto a freddo e quelli ottenuti con diversi rapporti biomassa/acqua (1:1, 1:2, 1:3). L'estratto ottenuto con il procedimento meccanico risulta caratterizzato da un più alto contenuto proteico e soprattutto di acidi uronici che, come è noto da letteratura, hanno un ruolo nella viscosità, nel meccanismo di conservazione dell'acqua nei tessuti e di chelazione degli ioni Ca^{2+} . La quantità di acidi uronici nei polimeri naturali è considerata una misura della loro natura polielettrolita e sono un fattore determinante nei processi di coagulazione/flocculazione del gel.



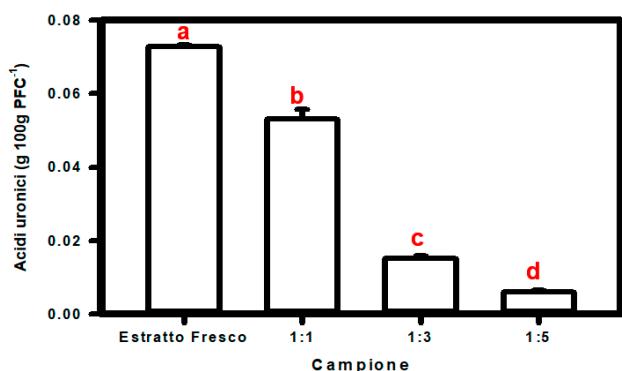


Fig. 3.13 Contenuto di acidi uronici in mucillagine estratta da processo meccanico e da macerazione (rapporto biomassa/acqua 1:1; 1:3; 1:5). Sono rappresentati i valori medi di tre repliche; le barre indicano \pm D.S. Livello di significatività $p \leq 0,001$. A lettere simili non corrispondono differenze significative (Duncan's Test)

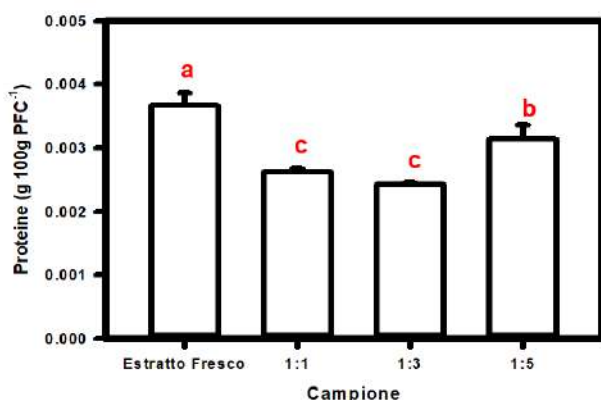


Fig. 3.14 Contenuto di proteine in mucillagine estratta da processo meccanico e da macerazione (rapporto biomassa/acqua 1:1; 1:3; 1:5). Sono rappresentati i valori medi di tre repliche; le barre indicano \pm D.S. Livello di significatività $p \leq 0,001$. A lettere simili non corrispondono differenze significative (Duncan's Test)

Un aspetto non positivo dell'estrazione meccanica è la presenza di clorofilla che conferisce una colorazione verde più o meno intensa all'estratto e può alterare le applicazioni, ad esempio come additivo nel restauro. Al riguardo, sono stati quindi condotti alcuni test per definire una possibile procedura di rimozione della clorofilla (Fig. 3.15).

Il trattamento con i carboni attivi (a 0.5 o 1%) seguito da un passaggio in centrifuga a 5000 rpm per 15 minuti ha indotto una leggera perdita della viscosità; una concentrazione non superiore a 0.2% di carbone attivo nel gel ha dato risultati migliori anche in termini di torbidità.

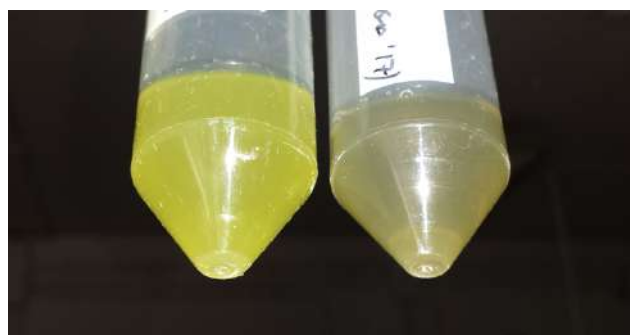


Fig. 3.15 Rimozione della clorofilla con carboni attivi da un campione estratto con il processo meccanico. Prima del trattamento (sinistra) e dopo (destra)

Tenendo conto di questi aspetti, al fine di ottenere un prodotto con migliore colorazione, resa e qualità (ad esempio in termini di antiossidanti estratti, presenti soprattutto nel clorenchima) nel Laboratorio Bioprodotti e bioprocessi è stato sperimentato l'uso di una pressa meccanica (torchio da banco Palumbo in alluminio, H 16.5 cm diametro 22.5 cm) manuale, applicata su cladi spezzettati senza rimozione del parenchima (Fig. 3.16).



Fig. 3.16 Mucillagine ottenuta da estrazione con pressa

Il prodotto ottenuto ha una resa di circa il 27-30%, con una variabilità legata alla stagionalità e alle differenti condizioni pedoclimatiche dei periodi di raccolta del materiale sperimentale. L'estratto presenta una quantità minore di clorofilla, ha un pH medio di 4.5 ± 0.3 e una densità media di 1.0133 ± 0.01 ; i solidi totali calcolati su 100 ml sono risultati 1.71% (gradi Brix di 1.83). La composizione minerale della mucillagine è stata valutata dai nostri partner del Progetto nel Laboratorio



de Análisis y Diagnóstico del Patrimonio (Ladipa) (El Colegio de Michoacán A.C., la Piedad, Mexico) utilizzando la microscopia elettronica a scansione con microsonda. I macroelementi con un contenuto relativo più elevato sono potassio ($28.06\% \pm 0.52$), calcio ($3.03\% \pm 0.06$) e magnesio ($2.04\% \pm 0.11$). Nella tabella 3.2 è riportato il contenuto in polisaccaridi, acidi uronici, proteine inclusa l'attività antiossidante e polifenoli di cui non si hanno molti dati disponibili in letteratura⁴.

Il contenuto in polisaccaridi totali è risultato 33.9%, che è un valore inferiore a quanto riportato in letteratura (circa il 60%). Nella nostra esperienza ciò potrebbe essere imputabile a due fattori principali: 1) una non efficiente fase di idrolisi; 2) una liofilizzazione del prodotto che nonostante il peso stabile non consente una totale rimozione delle particelle di acqua trattenute dall'idrocolloide. Misure successive su idrocolloidi ottenuti meccanicamente, utilizzando protocolli diversi

(Monrroy *et al.*, 2017) hanno portato a valori superiori (53%). Gli acidi uronici determinati spettrofotometricamente sono 1.15 ± 0.04 mg/g peso secco, che risultano inferiori a quelli determinati da altri autori (Majdoub *et al.*, 2001) ma superiori a quelli ottenuti in mucillagini estratte con acqua (Bacchetta *et al.*, 2019).

La quantità di proteine è un altro fattore che influenza le caratteristiche della mucillagine; le interazioni che intercorrono tra proteine e gruppi funzionali idrofili dei polisaccaridi condizionano le capacità di gelificare, le proprietà emulsionanti e stabilizzanti. Diversi autori hanno riportato un contenuto proteico, in 100 g di peso secco di cladodi, di circa 4-10 g equivalente a 0.5-1 g su 100 g di peso fresco. In letteratura invece non sono presenti molti dati sul contenuto in proteine delle mucillagini. Majdoub *et al.* (2001) hanno identificato due componenti principali nella frazione di mucillagine separata mediante ultrafiltrazione:

Composizione chimica della mucillagine	
Contenuto totale di polisaccaridi (mg eq xilosio g⁻¹ peso secco ± ES)	33.9 ± 2.49
Contenuto totale di acidi uronici (mg acidi uronici g⁻¹ peso secco ± ES)	1.15 ± 0.04
Contenuto totale di proteine (mg eq ABS g⁻¹ peso secco ± ES)	37.93 ± 0.02
Attività antiossidante (µmoli TE g⁻¹ peso secco ± DS)	6.8 ± 0.5
Polifenoli totali (mg GAE g⁻¹ peso secco ± DS)	14.2 ± 0.03

4 Il contenuto totale di polifenoli è stato determinato secondo il metodo colorimetrico di Folin-Ciocalteu con piccole modifiche, i risultati sono stati espressi in mg eq di acido gallico per interpolazione di detta retta Abs750 vs acido gallico mg/ml. L'attività antiossidante dei polifenoli è data determinata rispetto al radicale DPPH, la retta di taratura Abs vs % inibizione è stata preparata utilizzando, come agente riducente di riferimento, il Trolox, un analogo idrosolubile sintetico della vitamina E. La percentuale di inibizione, ricavata per interpolazione, è espressa dalla relazione $1-(Ac/A0) \times 100$ dove Ac è l'assorbanza del campione e A0 quella del bianco.

Tab. 3.2 - Contenuto in polisaccaridi, acidi uronici, proteine attività antiossidante e polifenoli nella mucillagine di Opuntia



una ad elevato peso molecolare (P.M. 1.3×10^6 g mol^{-1} , il 10% del totale) identificata come la componente saccaridica e un'altra a basso peso molecolare (3.9×10^3 g mol^{-1}) identificata come la frazione proteica che interagisce con i polisaccaridi formando ponti intermolecolari. Il valore medio ottenuto nel prodotto analizzato è stato di 37.93 ± 27.4 mg/g peso secco.

Il contenuto di polifenoli e l'attività antiossidante hanno una importanza rilevante in quanto positivamente correlati alla bassa biorecettività del materiale quando sottoposto a inoculazione con microrganismi (vedi capitolo 6). Come già accennato, in letteratura sono disponibili pochi dati sulla componente fenolica e sul potere antiossidante della mucillagine di *Opuntia ficus-indica*. Le analisi effettuate nei nostri laboratori mostrano un contenuto medio di polifenoli totali di 14.2 ± 0.03 mg GAE g^{-1} peso secco con una capacità antiossidante di 6.8 ± 0.5 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ peso secco. Differenze con i dati di letteratura sono imputabili oltre che a metodi diversi di estrazione anche alle condizioni pedoclimatiche in cui si trova il materiale raccolto. In ogni caso il potere antiossidante della mucillagine di *Opuntia* è nettamente superiore se confrontato con quello degli estratti di mela, banana, ananas (Balasundram *et al.*, 2006).

È stata inoltre eseguita un'indagine qualitativa con HPLC⁵ relativamente ai seguenti composti polifenolici: acido p-cumarico, quercetina, rutina, iperoside, isoquercetina, kaempferol-3-O-glucoside e acido gallico. Le differenti molecole sono state identificate confrontandole con gli standard, tramite il tempo di ritenzione e gli spettri UV. Alcune indicazioni possono essere dedotte con-

frontando i nostri studi con i lavori sulla composizione dei cladodi in *Opuntia ficus-indica*. Dai nostri risultati, i flavonoli iperoside e isoquercetina sono i più abbondanti nella mucillagine. I partner messicani del Progetto hanno analizzato nel Laboratorio de Análisis y Diagnóstico del Patrimonio (Ladipa) (El Colegio de Michoacán A.C., la Piedad, Mexico) i monosaccaridi (glucosio, galattosio, mannosio, arabinosio e ramnosio), monosaccaridi acidi (galatturonico e glucuronico) antiossidanti (p-cumarico, isoramnetina, isoquercitina e iperoside), amminoacidi (acido glutammico) con uno spettrofotometro (JMS-T100LP AccuTOF LC-PLUS) (JEOL, Tokyo, Japan) dotato di una sorgente di DART SVP100 (Ionsense, Saugus, MA, USA). Questo tipo di analisi offre la possibilità di osservare i campioni allo stato nativo con una analisi rapida che non necessita di estrazioni.

Nella Fig. 3.17 è riportato lo spettro DART_MS (a 300 °C in modalità negativa) dell'idrocolloide ottenuto da pressa in cui si osservano principalmente ioni molecolari di arabinosio e xilosio e frammenti di esosi (glucosio o galattosio) che risultano più deboli. Si nota anche la presenza di antiossidanti come la isoramnetina, considerata da diversi autori un marker di tipicità e di legame con il territorio.

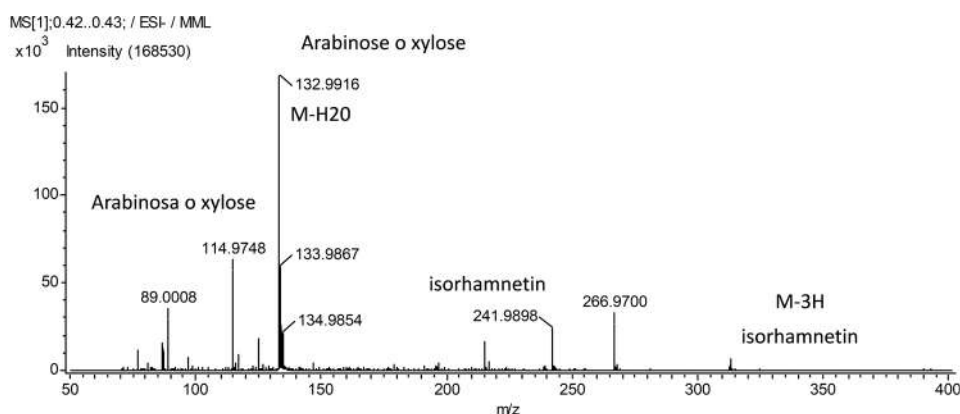


Fig. 3.17 Spettro DART_MS (a 300 °C in modalità negativa) dell'idrocolloide ottenuto da pressa

5 Agilent Infinity 1260 equipaggiato con colonna Supelco LC8, pompa quaternaria, iniettore automatico montato sul modulo dell'autocampionatore e rivelatore DAD.



Caratterizzazione degli estratti mediante spettroscopia infrarossa (FTIR)

Le tecniche di spettroscopia ottica consentono lo studio dei campioni in esame grazie alle peculiarità della interazione fra radiazione e materia. Il sistema molecolare studiato si trova nel suo stato di equilibrio e può venire eccitato a uno stato con energia superiore assorbendo l'energia necessaria dai fotoni della radiazione di sonda. L'energia resa disponibile dai fotoni e l'esistenza di un corrispondente stato energetico eccitato del campione determinano quindi il tipo di transizione che avviene nell'interazione radiazione-materia.

Se immaginiamo un sistema molecolare come un insieme di sfere massive (gli atomi) legate fra loro da molle (i legami chimici) in perenne oscillazione intorno alle posizioni di equilibrio, vediamo che i modi di oscillazione di un tale sistema hanno frequenze (le energie vibrazionali) univocamente determinate dalle masse delle sfere (le masse atomiche) e dalla costante elastica delle molle. Tali energie sono comprese fra 50 meV e 500 meV (più frequentemente espresse in numeri d'onda, misurati in cm^{-1} $500 \div 5000 \text{ cm}^{-1}$) e corrispondono a quelle della regione infrarossa dello spettro elettromagnetico. Inviando quindi una radiazione infrarossa su un campione, solo un numero discreto di componenti spettrali possono venire assorbite in corrispondenza delle energie delle vibrazioni molecolari che sono specifiche dei legami molecolari presenti, con una probabilità (sezione d'urto) che è anch'essa caratteristica del legame stesso. Si capisce quindi che lo spettro di assorbimento infrarosso è un'impronta digitale univocamente legata ad un sistema molecolare. Il numero dei fotoni assorbiti, inoltre, è direttamente proporzionale al numero di legami presenti nel campione in grado di assorbirli, per cui, quantificando l'assorbimento, è possibile fare un'analisi chimica quantitativa del campione. Per ottenere lo spettro di assorbimento di un campione, quindi, si misura l'intensità spettrale della luce trasmessa dalla sorgente al rivelatore in presenza del campione ($I_S(\tilde{\nu})$) e si rapporta all'intensità misurata in assenza di campione ($I_0(\tilde{\nu})$), ricavan-

do lo spettro di trasmissività:

$$T(\tilde{\nu}) = \frac{I_S(\tilde{\nu})}{I_0(\tilde{\nu})}$$

Quindi si calcola l'assorbimento come:

$$\text{Abs}(\tilde{\nu}) = \log_{10} \frac{T(\tilde{\nu})}{100}$$

I moderni strumenti per la spettroscopia infrarossa non misurano gli spettri inviando luce monocromatica in successione sul campione tramite elementi dispersivi, ma si basano su sistemi interferometrici che inviano sul campione l'intero spettro elettromagnetico emesso da una sorgente infrarossa e permettono una sensibilità molto maggiore. Negli interferometri la separazione spettrale si ricava dalla distribuzione nel tempo delle intensità luminose (l'interferogramma), grazie ad una operazione matematica, la trasformata di Fourier.

La diffusione di calcolatori veloci, compatti ed economici, e il successivo sviluppo di algoritmi, che consentono l'esecuzione in tempo reale della trasformata di Fourier necessaria per ottenere lo spettro dall'interferogramma acquisito, hanno fatto sì che i sistemi interferometrici siano diventati la strumentazione di elezione per analisi di spettroscopia infrarossa, e l'acronimo FTIR (*Fourier-Transform InfraRed spectroscopy*) è ormai comunemente usato per riferirsi genericamente alla tecnica di misura degli spettri infrarossi.

Recentemente, il numero degli studi di spettroscopia infrarossa, sia di carattere accademico sia industriale, per la caratterizzazione di materiali di origine vegetale per applicazioni che spaziano dall'*agri-food* alle tecnologie energetiche fino ai materiali sostenibili per l'architettura e il restauro, risulta essere in continua crescita.

• Spettri infrarossi

Per evitare ulteriori processi di preparazione del campione si è utilizzato il metodo di misura basato sulla riflettanza totale attenuata (ATR), nel quale il campione, di solito polverizzato, viene schiacciato tra un cristallo trasparente nell'infrarosso



ed una piastra metallica. La radiazione infrarossa viaggia all'interno del cristallo e vi rimane confinata poiché, per la geometria del sistema, subisce una riflessione totale ogni volta che raggiunge la superficie; ad ogni riflessione totale, tuttavia, una piccola parte della radiazione, detta onda evanescente, "sonda" il campione in contatto con cristallo. La lunghezza di penetrazione della radiazione all'interno del campione varia tra qualche centinaio di nanometri fino a un paio di micron, dipendentemente dalla lunghezza d'onda, dall'angolo di incidenza e dall'indice di rifrazione di cristallo e campione. Per questo, la tecnica è particolarmente adatta allo studio della superficie di campioni solidi o di campioni polverizzati. La geometria e le dimensioni del cristallo insieme all'angolo di incidenza della radiazione determinano il numero di riflessioni e di conseguenza la quantità di luce assorbita dal campione; quindi aumentando il numero di riflessioni è possibile ottenere spettri significativi anche su campioni poco assorbenti, o su scarse quantità di campione. D'altra parte, vista l'incertezza sulla lunghezza di penetrazione della radiazione nel campione e sulla quantità di campione esposto, non è possibile quantificare l'assorbimento della radiazione e quindi le specie chimiche presenti; pertanto gli spettri misurati con la tecnica ATR permettono solo l'identificazione dei composti e il confronto di intensità fra picchi diversi.

Le misure di assorbimento infrarosso sono state effettuate nel Laboratorio di Spettroscopia Ultraveloce sito nel Centro ENEA Casaccia con uno spettroscopio Perkin-Elmer Spectrum100, nell'intervallo spettrale compreso tra 400 e 4000 cm^{-1} , utilizzando per l'ATR un cristallo di KRS-5 (bromo-ioduro di tallio), che nella geometria usata consente circa 20 riflessioni.

Poiché l'acqua presenta diverse bande di assorbimento nella regione dell'infrarosso è necessario disidratare i campioni; in questo modo, infatti, si evita che le bande di assorbimento degli altri costituenti siano coperte o alterate dalla presenza dei picchi dell'acqua. I campioni di mucillagine disidratata e sminuzzata sono quindi stati depositati

sul cristallo di KRS-5 per la misura in ATR senza alcun trattamento ulteriore. Gli spettri di assorbimento riportati di seguito sono calcolati dalle misure di trasmissività dopo la sottrazione di un fondo e la successiva normalizzazione che ne facilita il confronto.

Lo spettro di assorbimento tipico di una mucillagine di OFI disidratata è riportato in Fig. 3.18. La larga banda a circa 3440 cm^{-1} è dovuta ai legami O-H, presenti negli acidi carbossilici e nei polisaccaridi. Tuttavia, poiché i legami OH sono presenti anche nelle molecole d'acqua, questa banda è fortemente influenzata dal grado di idratazione residua del campione, che non è completamente controllabile, e pertanto non ha valore diagnostico. Ad alti numeri d'onda, tra 2880 e 3016 cm^{-1} , inoltre, sono presenti i picchi dovuti alle vibrazioni di legami C-H dei gruppi CH_2 e CH_3 presenti in acidi carbossilici e polisaccaridi. Ma la regione più significativa risulta quella compresa tra gli 800 e 1700 cm^{-1} , detta regione del *fingerprint* degli zuccheri; lo studio degli spettri in questo intervallo spettrale dovrebbe permettere l'identificazione degli zuccheri presenti nel campione. Tuttavia, la similarità delle molecole in questione fa sì che gli spettri dei singoli zuccheri siano simili fra loro e inoltre estremamente complessi, poiché caratterizzati da numerose bande, spesso parzialmente sovrapposte.

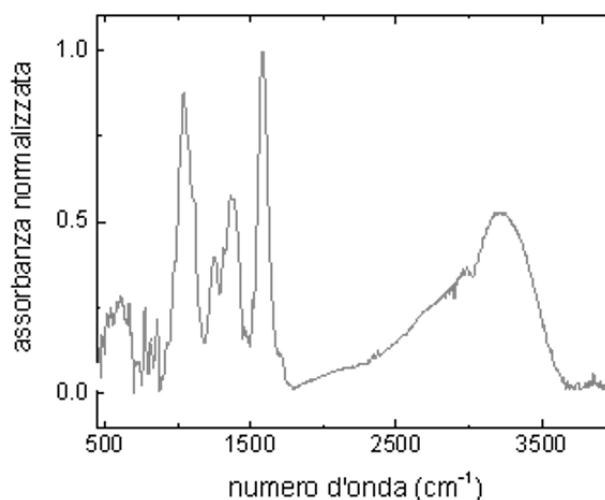


Fig. 3.18 - Spettro di assorbimento infrarosso misurato su mucillagine di OFI disidratata ottenuta da un processo classico di macerazione



Per questa ragione, l'identificazione univoca di uno zucchero specifico o di una specifica miscela di zuccheri è spesso impraticabile tramite il semplice confronto diretto con spettri di riferimento. Ciononostante, confrontando i dati sperimentali con quelli presenti in letteratura (Rodriguez-Navarro *et al.*, 2017) è stato possibile identificare dei picchi diagnostici relativi alla presenza di specifici zuccheri nelle mucillagini di OFI studiate. In Fig. 3.19 sono riportati, nella sola regione del *finger-print*, gli spettri di mucillagine ottenuta per macerazione in acqua a due diverse concentrazioni, e sono evidenziate le posizioni di picchi caratteristici degli zuccheri maggiormente presenti ovvero quella a 1051 cm^{-1} dovuta ad arabinosio e ramnosio, quella a 940 cm^{-1} del galattosio, quelle a 1104 cm^{-1} e quella a 1179 cm^{-1} dello xilosio (Lefsih *et al.*, 2016, Coimbra *et al.*, 1998, Coimbra *et al.*, 1981). Inoltre, in Fig. 3.21 sono riportate le posizioni di picchi relativi alle vibrazioni di legami carbonio-ossigeno, a 1104 cm^{-1} e 1118 cm^{-1} , presenti negli acidi uronici e la banda a 1429 cm^{-1} attribuita alle vibrazioni dei gruppi carbossilici dell'acido galatturonico.

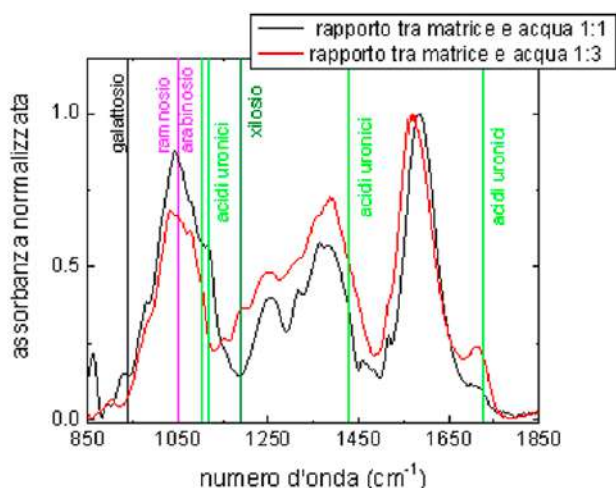


Fig. 3.19 - Spettri di assorbimento infrarosso misurati su mucillagini di OFI disidratate. Sul grafico inoltre è evidenziata la posizione di picchi diagnostici della presenza di alcuni zuccheri e di acidi uronici

Il confronto fra i due spettri evidenzia che la differenza di concentrazione di matrice nell'acqua influisce sulla qualità della mucillagine estratta in termini di composizione chimica. In particolare, si evidenzia come il processo classico (con

concentrazione 1:1 di matrice in acqua) favorisca l'estrazione di ramnosio e arabinosio, sfavorendo in parte il processo di estrazione dello xilosio e altri zuccheri non facilmente identificabili con le sole misure di assorbimento infrarosso. Gli spettri inoltre evidenziano l'abbondante presenza di acidi carbossilici in entrambi i prodotti, in quantità confrontabile. Poiché è noto, in particolare, che la proprietà gelificante di estratti vegetali è dovuta alla presenza di acidi uronici, e per quelli di *nopal* specificatamente di acido galatturonico (C. Rodriguez-Navarro *et al.*, 2017, Goycoolea *et al.*, 2003), l'analisi della presenza di acidi carbossilici è particolarmente rilevante per molte applicazioni. Nel caso dell'utilizzo delle mucillagini nell'impasto delle malte, ad esempio, è stato dimostrato che è proprio la componente gelificante la responsabile delle migliori caratteristiche macroscopiche dei prodotti con additivi vegetali rispetto a quelli ottenuti senza (Grant *et al.*, 1973).

Analogamente a quanto fatto su mucillagini estratte con macerazione a diverse concentrazioni in acqua, confrontando gli spettri misurati su campioni estratti in condizioni molto diverse di acidità si ottengono indicazioni sull'influenza del pH sulla composizione chimica della mucillagine, come mostrato in Fig. 3.20. Pertanto, la spettroscopia infrarossa può dare indicazioni utili per la scelta del metodo di estrazione mirata alla produzione di un prodotto più o meno ricco di uno o più

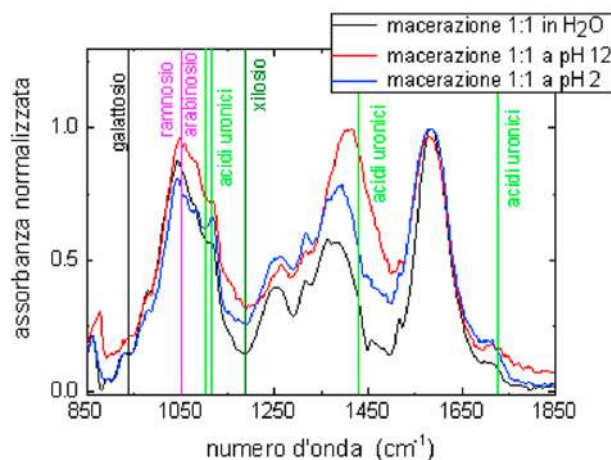


Fig. 3.20 - Spettri di assorbimento infrarosso misurati su mucillagini di OFI disidratate estratte in diverse condizioni di pH



zuccheri selezionati ovvero, in vista di un utilizzo nella produzione di malte, più ricco di acidi uronici.

I risultati delle misure qui riportate mostrano come condizioni fortemente acide e basiche del bagno di macerazione favoriscano l'estrazione di acidi carbossilici, e quindi possano essere ritenute preferibili al processo classico.

Infine, è stata studiata la composizione chimica dei prodotti estratti con metodi diversi da quello di macerazione classica, con l'intervento di processi fisici in grado di ottenere mucillagini in tempi estremamente ridotti, descritti in precedenza. Gli spettri riportati in Fig. 3.21 mostrano profonde differenze nella composizione dei diversi campioni, ancora una volta suggerendo la possibilità di scegliere il processo estrattivo per ottimizzare il prodotto finale in base alle applicazioni selezionate. In particolare, l'estrazione degli acidi uronici risulta favorita da processi ad alta temperatura, quali il trattamento con microonde e in autoclave.

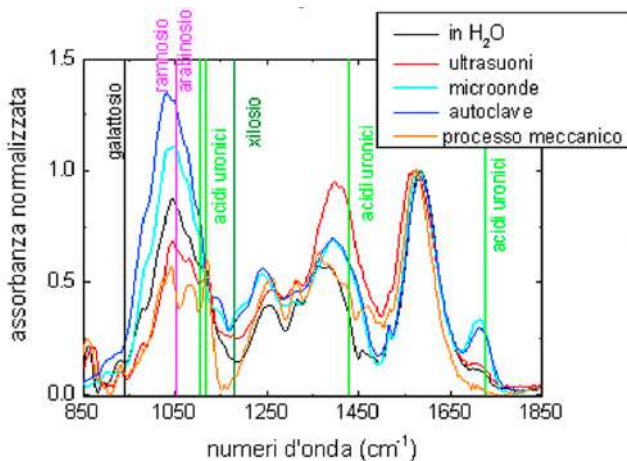


Fig. 3.21 - Spettri di assorbimento infrarosso misurati su mucillagini di nopal disidratate estratte con metodologie diverse, confrontate con lo spettro di un campione prodotto con macerazione 1:1

Valutazione delle proprietà reologiche dell'idrocolloide

La reologia studia il comportamento e la deformazione dei fluidi sotto l'azione di una forza. La resistenza di un fluido rispetto ad ogni cambiamento posizionale irreversibile dei suoi elementi di volume viene definita viscosità. Le proprietà reologiche ci aiutano a identificare la migliore formulazione dei biopolimeri in funzione della loro applicazione. Nel nostro lavoro la viscosità è stata analizzata nella mucillagine ottenuta da un rapporto biomassa/acqua di 1:1 (100 g in 100 ml di acqua) utilizzando il reometro HAAKE RheoStress 600 con geometria piatto-piatto (distanza 0,052 mm) alloggiato in una camera secca (umidità < 20 ppm). Il test è stato effettuato a 25 °C con velocità di rotazione 0.5–300 s⁻¹.

Il profilo reologico riportato nella Fig. 3.22 mostra la viscosità in funzione della velocità angolare di deformazione applicata dal reometro. Si può notare una zona dove l'andamento è pressoché lineare, entro deformazioni ridotte, ove avviene un aumento di viscosità all'aumentare della velocità di deformazione. In generale il comportamento risulta essere di tipo viscoelastico, e quindi il fluido in esame segue un comportamento non newtoniano.

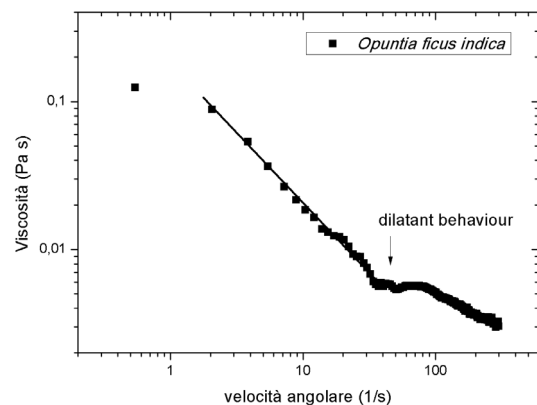


Fig. 3.22 - Viscosità della mucillagine estratta con rapporto biomassa/acqua 1:1 in funzione della velocità angolare di deformazione applicata dal reometro



In letteratura (Salehi *et al.*, 2019) viene riportato che incrementando la concentrazione di estratti di mucillagine la viscosità apparente del fluido incrementa del 10% e si comporta come una soluzione di xantano al 3%. Il comportamento reologico non solo dipende dalla temperatura (che se incrementata rende la soluzione meno viscosa) ma anche da altri fattori come il pH e la concentrazione di sali discussa precedentemente.

In una soluzione con mucillagine di *Opuntia* in genere il grado di deformazione incrementa quando la viscosità diminuisce (Salehi *et al.*, 2019). In tal modo è possibile analizzare il comportamento generale del fluido utilizzando la legge Power Law (o Flow Law):

$$\eta = K\dot{\gamma}^{n-1}$$

dove η è la viscosità e $\dot{\gamma}$ il grado di taglio.

Questa legge ci riporta 2 parametri:

1. n = indice di flusso: È in pratica una misura di "non-newtonianità": per un fluido Newtoniano è = 1; per un fluido fluidificante o assottigliante è compreso tra 0 e 1 e per un fluido addensatore (o dilatante) è maggiore di 1.
2. Consistenza K: Questo non è altro che la viscosità (o lo stress) con una velocità di taglio di $1s^{-1}$. Può essere visto come il punto in cui la curva di viscosità/velocità di taglio "pende".

Analizzando con questo tipo di fitting la mucillagine ottenuta per macerazione in acqua 1:1 e per estrazione meccanica, si ottengono dei valori di n e K "medi" con una bontà di fitting non sempre elevata. Più nel dettaglio si possono riconoscere per ogni misura degli andamenti diversi mano a mano che si cambia la velocità di taglio. È comunque interessante notare che in tutti i campioni analizzati si osserva uno stesso valore di shear rate al quale avviene un cambiamento e oltre il quale il comportamento è meno complesso ($35s^{-1}$). A tale livello è possibile ipotizzare la rottura di fibre polisaccaridiche.

In Fig. 3.23 vengono descritti i comportamenti prima e dopo $35s^{-1}$ di diverse soluzioni con estratti di *Opuntia*, il dato più interessante è che i campioni ottenuti con una estrazione meccanica evidenziano comportamenti più lineari e soprattutto una minore variabilità dal fresco al liofilizzato rigenerato.

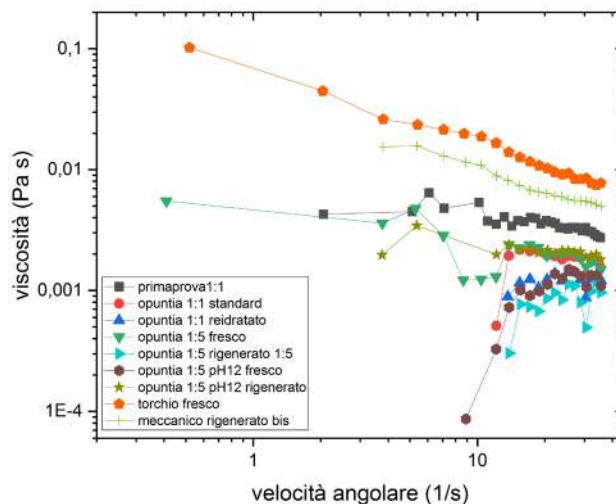


Fig. 3.23 - Comportamenti reologici di estratti di mucillagine ottenuti in condizioni differenti

Estrazione dei capsaicinoidi da frutti di *Capsicum*

I frutti del genere *Capsicum* (peperoncino) sono ricchi in alcaloidi, prodotti del metabolismo secondario, costituiti principalmente da capsaicinoidi, tra i quali capsaicina e diidrocapsaicina sono i più abbondanti e i principali responsabili della loro tipica piccantezza e dell'attività antimicrobica e antimicotica. La quantificazione dei principi attivi di diverse specie di peperoncino è stata realizzata utilizzando tecniche HPLC e MS_DART. Nello studio sono stati utilizzati frutti di *Capsicum frutescens*, *Capsicum pubescens* (manzano), *Capsicum annuum* (serrano) e *Capsicum chinense* (habanero), ottenuti dal mercato locale di La Piedad Michoacán in Messico, ad esclusione di *C. frutescens*, i cui frutti, essendo questa specie "semi-selvatica" coltivata in vaso, sono stati donati da una famiglia locale.



La Fig. 3.24 mostra il nome e il fenotipo comune dei frutti delle specie studiate, indicandone la fase di maturazione e la variazione naturale nella forma, dimensione e colore.

Il metodo scelto per l'estrazione dei capsaicinoidi è quello proposto da Collins *et al.* (1995) che riporta alte rese di estrazione dei capsaicinoidi usando acetonitrile come solvente.

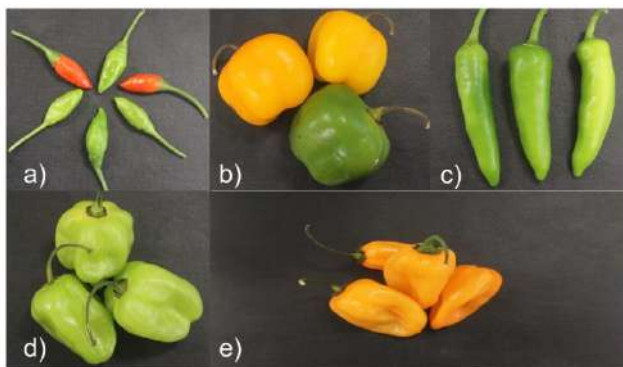


Fig. 3.24 Fenotipo dei frutti di *Capsicum* spp. utilizzato per l'estrazione di capsaicinoidi. (a), *Capsicum frutescens*, (b) *Capsicum pubescens* (manzano), (c) *Capsicum annuum* (serrano) e *Capsicum chinense* (habanero) in fase di maturazione verde (d) e arancione (e)

Per la quantificazione dei principi attivi, è stato utilizzato un sistema HPLC Agilent Technologies con pompa quaternaria Series 1260 con un rivelatore DAD e una colonna cromatografica Agilent RP Eclipse XDB-C18 (150 mm x 4.6 mm; dimensione delle particelle 5 µm), presente nel Laboratorio Bioprodotti e Bioprocessi del Centro ENEA Casaccia. Per l'elaborazione della curva di calibrazione sono stati utilizzati standard di capsaicina e diidrocapsaicina Sigma-Aldrich. Un secondo metodo per l'identificazione rapida dei capsaicinoidi è stata la spettrometria di massa in tempo reale (MS-DART), nel Laboratorio de Análisis y Diagnóstico del Patrimonio (Ladipa) nel Colegio de Michoacán A.C., la Piedad, Mexico. Per queste analisi sono stati utilizzati gli estratti ottenuti da *Capsicum* diluiti 1:10 in acetonitrile e gli standard di capsaicina e diidrocapsaicina. Gli estratti sono stati introdotti nella zona di ionizzazione DART con l'aiuto di un tubo capillare e dopo la ionizzazione sono stati analizzati con lo spettrometro di

massa Jeol AccuTOF LC-Plus JMS T100LP in cui il campione può essere analizzato allo stato solido, liquido o gassoso a pressione atmosferica.

Nei successivi grafici (Figg. 3.25, 3.26, 3.27) si può osservare la quantificazione espressa in mg per grammo di peso secco di capsaicina e diidrocapsaicina in placenta, semi e pericarpo delle diverse specie di peperoncino messe a confronto (*C. chinense verde*, *C. chinense arancio*, *C. annuum*, *C. pubescens*, *C. frutescens*). La quantità totale di capsaicinoidi varia notevolmente tra le diverse specie, ma la percentuale di capsaicina e diidrocapsaicina è in genere compresa tra il 77-90% del totale nei frutti di *C. annuum* e tra l'89-98% nelle specie di *C. frutescens*. Le nostre analisi sui semi evidenziano che la specie *C. frutescens* ha il più alto contenuto in capsaicina rispetto alle altre specie messe a confronto, mentre il *Capsicum chinense* (habanero) mostra un maggiore contenuto di principi attivi localizzato nel pericarpo e nella placenta. È importante tener presente che l'accumulo di capsaicinoidi aumenta durante la maturazione dei frutti dalla fase verde a quella rossa ed è influenzato da fattori genetici e ambientali, quali ad esempio la fase di maturazione, la specie, la cultivar e le condizioni agro climatiche.

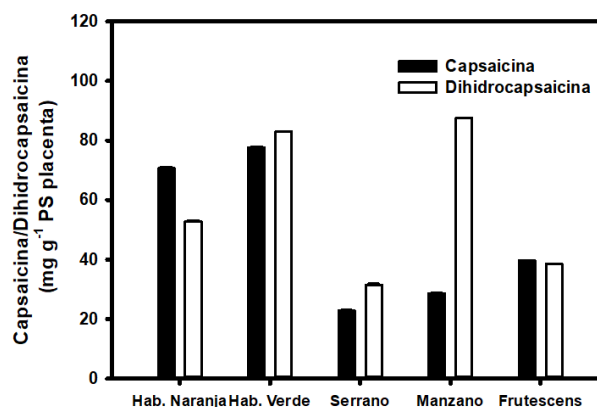


Fig. 3.25 - Confronto del contenuto di Capsaicina e Diidrocapsaicina nella placenta delle diverse specie di *Capsicum*



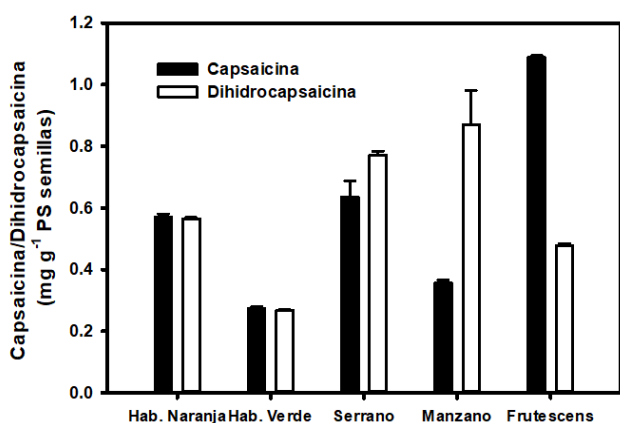


Fig. 3.26 - Confronto del contenuto di Capsaicina e Diidrocapsaicina nei semi delle diverse specie di *Capsicum*

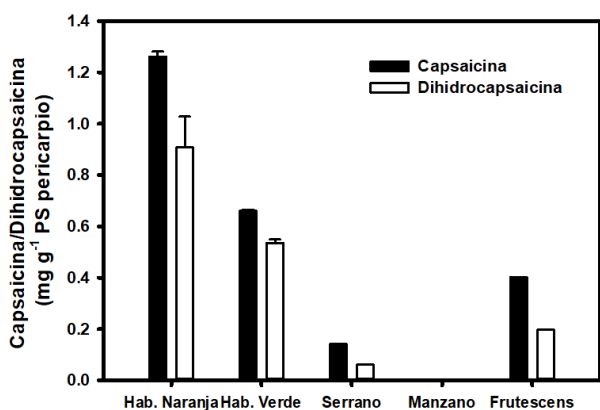


Fig. 3.27 - Confronto del contenuto di Capsaicina e Diidrocapsaicina nel pericarpio delle diverse specie di *Capsicum*

• Messa a punto dell'estratto CAP

L'estrazione della miscela di capsacinoidi (CAP) per la sua applicazione nelle malte da restauro è stata realizzata nel Laboratorio di Osservazioni e Misure per l'ambiente e il clima, in ENEA Casaccia, a partire dai frutti essiccati del peperoncino coltivati in Italia (*Capsicum annum*), che sono stati finemente macinati (Waring Laboratory blender) e messi a macerare in alcool etilico al 96% in rapporto 1:20 (p/v) a temperatura ambiente e sotto agitazione costante per un'ora. La soluzione alcoolica viene quindi filtrata su carta Whatman 32 per eliminare i residui grossolani e concentrata in Rotavapor a 40 °C fino alla completa evaporazione dell'alcool etilico. Il residuo solido viene poi sciolto in una soluzione trifasica contenente acetone:K₂HPO₄:esano per eliminare gran parte del pigmento, la capsantina, responsabile dell'intensa colorazione rossa. Nella fase più leggera, ricca di esano, si concentra la capsantina; i capsacinoidi invece, essendo composti polari, si concentrano nella fase centrale, ricca di acetone (Dang *et al.*, 2014). In questo modo si riesce ad ottenere un prodotto quasi incolore, la cui composizione in capsacinoidi è stata analizzata al MS-DART nel laboratorio dei partner messicani.

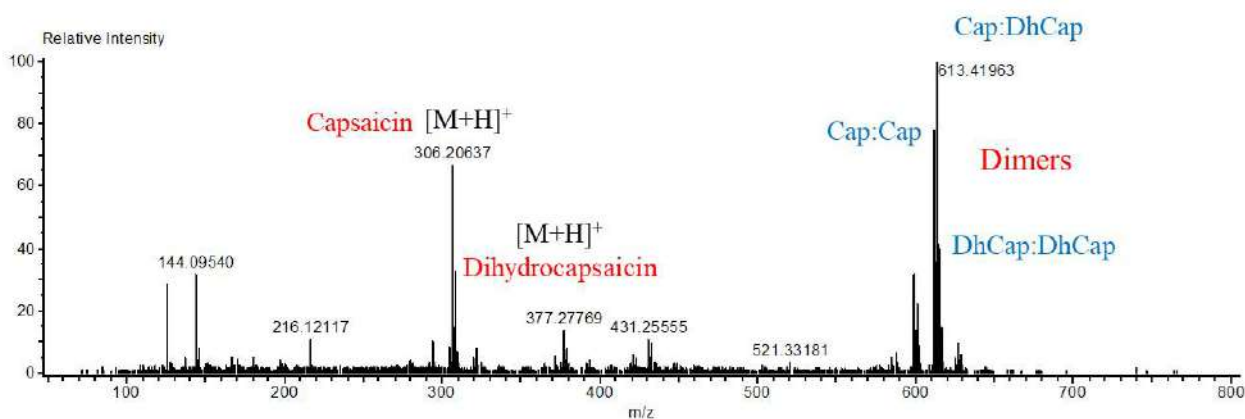


Fig. 3.28 - Composizione in capsacinoidi dell'estratto alcoolico decolorato analizzato al MS-DART



Bibliografía

- L. Bacchetta, O. Maccioni, V. Martina, E. Bojorquez-Quintal, F. Persia, S. Procacci, F. Zaza, Quality by design approach to optimize cladodes soluble fiber processing extraction in *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller, *J Food Sci Technol*, vol. 56, no. 8, pp. 3627–3634, 2019
- Balasundram et al., Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chemistry*, vol. 99, no. 1, pp. 191–203, 2006, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- N. Bayar et al., Ultrasonic extraction of pectin from *Opuntia ficus-indica* cladodes after mucilage removal: Optimization of experimental conditions and evaluation of chemical and functional properties, *Food Chemistry*, vol. 235, pp. 275–282, 2017
- A. Boutakiout et al., Effects of different harvesting seasons on antioxidant activity and phenolic content of prickly pear cladode juice, *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, vol. 17, pp. 471–480, 2018
- A. Cárdenas, F.M. Goycoolea, M. Rinaudo, On the gelling behavior of nopal (*Opuntia ficus-indica*) low methoxyl pectin, *Carbohydr Polym*, vol. 73, pp. 212–222, 2008
- M.A. Coimbra, A. Barros, D. N. Rutledge, I. Delgadillo, FTIR spectroscopy as a tool for the analysis of olive pulp cell-wall polysaccharide extracts, *Carbohydr. Res.*, vol. 317, 145–154, 1981
- M.A. Coimbra, A. Barros, M. Barros, D. N. Rutledge, I. Delgadillo, Multivariate analysis of uronic acid and neutral sugars in whole pectic samples by FT-IR spectroscopy, *Carbohydr. Polym.*, vol. 37, pag. 241–248, 1998
- M. D. Collins, L. M. Wasmund, P. W. Bosland, Improved method for quantifying capsaicinoids in capsicum using high-performance liquid, *Chromatography*, vol. 30, no. 1, pp. 137, 1995
- J. Corrales-García, C.B. Peña-Valdivia, Y. Razo-Martínez, M. Sánchez-Hernández, Acidity changes and pH-buffering capacity of nopalitos (*Opuntia* spp.), *Postharvest Biol Technol*, vol. 32, pp. 169–174, 2004
- Y.-Y. Dang, H. Zhang, Z.-L. Xiu, Three-liquid-phase Extraction and Separation of Capsanthin and Capsaicin from *Capsicum annum* L. in *Czech Journal of Food Sciences*, vol. 32, no. 1, pp. 109–114, 2014, <https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/114007.pdf>
- M. DuBois, K. Gilles, J. Hamilton, P. Rebers, F. Smith, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry*, vol. 28, no. 3, pp. 350–356, 1956
- L. Felkai-Haddache, H. Remini, V. Dulong, K. Mamou-Belhabib, L. Picton, K. Madani, C. Rihouey, Conventional and microwave-assisted extraction of mucilage from *Opuntia ficus-indica* cladodes: physico-chemical and rheological properties, *Food Bioprocess Technol*, vol. 9, no. 3, pp. 481–492, 2015, <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1640-7>
- F.M. Goycoolea, A. Cardenas, Pectins from *Opuntia* spp.: a Short Review, *J. Profess. Assoc. Cactus Dev.*, vol. 5, pp. 17–29, 2003
- G.T. Grant, E.R. Morris, D.A. Rees, P.J. Smith, D. Thom, Biological Interactions between Polysaccharides and divalent Cations: the Egg-Box Model, *FEBS Lett.*, vol. 32, pp. 195–198, 1973
- W. Han, Y. Meng, C. Hu, G. Dong, Y. Qu, H. Deng, Y. Guo, Mathematical model of Ca²⁺ concentration, pH, pectin concentration and soluble solids (sucrose) on the gelation of low methoxyl pectin, *Food Hydrocoll*, vol. 66, pp. 37–48, 2011
- K. Lefsih, C. Delattre, G. Pierre, P. Michaud, T. M. Aminabhavi, F. Dahmoune, K. Madani, Extraction, characterization, and Gelling Behavior Enhancement of Pectins from the Cladodes of *Opuntia ficus-indica*, *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 82, pp. 645–652, 2016
- A.L. Lira-Ortiz, F. Reséndiz-Vega, E. Ríos-Leal, J.C. Contreras-Esquivel, N. Chavarría-Hernández, A. Vargas-Torres, A.I. Rodríguez-Hernández, Pectins from waste of prickly pear fruits (*Opuntia albicarpa* Scheinvar Reyna): chemical and rheological properties, *Food Hydrocoll*, vol. 37, pp. 93–99, 2014



O.H. Lowry, S. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the phenolreagent, *J Biol Chem*, vol. 193, pp. 265–275, 1951

V., Martina 2018. Tirocinio e Tesi Magistrale 'Valorizzazione di risorse biologiche da *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller e sviluppo di prodotti innovativi bio-based.' (ENEA e Università Tor Vergata, Facoltà Biotecnologie industriali)

H. Majdoub, S. Roudesli, L. Picton, D. Le Cerf, G. Muller, M. Grisel, Prickly pear nopals pectin from *Opuntia ficus-indica* physico-chemical study in dilute and semi-dilute solutions, *Carbohydrate Polymers*, vol. 46, no. 1, pp. 69–79, 2001 ISSN 0144-8617, [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00284-8](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00284-8)

B. Matsuhiro, L. E. Lillo, Carmen Sáenz, C. C. Urzúa, O. Zárate, Chemical characterization of the mucilage from fruits of *Opuntia ficus-indica*, *Carbohydrate Polymers*, vol. 63, no. 2, pp. 263–267, 2006 ISSN 0144-8617, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.08.062>

M. Monrroy, E. García, K. Rios, J. R. García, Extraction and physicochemical characterization of mucilage from *Opuntia cochenillifera* (L.) Miller., *Journal of Chemistry*, vol. 2017, pp. 9, 2017, ID4301901, <https://doi.org/10.1155/2017/4301901>

D.E. Ngouémazong, F.F. Tengweh, I. Fraeye, T. Duvetter, R. Cardinaels, A. Van Loey, P. Moldenaers, M. Hendrickx, Effect of demethylesterification on network development and nature of Ca²⁺-pectin gels: towards understanding structure-function relations of pectin, *Food Hydrocoll*, vol. 26, no. 1, pp. 89–98, 2012

D. Pingret, A.-S. Fabiano-Tixier, F. Chemat, Ultrasound-assisted extraction. In: *Natural Product Extraction: Principles and Applications, RSC Green Chemistry*, 2013, 89–112, Natural Product Extraction (RSC Publishing), <https://doi.org/10.1039/9781849737579-00089>

G. Rocchetti, M. Pellizzoni, D. Montesano, L. Lucini, Italian *Opuntia ficus-indica* cladodes as rich source of bioactive compounds with health promoting properties, *Foods*, vol. 7, no. 2, pp. 24, 2018, <https://doi.org/10.3390/foods7020024>

C. Rodriguez-Navarro, E. Ruiz-Agudo, A. Burgos-Cara, K. Elert, E. F. Hansen, Crystallization and Colloidal Satbilization of Ca(OH)₂ in the presence of Nopal Juice (*Opuntia ficus-indica*): implications in Architectural Heritage Conservation, *Langmuir*, vol. 33, no. 41, pp. 10936–10950, 2017 DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b02423>

E Salehi, Emam-Djomeh Z, Fathi M, Askari G (2019) *Opuntia ficus indica* Mucilage In: *Emerging Natural Hydrocolloids*. ed Seyed M A Razavi Wiley 17: 425-444

E. Sepúlveda, C. Sáenz, E. Aliaga, C. Aceituno, Extraction and characterization of mucilage in *Opuntia* spp., *J. Arid Environ*, vol. 68, pp. 534–545, 2007

S.H. Trachtenberg, A.M. Mayer, Composition and properties of *Opuntia ficus-indica* mucilage. *Phytochemistry*, vol. 20, no. 12, pp. 2665–2668, 1981

J. Veloso, C. Prego, M. M. Varela, R. Carballeira, A. Bernal, F. Merino, J. Díaz, Properties of capsaicinoids for the control of fungi and oomycetes pathogenic to pepper, *Plant Biology*, pp. 177–185, 2014, <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00717.x>

X. Zhao, L. Qiao, A. Wu, Effective extraction of *Arabidopsis* adherent seed mucilage by ultrasonic treatment, *Sci Rep*, vol. 7, pp. 40672, 2017, <https://doi.org/10.1038/srep40672>

H. Zheng, H. Lu, Effect of microwave pretreatment on the kinetics of ascorbic acid degradation and peroxidase inactivation in different parts of green asparagus (*Asparagus officinalis* L.) during water blanching, *Food Chemistry*, vol. 128, no. 4, pp. 1087–1093, 2011, ISSN 0308-8146, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.130>

Monrroy M, García E, Rios K, García J R, 2017. Extraction and physicochemical characterization of mucilage from *Opuntia cochenillifera* (L.) Miller. *Journal of Chemistry* ID4301901, <https://doi.org/10.1155/2017/4301901>



4. I prodotti NopalGel e NopalCap: *shelf life* del prodotto fresco, liofilizzazione, *spray dryer*

di Paola Sangiorgio, Salvatore Palazzo, Alessandra Verardi, Vittorio Martina, Oliviero Maccioni, Silvia Procacci, Serena Gagliardi, Mauro Falconieri, Emanuel Bojorquez-Quintal, Claudio Russo, Daniele Mirabile Gattia, Loretta Bacchetta

I prodotti messi a punto nel Progetto bilaterale, a base di mucillagine di *Opuntia ficus-indica* e di estratto di frutti di *Capsicum*, sono stati chiamati NopalGel e NopalCap. La mucillagine utilizzata per i prodotti è stata estratta dai cladodi freschi di 2-4 anni sia attraverso il processo di macerazione in acqua sia per estrazione meccanica. Le caratteristiche del bioprodotto, ricco di zuccheri complessi e di biomolecole, ne limitano la conservabilità e la qualità nel tempo. La possibilità di stabilizzarlo rendendolo di più immediato e facile utilizzo per le applicazioni pratiche, ha portato, come descriveremo in questo capitolo, a sperimentare processi di liofilizzazione su piccola scala e a livello pre-industriale, nonché a verificare la validità in termini quali-quantitativi del processo di *spray dryer*. Per comodità di esposizione con il nome NopalGel si intende di seguito la mucillagine estratta da cladodi come descritto nel capitolo 3, anche quando liofilizzato o stabilizzato in altra maniera. Lo sviluppo del progetto ha quindi cercato di valutare la stabilità del prodotto fresco NopalGel con prove di *shelf-life* con e senza conservanti, per poi identificare un metodo ottimale di conservazione applicabile anche a grandi quantità di materiale, in vista di uno scale-up industriale del prodotto.

Shelf life del NopalGel: prodotto fresco

Al fine di determinare la stabilità nel tempo della mucillagine estratta dai cladodi di *Opuntia*, un adeguato numero di campioni, del volume di 50 ml circa, è stato preparato con NopalGel estratto meccanicamente. La stabilità del prodotto è stata valutata in funzione dell'aggiunta di un conservante, nello specifico acido citrico, e in funzione della

temperatura di conservazione (4 °C o temperatura ambiente, 25 °C). In tal modo ad una metà dei campioni è stato addizionato acido citrico al 3% p/v e all'altra metà non è stato aggiunto nessun conservante. Ciascuno dei due gruppi di campioni è stato diviso in due sottogruppi: uno conservato a temperatura ambiente (circa 25 °C) in un luogo non esposto a fonti di calore e al buio, mentre l'altro è stato conservato a 4 °C in frigorifero. Sono stati monitorati i seguenti parametri: pH, acidità libera e sostanze solide disciolte (°Bx)¹ a intervalli di conservazione fino ad un massimo di 51 giorni. In tutti i campioni è stata evidente una certa torbidità già dopo 7 giorni, per cui si è resa necessaria una centrifugazione a 10000 rpm per 20 min. prima di misurare il volume da titolare. Una notevole capacità tamponante del pH da parte della mucillagine, è stata invece osservata nei vari campioni, come già in precedenza riportato nel capitolo 3. Data la capacità dell'acido citrico di alterare la quantità di acidi liberi normalmente presenti nel prodotto, tale parametro è stato misurato nei prodotti senza conservante.

Come riportato nella Tab. 4.1 già al primo prelievo, tempo 0, il campione conteneva 10.6 g_{eq}/l di acido tartarico; tale valore risulta in realtà molto alto rispetto a quanto riportato da Boutakiut *et al.*, (2018), i quali hanno misurato dei valori intorno a 1.5 g_{eq}/l di acido tartarico. È comunque evidente, anche in assenza del conservante, una capacità tamponante del prodotto (Fig.4.1).

Il potere tamponante si aggira all'incirca da 2.3 a 3.3 ml di NaOH di 0.5N per unità di pH, che sono valori piuttosto elevati considerando che per innalzare il pH di una unità occorrono 0.18 ml di NaOH 0.5N.

1 Il pH è stato misurato con un pHmetro e titolatore pH-Burette 24 (CRISON); i solidi totali disciolti sono stati determinati con l'ausilio di un rifrattometro digitale HI96811 ed espressi in °Bx. L'acidità libera è stata determinata per titolazione della mucillagine con NaOH 0,5N mediante il titolatore automatico pH-Burette 24 (CRISON) di cui sopra, ed è espressa in geq /L di acido tartarico. Il punto finale della titolazione corrisponde a pH 8.1. I gradi Brix sono stati valutati con un rifrattometro digitale Digital (Extech RF 153).



Per quanto riguarda il pH, una certa diminuzione è osservabile già dopo 7 giorni di conservazione (Tab. 4.1). Dopo 14 giorni dall'inizio dell'esperimento si nota che, a temperatura ambiente e senza conservante, il pH si mantiene stabile, mentre in presenza di acido citrico tende ad aumentare. Al tempo massimo di osservazione (51 giorni) si osserva che, sia nei campioni conservati a temperatura ambiente che in quelli conservati al freddo, il pH risulta nettamente abbassato, sia in presenza che in assenza di conservante. I solidi totali si mantengono stabili, con un valore medio che si aggira intorno a 3.3-3.5 °Bx.

Prove successive hanno dimostrato che l'estrazione di mucillagine da cladodi "sanitizzati", ossia inizialmente lavati sotto acqua corrente e trattati con Sanilyte at 200 mg L⁻¹ porta a un bioprodotto con parametri di partenza migliori: pH: 4.35; g_{eq.}/l di acido tartarico: 1,4; °Bx: 3.2; in particolare l'acidità libera risulta nettamente inferiore a quella osservata nel prodotto della sperimentazione ed è in accordo con i valori riportati in letteratura (Boutakiut *et al.*, 2018). Dall'andamento di queste prove risulta comunque che l'acidità totale è un parametro di interesse per valutare la qualità del prodotto estratto. Inoltre, è ulteriormente dimostrata la notevole capacità tamponante del pH insito nella mucillagine, la quale riesce a impedire drastici cambiamenti almeno entro il primo mese di conservazione.

Il processo di liofilizzazione

La liofilizzazione è un importante processo di essiccazione che consente la conservazione di sostanze, matrici biologiche e microorganismi, a temperatura ambiente e a lungo termine, in quanto riduce drasticamente l'attività dell'acqua nel prodotto.

L'attività dell'acqua, a_w , è un indice relativo alla quantità di acqua "libera" presente in una matrice biologica, data dal rapporto fra la pressione parziale di vapore dell'acqua nella matrice (P) e la pressione di vapore dell'acqua pura alla stessa temperatura (P₀): $a_w = P/P_0$. (Nielsen *et al.*, 2012).

Essa può assumere valori adimensionali che vanno da 0 ad 1. Maggiore è a_w , meno forte è il legame dell'acqua con il prodotto (Chaplin, 2019). I fattori che riducono la mobilità dell'acqua in un substrato riducono anche la sua tendenza ad evaporare e la sua pressione di vapore. Quando $a_w = 0$, l'acqua è totalmente legata, non tende a fuggire sotto forma di vapore e non esercita alcuna pressione parziale (Acevedo *et al.*, 2006).

La quantità di acqua legata non ha alcuna relazione con la stabilità del prodotto, mentre la quantità di acqua libera influenza le sue proprietà fisiche (texture), sostiene la crescita microbica e partecipa o supporta reazioni chimiche, quali l'ossidazione lipidica, la denaturazione delle proteine, la degradazione di vitamine ecc., che a loro volta incidono sulla *shelf-life* del prodotto.

Esiste un valore a_w ottimale per la crescita microbica che, in generale, è più elevato per i batteri rispetto ai funghi. Se si abbassa progressivamente tale valore, diminuisce anche la possibilità di sviluppo microbico. In generale, un valore di $a_w \approx 0.61$, rappresenta il limite di sopravvivenza per tutte le forme di vita (Archea, Batteri ed Eucarioti) (Stevenson *et al.*, 2015). Mediante liofilizzazione si raggiungono livelli molto bassi di attività dell'acqua ($a_w = 0.10-0.25$), tali da inibire la crescita microbica o le reazioni di degradazione della matrice, abbattendo così il rischio di alterazione del prodotto. Tale processo di disidratazione consiste nella rimozione dell'acqua mediante sublimazione sotto vuoto del materiale preventivamente congelato. Il passaggio diretto dell'acqua da solido a vapore non provoca fenomeni di migrazione delle sostanze solubili; il prodotto conserva in tal modo la distribuzione originaria dei vari componenti. Grazie alla sua elevata porosità, il liofilizzato tende a reidratarsi rapidamente, riacquistando caratteristiche del tutto simili a quelle del prodotto fresco. Nel corso del processo, inoltre, la temperatura del prodotto viene mantenuta al di sotto dei livelli che possono favorire la degradazione di componenti termolabili oppure fenomeni di alterazione, quali l'imbrunimento non enzimatico, le reazioni enzimatiche, la denaturazione proteica e



Giorni	T di conservazione (°C)	3% acido citrico	pH al prelievo	g/L _{eq.} acido tartarico	°Bx
0	25	-	4.11	10.6	3.1
7	25	-	3.94	9.63	3.3
		+	3.71	-	3.4
	4	-	3.81	11.8	3.5
		+	2.95	-	5.5
14	25	-	3.97	13.8	3.3
		+	4.16	-	3.3
	4	-	4.31	8.62	3.3
		+	3.26	-	3.3
22	25	-	4.11	10.3	3.2
		+	4.09	-	3.3
	4	-	4.19	10.9	3.4
		+	4.14	-	3.5
51	25	-	3.58	11.91	3.3
		+	2.96	-	4.9
	4	-	4.04	10.7	3.4
		+	3.05	-	5.4

Tab. 4.1 - Monitoraggio nel tempo di pH, acidità libera, gradi Brix nel NopalGel estratto meccanicamente

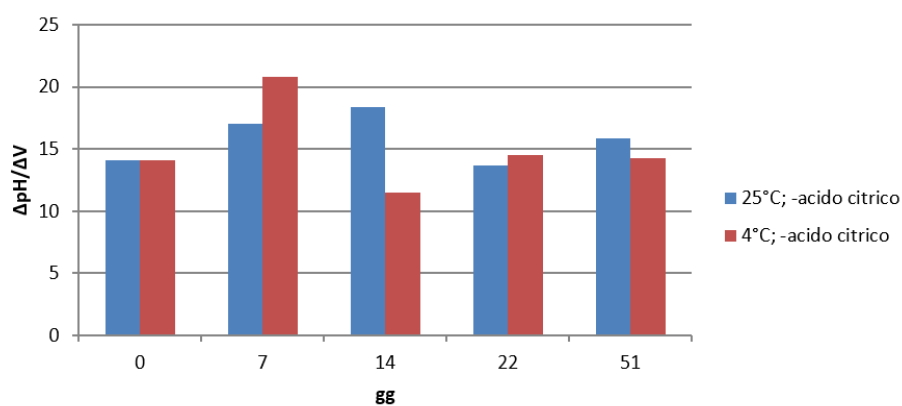


Fig. 4.1 - Andamento del potere tamponante (delta pH/delta V) della mucillagine nel corso della shelf life



la perdita di sostanze volatili. Tutto ciò rende la liofilizzazione un sistema ideale per una conservazione di lunga durata.

Un ciclo di liofilizzazione è costituito da 3 fasi successive: congelamento, essiccamento primario ed essiccamento secondario. Al termine del processo, che può durare anche alcuni giorni, in relazione alla quantità, alla natura ed alla geometria del substrato, si procede con la “rottura” del vuoto mediante l’utilizzo di un gas inerte (es. azoto) capace di permeare la superficie porosa del prodotto, proteggendolo dall’ossidazione. Infine, viene effettuata la chiusura e sigillatura dei contenitori (se il prodotto è stato liofilizzato nei contenitori finali), oppure la raccolta, macinazione e suddivisione del prodotto (se la liofilizzazione avviene in bulk). Il confezionamento può avvenire in gas inerte o sotto vuoto.

- **Liofilizzazione della mucillagine di *Opuntia ficus-indica***

- ▶ *Liofilizzazione da banco*

La liofilizzazione è stata ritenuta la tecnica più efficiente per le prestazioni e la qualità finale del risultato ottenuto, soprattutto per l’individuazione di un eventuale *scale up* per scopi industriali.

A tale scopo gli estratti di mucillagine ottenuti mediante estrazione in acqua e con estrazione meccanica, sono stati sottoposti ad un trattamento preliminare con il rotavapor (Tecnovetro R¹³⁴ a 1002 mbar) a 55 °C della durata di circa 2 ore per ogni 200 ml di campione, fino al raggiungimento di un volume di circa il 20% del valore iniziale. Questo trattamento ha avuto lo scopo di diminuire la quantità di acqua presente per velocizzare il successivo passaggio di liofilizzazione vera e propria. I campioni così ottenuti sono stati mantenuti a -20 °C per il tempo necessario, prima di essere sottoposti a liofilizzazione.

Nel lavoro preliminare è stato utilizzato un liofilizzatore 5 Pascal Lio5p DGT al fine di valutare le condizioni sperimentali e il prodotto sotto forma cristallina. Le condizioni a cui sono stati sottoposti i campioni sono di -50 °C e 14,785 mbar per la du-

rata di circa 48 ore. Il prodotto ottenuto è un liofilizzato bianco, mostrato in Fig. 4.2, che essendo privo di colore, non influisce sulle proprietà cromatiche nel caso di utilizzo nei beni culturali.



Fig. 4.2 - Prodotto liofilizzato dopo la rimozione della clorofilla come descritto nel capitolo 3

In Fig. 4.3 è riportato il peso di liofilizzato a partire da 100 ml di NopalGel estratto meccanicamente e per macerazione in acqua. Le quantità medie di liofilizzato superano i 2 g/100 ml di liofilizzato nel caso del campione estratto meccanicamente che risulta più efficiente in termini di resa rispetto al prodotto ottenuto per macerazione in acqua, anche in accordo con i risultati sui polisaccaridi totali riportati nel capitolo 3.

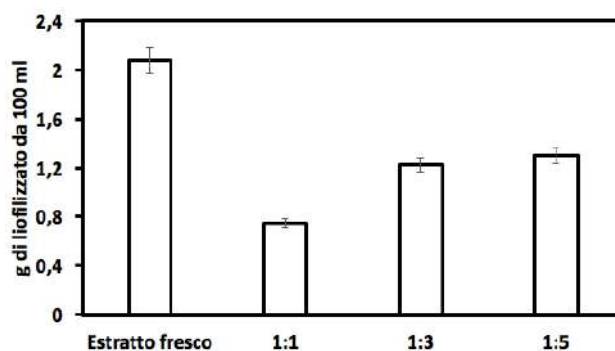


Fig. 4.3 - Resa in g del liofilizzato di mucillagine estratto meccanicamente o per macerazione in rapporto 1:1, 1:3, 1:5. Le barre indicano l'errore standard al 5% (Martina, 2018)

La resa in peso del prodotto finale liofilizzato è riportata anche come incremento in percentuale nei relativi campioni rispetto alla diluizione 1:1, riportata sulla linea dello zero (Fig. 4.4). Il processo meccanico consente di migliorare la resa di prodotto di circa il 170%, mentre la diluizione 1:5 di circa il 70%.



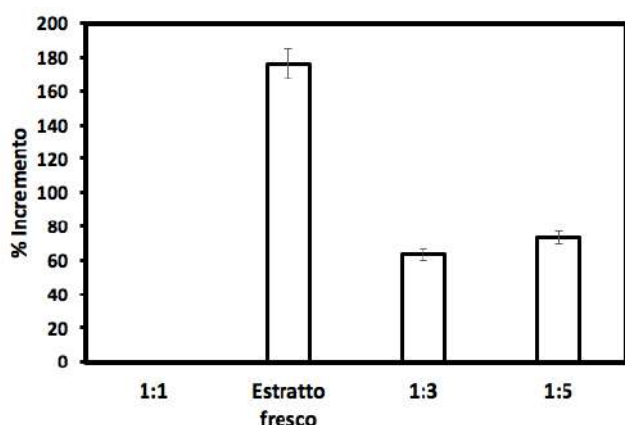


Fig. 4.4 - Incrementi di resa di prodotto liofilizzato tra diversi campioni ottenuti da matrice fresca. Sono rappresentati i valori medi di tre repliche; le barre indicano \pm D.S (Martina, 2018)

Al fine di determinare le caratteristiche morfologiche dei prodotti realizzati sono state condotte alcune osservazioni mediante l'utilizzo di un Microscopio Elettronico a Scansione (SEM) EVO MA15 nel Laboratorio Materiali e processi chimico-fisici presso il Centro Ricerche ENEA Casaccia. Prima dell'osservazione i campioni sono stati opportunamente preparati al fine di ridurre i fenomeni di caricamento, dovuti alla natura non conduttiva dei campioni, limitando la creazione di artefatti nelle immagini. Il campione è stato prima posto su un portacampioni di alluminio sul quale è stato inserito un adesivo conduttivo. Successivamente sul campione è stato evaporato uno strato di carbonio mediante un evaporatore della JEOL. Le osservazioni sono state condotte operando il SEM tra 10 e 20 kV. I campioni osservati, escluso quello prodotto mediante *spray dryer*, presentano morfologie simili ovvero in forma di sottili strati arrotolati in maniera casuale.

Nella Fig. 4.5 è riportata l'immagine al SEM relativa al liofilizzato. La struttura del prodotto si presenta eterogenea anche per la presenza di acqua non completamente rimossa dal processo.

► Scale-up: liofilizzazione pilota

Il processo di liofilizzazione della mucillagine di *Opuntia ficus-indica* è stato eseguito nel Laboratorio Bioprodotti e Bioprocessi del Centro Ricerche ENEA Trisaia utilizzando un liofilizzatore pilota Genesis Ultra 35ES (Virtis – SP Scientific, Gardiner

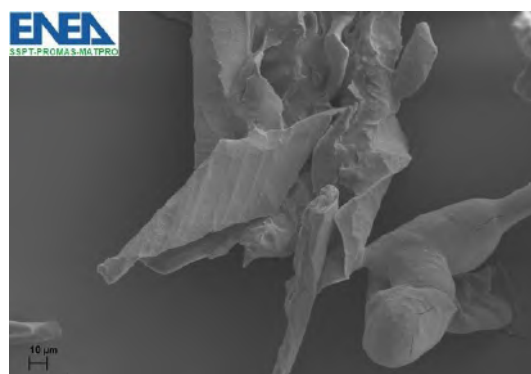


Fig. 4.5 - Immagine SEM del liofilizzato ottenuto con un liofilizzatore da banco

NY USA) con capacità di condensazione di 35 litri, temperatura di condensazione minima di -45°C , 7 ripiani, superficie evaporante di 9950 m^2 e sistema di *stoppering* automatico.

Le misure di a_w sono state eseguite mediante strumentazione Aqualab, Series 3TE (Decagon Devices, Pullman, WA, USA), ad alta accuratezza e risoluzione (di $\pm 0.003 a_w$ e $\pm 0.001 a_w$, rispettivamente), dotata di sistema di controllo della temperatura che consente di impostare e stabilizzare la temperatura di misura (tra 15 e 50°C).

La mucillagine, pervenuta al Centro ENEA Trisaia a temperatura ambiente in lattine da 20 e 10 litri per un totale di 150 litri, è stata congelata a -20°C ; una parte di questa è stata precedentemente posta in vaschette (massimo 400 ml, in spessore inferiore ai 2 cm) pronta per la successiva liofilizzazione. La mucillagine congelata in confezione originale è stata invece scongelata a 4°C per poterla trasferire nei vassoi (massimo 2-2.4 litri, in spessore inferiore ai 2 cm) da sottoporre a liofilizzazione.

La mucillagine, una volta congelata a -20°C , è stata caricata all'interno della camera di liofilizzazione in cui vengono introdotte 4 termocoppie all'interno del campione per il controllo della sua temperatura durante il processo, la camera è chiusa ermeticamente all'inizio del programma impostato. Il sistema impone un prevuoto di 500 mbar e funziona inizialmente da congelatore, portando la mucillagine a -30°C . Una volta che tutto il sistema ha raggiunto questa temperatura, si raf-



fredda il condensatore a $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ e si fa iniziare la fase di sublimazione mediante riscaldamento dei ripiani (secondo una rampa di temperatura a gradini) e condizioni di vuoto spinto (500 mTorr, corrispondenti a 0.7 mbar). La fase di desorbimento dell'acqua legata avviene abbassando ulteriormente la pressione fino a 150-100 mTorr (circa 0.3-0.1 mbar).



Fig. 4.6 - Omogeneizzazione del prodotto mediante trasferimento in busta dei liofilizzati dei 7 vassoi

Al termine di ogni ciclo, i liofilizzati di ciascun contenitore sono stati riuniti, dopo frantumazione, in un unico campione finale, allo scopo di assicurarne una buona rappresentatività (Fig. 4.6). Infine, aliquote di questo campione sono state conservate in due diversi tipi di confezionamento: buste speciali per sottovuoto e flaconi in vetro.

Per il confezionamento del liofilizzato in flaconi si è proceduto come segue. Dopo essere stati riempiti, i flaconi sono stati introdotti nuovamente nel liofilizzatore per una breve disidratazione a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ sottovuoto, alla fine della quale si è rotto il vuoto con azoto e proceduto allo *stoppering* automatico. I flaconi così chiusi sono stati sigillati con ghiera di alluminio.

Infine, dal momento che la fase acquosa, solidificata nel condensatore, presentava un lieve aroma caratteristico di fico d'India, ne sono state conservate diverse aliquote in flaconi per una successiva analisi.

Sulla base dell'esperienza acquisita nella liofilizzazione di cladodi e frutti di *Opuntia* in diverse forme (cladodi opportunamente macinati, frutti interi, macinati, con semi o senza semi) si è provveduto all'ottimizzazione del ciclo di processo. In tali condizioni operative (Tab. 4.2), un quantitativo massimo di mucillagine pari a 15 kg è stato liofilizzato in 5 giorni, ottenendo un prodotto che presenta una buona struttura porosa (cake), un'ottima reidratibilità, una percentuale media di liofilizzato di circa il 4% e valori di a_w di circa 0.25.

Congelamento	$-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 300 min
Drying	Temperatura: da $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$
	Vuoto: da 500 mTorr a 250 mTorr
	N° step: 7
	Tempo totale: 4680 min
Mantenimento	Temperatura: $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 1000 min
	Vuoto: 150-100 mTorr

Tab.4.2 - Condizioni operative di liofilizzazione della mucillagine di *Opuntia ficus-indica*

Dall'analisi della letteratura si può osservare come siano pochi i lavori circa la liofilizzazione della mucillagine derivante da *Opuntia ficus-indica*. Circa eventuali modifiche nelle caratteristiche antiossidanti e nel contenuto in composti bioattivi causate dal processo di essiccazione, Gouws *et al.*, (2019) hanno confrontato campioni di buccia e polpa di frutti di *Opuntia*, essiccati in diversa maniera (mediante liofilizzazione, forno, essiccatore commerciale e a microonde). I risultati mostrano come la liofilizzazione rappresenti la tecnica principe per la stabilizzazione dei composti fitochimici bioattivi, sebbene sia caratterizzata da alti costi di gestione, nonché di investimento. Circa gli effetti della liofilizzazione sulle proprietà di gel della mucillagine, non vi sono in letteratura lavori su *Opuntia ficus-indica*, ma ve ne sono alcuni su mucillagine estratta da semi di Chia (*Salvia hispanica*). Tali ricerche, condotte confrontando diverse tecniche di essiccazione (liofilizzazione, evaporatore rotante e forno), mostrano come la mucillagine liofiliz-



zata, una volta reidratata, presenti una migliore qualità del gel (Brütsch *et al.*, 2019).

I risultati ottenuti nel presente lavoro sono in linea con queste evidenze. Tuttavia, alcuni campioni confezionati sottovuoto in busta già dopo una decina di giorni hanno mostrato un cambiamento di colore, virando dal bianco-avorio iniziale ad un giallo-marrone, mentre tutti quelli confezionati in flaconi non hanno subito variazione di colore. Per studiare tale alterazione, le buste contenenti i campioni scuriti sono state aperte, riunite in un solo campione, aliquotate in flaconi di vetro e chiuse in atmosfera di azoto per le successive analisi (Fig. 4.7).



Fig. 4.7 - Liofilizzati: (A) appena confezionati in busta e flacone; (B) dopo conservazione in flaconi sottovuoto per 30 giorni

Anche se queste evidenze sembrano mostrare come la conservazione post-liofilizzazione sia fondamentale per la stabilità del prodotto, prove di liofilizzazione di mucillagine fresca di *Opuntia* mediante strumentazione da banco in condizioni non spinte hanno portato, invece, a prodotti stabili anche in assenza di azoto ed in confezioni non sottovuoto.

Alcuni campioni contenuti in differenti vassoi/vaschette hanno presentato una certa disomogeneità di colore, contenuto acquoso, viscosità e a volte un deposito verde scuro-nerastro; per tale motivo, i liofilizzati prodotti sono risultati diversi (Fig. 4.8) ed alcuni cicli di liofilizzazione hanno mostrato una percentuale di liofilizzato che si discosta molto dalla media del 4%.

I problemi riscontrati nella stabilità e disomoge-

neità possono essere causati da diversi fattori legati sia alla fase iniziale di estrazione della mucillagine, che alla sua conservazione post-estrattiva – quali parametri di estrazione non ottimali, temperature alte durante la fase di trasporto, condizioni particolari di pH ecc. – che hanno potuto causare fenomeni di alterazione e fermentazione della mucillagine.



Fig. 4.8 - Disomogeneità di alcuni campioni liofilizzati in vaschetta derivanti dalla stessa lattina da 20 litri di mucillagine

• Considerazioni finali

La liofilizzazione, come detto, consente di essiccare la mucillagine in condizioni blande che notoriamente non determinano alterazioni nel campione. Inoltre, il processo permette di recuperare dal condensatore la fase acquosa che è stata allontanata dal prodotto ed ivi solidificata: in tal modo è possibile ricostituire la mucillagine iniziale senza perdere sostanze che possono allontanarsi insieme all'acqua.

Parallelamente, la ricerca potrà essere indirizzata sulla possibile aggiunta di stabilizzanti o agenti di supporto alla mucillagine da liofilizzare, per ridurre i tempi di liofilizzazione ed ottenere un prodotto con *shelf life* accettabile e facilmente conservabile. La scelta dell'agente di supporto più opportuno verrà fatta sulla base della qualità dei liofilizzati ottenuti ed in funzione del loro utilizzo.

Si provvederà, infine, a studiare le cause del cambiamento di colore di alcuni campioni liofilizzati



(da bianco originale a giallo-marrone) e testarne l'efficienza in campo edile, laddove la componente anti-ossidante non sembra essere essenziale.

Utilizzo di Spray dryer e caratterizzazione del prodotto

Al fine di valutare se la tecnica dello *spray dryer* può essere un processo efficiente per la stabilizzazione del materiale, nel Laboratorio Bioprodotti e Bioprocessi una prova preliminare è stata condotta su mucillagine estratta da cladodi attraverso la spremitura meccanica (pressa manuale). Con una resa media del 32%, calcolata sul peso dei cladodi trattati, il NopalGel è stato caratterizzato per la quantità di solidi totali, e di gradi Brix (vedi capitolo 3). La prova è stata condotta con un atomizzatore a spruzzo da laboratorio (ICF di Maranello; vuoto: 75 mmCA; alimentazione campione: circa 1 ml/min; pompa peristaltica; temp ingresso: 79-80 °C, temp uscita: 56 °C; pressione aria compressa: inferiore a 0.5 bar) (Fig. 4.9 e Fig. 4.10).

Sono stati trattati circa 600 ml di mucillagine; il fattore critico è stata la temperatura, che può determinare la caramellazione del prodotto. Sono state pertanto ottenute due polveri una bianca simile al talco (Fig. 4.11b) e una caramellata, più scura (Fig. 4.11a) Quest'ultima è stata raccolta nella parte alta del raccoglitore (Fig. 4.10) In generale nell'esperimento si è osservata una perdita considerevole di polvere che è rimasta attaccata alle pareti del raccoglitore. Questo è dovuto in parte alle caratteristiche dello strumento utilizzato e in parte al tipo di materiale trattato, ricco di polisaccaridi. La resa pertanto non è stata considerata (da 600 ml di NopalGel sono stati ottenuti circa 2.62 g di polvere), tuttavia il materiale è

stato sufficiente per una prima caratterizzazione morfologica e chimica.



Fig. 4.9 - Spray dryer presso la hall tecnologica del Laboratorio Bioprodotti e Bioprocessi, ENEA Casaccia



Fig. 4.10 - Raccoglitore spray dryer in funzione



Fig. 4.11 - a) polvere caramellata raccolta in alto nel raccoglitore; b) polvere ottenuta a 100 °C

- **Caratterizzazione morfologica**

Nella Fig. 4.12 è visibile un'immagine SEM che mostra come i granuli di polvere ottenuti siano omogenei e di piccole dimensioni. La morfologia del campione prodotto mediante questa tecnica presenta una morfologia completamente differente rispetto ai campioni precedenti. I granuli si presentano in forma sferica e con dimensioni comprese nell'intervallo 0.5-15 micron. In pochi casi sono stati osservati degli aggregati di dimensioni superiori e di forma allungata. Il campione presenta una distribuzione granulometrica relativamente stretta e risulta omogeneo dal punto di vista morfologico.

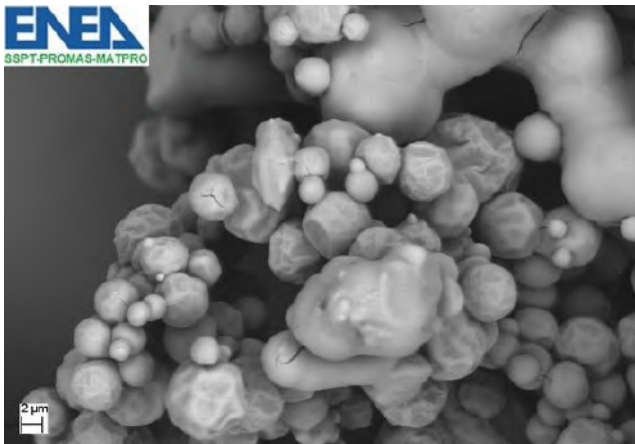


Fig. 4.12 - Immagine SEM della polvere ottenuta da spray dryer alla temperatura di 100 °C

- **Analisi di spettroscopia infrarossa**

L'effetto del diverso processo di disidratazione sulla mucillagine è stato studiato misurando gli spettri infrarossi di due campioni ottenuti attraverso lo stesso processo di macerazione ma sottoposti a disidratazione mediante liofilizzazione e *spray dryer*: i risultati sono riportati in Fig. 4.13. Il confronto fra gli spettri evidenzia differenze nella regione del fingerprint degli zuccheri; in particolare la larga banda costituita principalmente dai picchi centrati a 1043 cm^{-1} , 1073 cm^{-1} e 1118 cm^{-1} risulta molto più intensa nello spettro del campione ottenuto per *spray drying*, e inoltre compaiono due bande, una a 1404 cm^{-1} e una a circa 1707 cm^{-1} . Ciò è dovuto a differenze nei legami molecolari indotte dalle differenze di processo subite dai campioni la cui ricaduta in termini di funzionalità del prodotto deve essere attentamente valutata.

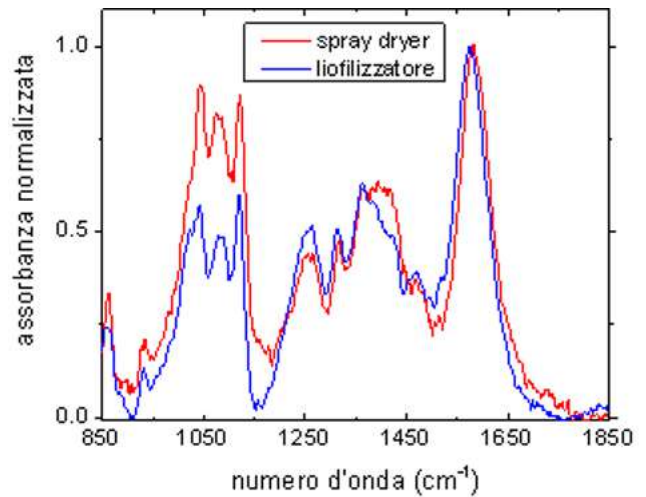


Fig. 4.13 - Spettri di assorbimento infrarosso di mucillagine disidratata mediante liofilizzazione e con spray dryer

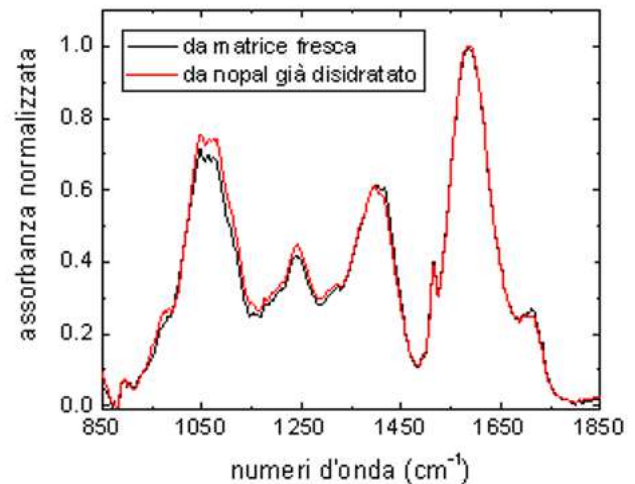


Fig. 4.14 - Spettri di assorbimento infrarosso di campioni di mucillagine fresca e di mucillagine ottenuta dalla reidratazione del prodotto precedentemente liofilizzato

La spettroscopia infrarossa è stata utilizzata anche per caratterizzare le mucillagini ottenute reidratando il NopalGel. A tal fine, sono stati misurati gli spettri di diverse repliche di campioni liofilizzati di mucillagini fresche e di mucillagini ricostituite a partire dal liofilizzato dell'estratto. Le misure, riportate in Fig. 4.14, hanno dimostrato che dal punto di vista dei legami chimici i prodotti liofilizzati ottenuti da matrice fresca o da liofilizzato sono molto simili, con variabilità minime tra repliche diverse. In particolare, i picchi attribuiti alla presenza di acidi uronici, responsabili della capa-



cità gelificante della mucillagine restano invariati, suggerendo che le componenti funzionali al miglioramento delle caratteristiche delle malte prodotte con l'additivo vegetale dovrebbero restare invariate sia usando una mucillagine fresca che utilizzandone una ottenuta dalla reidratazione di una liofilizzata.

Bibliografia

- N. Acevedo *et al.*, Water–solids interactions, matrix structural properties and the rate of non-enzymatic browning, *Journal of Food Engineering*, vol. 77, pp. 1108–1115, 2006
- A. Boutakiout *et al.*, Effects of different harvesting seasons on antioxidant activity and phenolic content of prickly pear cladode juice, *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* vol. 17, pp. 471–480, 2018
- L. Brüttsch, F. J. Stringer, S. Kuster, E. J. Windhaband, P. Fischer, Chia seed mucilage – a vegan thickener: isolation, tailoring viscoelasticity and rehydration, *Food and Function*, vol. 10, pp. 4854–4860, 2019
- M.F. Chaplin, Structure and properties of water in its various states, *Encyclopedia of Water: Science, Technology, and Society*, Ed. P. A. Maurice, Wiley, 2019
- C. Gouws, N. D'Cunha, E. Georgousopoulou, D. Mellor, N. Naumovski, The effect of different drying techniques on phytochemical content and in vitro antioxidant properties of Australian-grown prickly pears (*Opuntia ficus-indica*), *Journal of Food Processing and Preservation*, Doi:10.1111/jfpp.13900, 2019
- V. Martina, 2018. Tirocinio e Tesi Magistrale 'Valorizzazione di risorse biologiche da *Opuntia ficus -indica* (L.) Miller e sviluppo di prodotti innovativi bio-based.' (ENEA e Università Tor Vergata, Facoltà Biotecnologie industriali)
- O.F. Nielsen, M. Bilde, M. Frosch, Water activity, *Spectroscopy: An International Journal*, vol. 27, n.5-6, pp. 565–569, 2012
- J.A. Stevenson, J.P. Cray, R. Williams, R. Santos, R. Sahay, N. Neuenkirchen, C.D. McClure, I.R. Grant, J.D.R. Houghton, J.P. Quinn, D.J. Timson, S.V. Patil, R.S. Singhal, J. Antón, J. Dijksterhuis, A.D. Hocking, B. Lievens, D.EN. Rangel, M. A. Voytek, N. Gunde-Cimerman, A. Oren, K.N. Timmis, T.J. McGenity, J.E. Hallsworth, Is there a common water-activity limit for the three domains of life? *Int.Soc. Microbial Ecology J.*, vol. 9, pp. 1333–1351, 2015



5. Applicazioni sperimentali in laboratorio

di Franca Persia, Angelo Tati, Stefania D'Ottavio, Lorenza Cardone, Fabrizio Scognamiglio, Alejandro Meza Orozco, Daniele Mirabile, Loretta Bacchetta, Mirta Insaurralde, Vittorio Martina, Emanuel Bojorquez-Quintal, Chiara Alisi

Le applicazioni sperimentali nei laboratori del Centro Ricerche ENEA Casaccia sono state realizzate con l'obiettivo di verificare e quantificare, con la strumentazione disponibile, quanto la tradizione empirica messicana ha tramandato e cioè il miglioramento in termini di prestazioni e durabilità delle malte grazie all'utilizzo delle mucillagini estratte dall'*Opuntia ficus-indica* (Magaloni Kerpel D., 1990, Falcòn. *et al.*, 1990, Kita, 2013). A questo si è poi aggiunta la sperimentazione sugli estratti del *Capsicum* (peperoncino) con l'obiettivo di testarne le proprietà biocida. Le prove di laboratorio sono state effettuate come passo propeedeutico per applicare sia NopalGel che Nopal-Cap a casi studio reali che saranno poi descritti nel capitolo settimo.

Dovendo allestire le prime prove sperimentali, oltre a una accurata ricerca bibliografica, i cui risultati hanno mostrato soprattutto articoli in lingua spagnola, principalmente provenienti dal Messico, in collaborazione con i partner messicani abbiamo iniziato a verificare sperimentalmente le proprietà del NopalGel. Pertanto, nell'ambito del primo Progetto Bilaterale "Recupero di antiche tecnologie messicane per lo sviluppo di prodotti sostenibili per il restauro dei beni culturali", ci si è posti l'obiettivo di mettere a punto una metodologia per verificare sperimentalmente il miglioramento della durabilità nelle malte aeree studiando un "protocollo" che potesse essere replicato e diffuso anche nel settore italiano della conservazione. La letteratura scientifica (Cárdenas *et al.*, 1998, Majdoub *et al.*, 2010, Kita, 2013, Falcòn *et al.*, 1990) descrive come le mucillagini di *Opuntia ficus-indica*, mescolate nell'impasto delle malte, ne migliorano la plasticità grazie ai polisaccaridi, costituenti la mucillagine, che sono in grado di trattenere l'acqua più a lungo permettendo una

presa più lenta e una carbonatazione più uniforme, rendendo così la malta più compatta.

Le prove sperimentali sulle malte sono state condotte anche nel corso del secondo Progetto Bilaterale ("Realizzazione di biomateriali per il restauro sostenibile dei beni culturali attraverso la valorizzazione di specie vegetali multifunzionali: *Opuntia ficus-indica* e *Capsicum* spp"), in cui è stato introdotto il *Capsicum* come biocida, mescolato al NopalGel. Oltre alle applicazioni sulle malte aeree sono state trattate anche altre tipologie di materiali, quali malte idrauliche e terra cruda; sono stati realizzati provini per il consolidamento sia degli strati preparatori a base di carbonato di calcio delle tele per dipinti che test di consolidamento degli stucchi per lacune della pellicola pittorica. I risultati ottenuti sui campioni di malta preparati con gli estratti vegetali sono stati confrontati con quelli preparati con Primal, un consolidante organico di sintesi abitualmente utilizzato nel settore del restauro.

Per ampliare il campo sono state effettuate sperimentazioni di utilizzo di NopalGel su carte moderne e su film di amido termoplastico. Alcune delle sperimentazioni qui presentate sono state svolte nell'ambito di tesi di laurea e di dottorato. In appendice al presente volume sono riportati i nomi degli studenti e i titoli delle loro tesi.

Scelta dei test di qualificazione

Durante la fase di impostazione della ricerca ci siamo posti il problema di individuare una metodologia diagnostica in grado di verificare sui campioni di malta aerea l'effetto dell'aggiunta del NopalGel in termini di miglioramento delle capacità di adesione, di compattezza e quindi di durabilità. Il problema del deterioramento di un materiale in un bene culturale non è semplice per la complessità delle variabili che influiscono in maniera sinergica sul degrado e che sono dovute alle proprietà intrinseche dei materiali di partenza, alla tecnica di preparazione, all'esposizione alle variabili ambientali, alla tipologia e durata delle specifiche condizioni conservative e ad eventuali interventi



di restauro pregressi. Il bene culturale, per le sue caratteristiche materiche e di tecnica di esecuzione, costituisce quasi sempre un *unicum* e quindi non esiste un test diagnostico unico che in maniera diretta ne misuri lo stato di conservazione e ne preveda la durabilità. Per simulare le condizioni di stress dovute a variazioni di temperatura e/o umidità, esposizione alla luce solare e allo spray marino si è costretti a ricorrere agli invecchiamenti accelerati per variabili quali ad esempio temperatura, umidità relativa, spettro solare e/o spray marino. Le qualificazioni, in particolare per i nuovi prodotti che sono immessi sul mercato, si effettuano in senso comparativo tra un prodotto e l'altro dopo invecchiamento artificiale. Nelle nostre ricerche sono stati effettuati invecchiamenti accelerati per temperatura e umidità relativa in camera climatica Angelantoni ACS. Le condizioni dei diversi cicli sono state scelte sulla base delle normative ASTM e della nostra esperienza nella qualificazione di additivi per il restauro (Persia *et al.*, 2007); i test di valutazione, di seguito indicati, sono stati eseguiti prima e dopo ogni ciclo di invecchiamento.

Per valutare la compattezza dei provini è stata scelta una prova non distruttiva e non invasiva quale la misura della velocità di propagazione delle onde ultrasonore (Watanabe *et al.*, 2018; Calicchia *et al.*, 2020); la velocità con cui le onde ultrasonore attraversano un corpo varia in funzione delle sue caratteristiche elastiche e della sua densità e quindi le disomogeneità dovute a fessure, cavità, zone degradate, riducono la velocità di propagazione e attenuano il modulo del segnale ultrasonoro (Scognamiglio *et al.*, 2019). Pertanto, una elevata velocità di propagazione è correlata ad una buona compattezza e integrità interne e quindi si può immaginare una buona resistenza meccanica. Inoltre, impiegando il metodo proposto da Watanabe (Watanabe *et al.*, 2018) si è potuto misurare il modulo elastico dei materiali testati. La valutazione del miglioramento apportato dalla preparazione delle malte con NopalGel è stata possibile per confronto con malte preparate senza additivi o con additivi di sintesi. La misura della velocità ultrasonica è stata effettuata con

uno strumento ad ultrasuoni a bassa frequenza "Krautkramer USM 23 LF" con sonda a 50 kHz. Infine, i risultati ottenuti con le prove a ultrasuoni sono stati correlati ai risultati delle prove a compressione eseguite dai colleghi messicani. A supporto delle misure di velocità ultrasonora, per lo studio della struttura interna dei provini sono state effettuate radiografie con apparecchiatura Seifert ISOVOLT TITAN 160 M2 0.4-1.5.

Oltre al deterioramento strutturale, i beni culturali subiscono deterioramenti dell'aspetto esteriore; pertanto da un lato è importante la valutazione del cambiamento cromatico, dall'altra è necessario che interventi di restauro non apportino cambiamenti nell'aspetto del bene. Quindi è stata misurata la variazione cromatica dovuta all'aggiunta di mucillagini nelle malte tramite misure di colorimetria mediante lo spettrofotometro Minolta CM-525i e Teckon SP 820 λ riportando i risultati in coordinate cromatiche $L^* a^* b^*$ (luminosità, colore e saturazione) nello spazio cromatico CIE LAB.

Come accennato, oltre alle malte, sono state studiate applicazioni su beni diversi, in particolare, si è valutato l'uso di mucillagine per il consolidamento delle preparazioni di tele pittoriche, su cui sono stati verificati la morfologia, il grado di coesione e adesione e la bagnabilità. La morfologia dei campioni è stata studiata tramite microscopia ottica e con immagini al microscopio elettronico a scansione (SEM); sono stati eseguiti *peeling test* mediante strappo per gravità (applicando un peso noto a strisce di nastro adesivo) e misurando poi il peso del materiale rimosso con bilancia con precisione 10^{-5} g per misurare adesione e coesione degli strati pittorici alle tele; infine la bagnabilità è stata quantificata mediante misure di angolo di contatto.

Questo test viene effettuato depositando una goccia d'acqua di 5 μ l con una micropipetta sulla superficie del campione e quindi misurando l'angolo di contatto che si forma fra goccia e substrato attraverso l'analisi dell'immagine (usando il



software *ImageJ*¹⁾ al microscopio ottico. Si definiscono idrofobiche o idrofiliche superfici che hanno angoli di contatto rispettivamente maggiori o minori di 90°.

Sperimentazione su malte aeree

In accordo con i partner messicani, i provini sono stati preparati secondo la ricetta in uso nel settore del restauro utilizzando grassello di calce e polvere di marmo con granulometria fine in rapporto 1:2 con l'aggiunta di mucillagine di *Opuntia ficus-indica* (OFI) e testando diverse concentrazioni giungendo fino ad un massimo di 7.5 (w/v), in quanto si era notato, nelle prove preliminari, che a concentrazioni maggiori risultava difficile la lavorabilità e la consistenza raggiunta rendeva difficile il mescolamento (Fig. 5.1).

Il metodo di estrazione, caratterizzazione e conservazione del NopalGel e NopalCap sono stati descritti nei capitoli 3 e 4, mentre tutta la sperimentazione qui sinteticamente presentata è stata pubblicata in Persia *et al.*, 2016.

Brevemente si descrivono qui le caratteristiche e la procedura di preparazione dei campioni (6 campioni per ciascuna concentrazione):

- dimensioni 5x5x5 cm per effettuare i test con ultrasuoni;
- dimensioni 4x4x16 cm per effettuare prove di compressione (Norma UNE-EN 1015-11)²⁾. Solo i campioni di dimensione 4x4x16 sono stati sottoposti a prove di compressione dai colleghi messicani e sono stati confrontati con le misure ad US realizzate in ENEA sui campioni dello stesso tipo (Fig. 5.2);
- percentuali di mucillagine utilizzate: 0, 1.25,

2.5, 5 e 7.5 w/v;

- stagionatura dei campioni a temperatura ambiente per 30 giorni;
- invecchiamento in camera climatica per umidità e temperatura, alcuni solo per due cicli, gli altri per 3 cicli; il primo ciclo è stato condotto a temperatura costante di 23 °C e RH a 50% per una durata di 168 ore; il secondo e il terzo ciclo sono stati condotti secondo i grafici di Fig. 5.3.

Le misure ultrasoniche sono state eseguite con l'apparecchiatura mostrata in Fig. 5.4.



Fig. 5.1 - Preparazione dell'impasto con grassello di calce e polvere di marmo con l'aggiunta di NopalGel



Fig. 5.2 - Stagionatura dei campioni

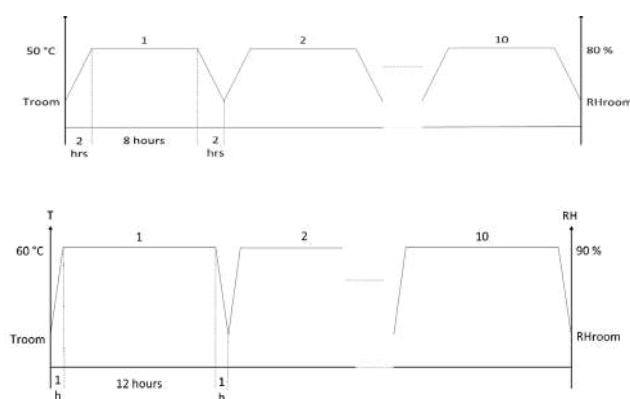


Fig. 5.3 - Condizioni del secondo e terzo invecchiamento

1 ImageJ: Cfr. W.S. Rasband, ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2011; ImageJ's plugin: LB-ADSA: Cfr. A.F. Stalder, G. Kulik, D. Sage, L. Barbieri.

2 Norma UNE-EN 1015-11:2000/A1:2007 Métodos de ensayo de los morteros para albañilería. Parte 11: Determinación de la resistencia a flexión y a compresión del mortero endurecido.





Fig. 5.4 - Misura US con sonda da 50 kHz

I risultati delle misure ultrasoniche, effettuate prima e dopo ogni ciclo di invecchiamento accelerato, hanno mostrato un incremento nella velocità in tutti i campioni addizionati con NopalGel come mostrato in Fig. 5.5; si può così ipotizzare che si abbia un miglioramento nella resistenza meccanica perché la velocità è correlata al modulo elastico, che indica quanto un materiale è deformabile e quindi quanto è resistente ad esempio alla fessurazione. Quindi, si può concludere che l'inclusione di NopalGel, rendendo più plastica la fase di lavorazione e favorendo la reazione di carbonatazione della calce, porti alla formazione di un prodotto più omogeneo e compatto. L'aumento maggiore di velocità è stato raggiunto con la concentrazione pari a 1.25, ma valori ad essa paragonabili sono stati evidenziati anche per le concentrazioni 2.5 e 5%. Il confronto tra i dati ottenuti sui campioni invecchiati, mostra inoltre che l'aggiunta di mucillagini di NopalGel permette di mantenere nel tempo le caratteristiche fisiche delle malte, migliorandone quindi la durabilità.

Un'ulteriore conferma dell'utilità dell'aggiunta di mucillagine, con una percentuale ottimale compresa tra 1.25 e 5%, viene anche dal confronto tra i risultati ottenuti dalle misure US con quelle dei test a compressione (confronto effettuato solo sui campioni invecchiati fino al secondo ciclo). I valori ottenuti con entrambe le tecniche (Fig. 5.6) indicano che si ottiene una maggiore resistenza (R_{ck}) alla compressione sui provini addizionati all'1.25%.

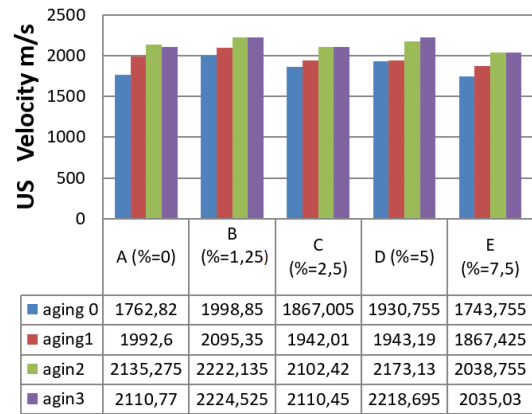


Fig. 5.5 - Velocità ultrasonora misurata in campioni senza NopalGel (A) e con differenti percentuali (B, C, D, E)

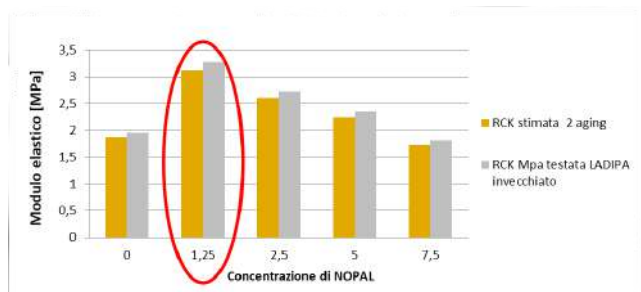


Fig. 5.6 - Valori della resistenza a compressione, R_{ck} , misurati con prove meccaniche e ricavati da misure di velocità US di provini di malte, al variare della concentrazione di NopalGel

La lettura delle radiografie digitali, interpretate attraverso le diverse gradazioni di toni di grigio che rappresentano l'assorbimento dei raggi proporzionale alla densità del campione attraversato, ha indicato che i provini preparati senza aggiunta di additivo mostrano una maggiore distribuzione di vuoti e porosità disomogenea, al contrario dei campioni preparati con NopalGel che appaiono più compatti e presentano solo piccole disomogeneità.

Le misure colorimetriche sui provini di malte aeree hanno mostrato che l'introduzione della mucillagine non ne altera sensibilmente il colore e, soprattutto, è stato verificato che la variazione di colore (ΔE) dei provini dopo i test di invecchiamento accelerato rimane sempre al di sotto del limite percepibile dall'occhio umano ($\Delta E < 4$).

Le prove di biorecettività sui provini di malta sono



state eseguite parallelamente alle misure fisico-meccaniche e saranno descritte nel capitolo 6.

I risultati complessivi di questa prima sperimentazione hanno fornito utili indicazioni sulle procedure da adottare nelle prove che si sono susseguite, in particolare per quanto riguarda la concentrazione ottimale di NopalGel da mescolare alla calce e/o ad altri prodotti in uso nel restauro.

Confronto con i risultati ottenuti con un consolidante sintetico (Primal)

Un confronto tra le mucillagini di *Opuntia* e il Primal, un prodotto commerciale di sintesi a base di una resina acrilica, usato nel settore del restauro come consolidante e nelle malte per migliorarne la resistenza meccanica, è stato effettuato preparando 6 campioni (dimensioni 5x5x5 cm) di malta aerea (con la medesima metodologia della precedente sperimentazione) in cui però la concentrazione dei due additivi è stata portata al 10%. Pur ritenendo tale valore eccessivo per applicazioni reali, lo si è scelto per poter confrontare la compattezza e l'omogeneità che sono state valutate con la radiografia. Un campione senza l'aggiunta dell'additivo è stato utilizzato come confronto. I risultati dei test a US e radiografici, così come le misure colorimetriche ottenute sui campioni di malte aeree preparate con NopalGel e Primal, sono molto simili, dimostrando la validità del prodotto vegetale studiato.

Sperimentazione con provini di malta idraulica

L'efficacia del NopalGel e del NopalCap è stata testata su malta idraulica, realizzando provini di 5x5x5 cm composti da calce idraulica (la tipologia di calce idraulica utilizzata è classificabile con la sigla NHL 3.5) e aggregati di granulometria fine (gli inerti utilizzati hanno una granulometria di 0.5-1 mm, composti da sabbia di fiume e polvere di marmo giallo Siena) in un rapporto di 1:2 (legante: aggregato). Di questi, una parte è stata realizzata con metodo tradizionale con solo legante, aggregati ed acqua, senza l'aggiunta di bioadditivo;

l'altra parte è stata realizzata aggiungendo all'interno dell'impasto il NopalGel al 3% e in un'altra frazione di campioni il NopalCap composto da mucillagine al 3% ed estratto di *Capsicum* all'1% del peso finale. La scelta della quantità percentuale di NopalGel e NopalCap aggiunta si è basata sui risultati ottenuti dalla precedente sperimentazione realizzata sulle malte aeree. Da notare che l'impasto con NopalCap, a differenza dell'impasto senza, richiede meno acqua per la preparazione grazie alle proprietà plastificanti che le conferisce la mucillagine OFI.

I campioni sono stati tenuti a stagionare per 28 giorni a temperatura ambiente (Fig. 5.7).

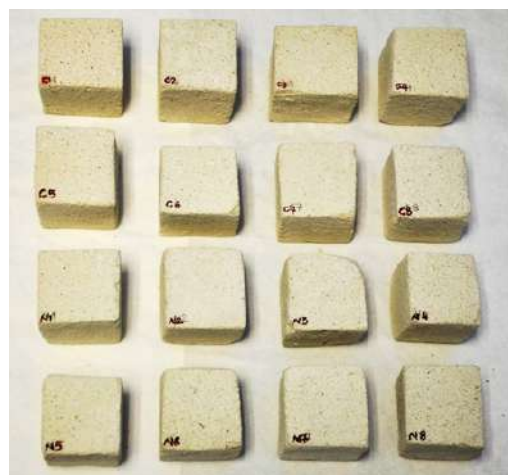


Fig. 5.7 Provini in malta realizzati con e senza additivo

I campioni di malta sono stati sottoposti a tre cicli di invecchiamento accelerato, ognuno con specifiche condizioni³. Le condizioni dei diversi cicli sono le stesse utilizzate nell'invecchiamento delle malte aeree (paragrafo precedente).

Le misure colorimetriche sui provini sono state effettuate con cinque misurazioni consecutive per ogni campione in modo da poter ricavare

3 Il primo ciclo è durato 168 h con condizioni fisse di T e RH (23 °C e RH a 50%). In seguito 20 cicli di 12 ore ciascuno con T pari a 60 °C e RH pari a 90%. F. Persia and R. Ponti (2007), Invecchiamenti accelerati in provini di terra cruda: durabilità dei materiali e problematiche legate alla simulazione delle condizioni reali di invecchiamento, in International Conference and Exhibition – CITTAM 2007 "STONE BUILDING between innovation and tradition", Napoli, 219-222.



una media finale di valori L^*a^*b da cui è stata poi calcolata la variazione cromatica assoluta ΔE ; tali misure sono state effettuate sui campioni prima e dopo l'invecchiamento artificiale. Dopo l'invecchiamento artificiale, il valore ΔE medio delle malte con NopalCap risulta essere inferiore (0.644) rispetto a quello relativo ai campioni realizzati con solo legante e aggregati (1.33). Tali risultati permettono di affermare che la mucillagine non apporta variazioni colorimetriche (sono percettibili dall'occhio umano variazioni cromatiche maggiori di 4).

I test agli ultrasuoni effettuati prima dell'invecchiamento artificiale hanno rilevato che i valori di densità e velocità sono molto simili tra i campioni di malta senza additivi e quelli addizionati con la mucillagine, mentre il valore complessivo del modulo elastico risulta essere leggermente inferiore nei provini con NopalCap. Dopo l'invecchiamento la densità risulta essere ancora simile tra i campioni preparati senza additivo e quelli con aggiunta di NopalGel, mentre si ricava una compattezza quasi inalterata dei campioni addizionati di NopalCap. Questi risultati sono stati ulteriormente confermati dalle radiografie X. In conclusione, i risultati complessivi confermano che l'aggiunta di NopalCap all'interno delle malte combina l'effetto positivo della mucillagine (che ne migliora le proprietà meccaniche agevolando la coesione tra le particelle e quindi la coesione della malta stessa) con quello dell'estratto di peperoncino (che rende la malta più resistente all'attacco dei biodeteriogeni, vedi capitolo 6 sulla biorecettività).

Sperimentazione per la valutazione delle proprietà consolidanti del NopalGel estratto e stabilizzato con differenti processi

A valle delle caratterizzazioni su malte realizzate con mucillagini fresche, sono stati caratterizzati anche campioni di malta additivati con bioprodotto disidratati, ottenuti da mucillagini estratte con tecniche diverse e ricostituite con acqua al momento dell'utilizzo.

I prodotti studiati sono stati (si vedano i capitoli

3 e 4 per i dettagli sui processi di produzione e stabilizzazione):

- mucillagine fresca da estrazione in acqua dopo macerazione (NopalGel);
- mucillagine liofilizzata (NopalGel liofilizzato) da prodotto fresco da estrazione in acqua;
- mucillagine ottenuta reidratando un estratto fresco (ottenuto meccanicamente con pressa manuale) essiccato con processo *spray dryer*.

La malta è stata preparata con grassello di calce invecchiato 24 mesi e polvere di marmo finissima in rapporto 1:2, l'additivo organico è stato aggiunto in concentrazione 2.5% (w/V) e in totale sono stati allestiti 40 campioni (10 per ciascuna tipologia di estrazione e 10 come controllo, senza additivo). La stagionatura è avvenuta per 28 giorni e le misure ultrasoniche sono state effettuate dopo 6 mesi dalla loro preparazione. L'elaborazione delle misure US ha evidenziato che la velocità media nei campioni con NopalGel e con NopalGel liofilizzato è maggiore del valore del controllo (preparato senza additivi) (Fig. 5.8), indicando una maggiore compattezza. Risultati analoghi si riscontrano nella valutazione del modulo elastico stimato (Fig. 5.9) che evidenzia come i campioni con NopalGel e con NopalGel liofilizzato risultano più resistenti del controllo e di quelli preparati con mucillagine proveniente dal processo con *spray dryer*.

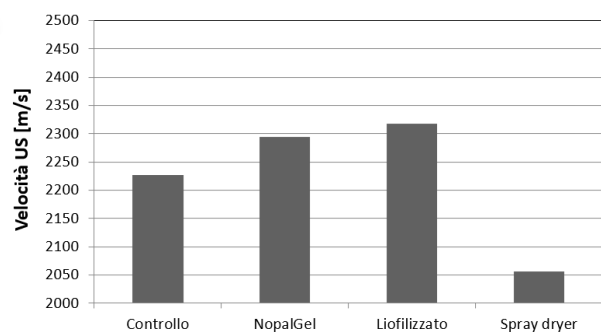


Fig. 5.8 - Velocità US (m/s) misurata nei campioni di malta preparati con mucillagine proveniente da diversi processi estrattivi



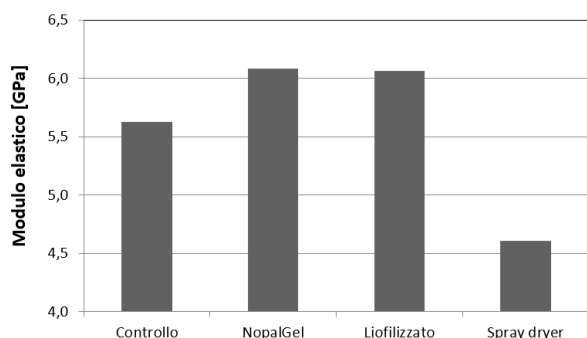


Fig. 5.9 - Modulo elastico stimato in base alle misure di velocità US effettuate sui diversi campioni di malta, preparati con differenti metodi estrattivi

Tali risultati indicano che il processo di estrazione migliore ai fini di un impiego nelle malte risulta quello per macerazione in acqua. In questo caso infatti solo le componenti idrosolubili sono presenti nell'estratto, che risulta anche privo di clorofilla. Di contro l'estrazione meccanica garantirebbe una resa in polisaccaridi superiore, ma l'estrazione di componenti come quelle pectiniche dello strato più superficiale del clorenchima e della clorofilla rendono il processo meno adatto, anche perché il prodotto necessiterebbe di un successivo passaggio di purificazione, con costi e tempi di lavorazione aggiuntivi. Infine, il trattamento con *spray dryer* sembra alterare la funzionalità del bioprodotto come additivo delle malte in quanto, una volta ricostituito, perde la sua viscosità; probabilmente le alte temperature del processo portano al deterioramento di alcune componenti o determinano la rottura delle catene polisaccaridiche. Quindi, si può concludere che la liofilizzazione, soprattutto se condotta su scala industriale (come discusso nel capitolo 4), può considerarsi il processo più idoneo per utilizzo nel settore dei beni culturali.

Sperimentazione su campioni di terra cruda

Nell'ambito della tesi di Vittorio Martina (2018) "Valorizzazione di risorse biologiche da *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller e sviluppo di prodotti innovativi *bio-based*", del corso laurea Magistrale in Biotecnologie Industriali (Macroarea di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali) dell'Università di Tor Vergata, sono state principalmente valutate le tecniche migliori di estrazione del NopalGel e

i fattori critici per uno *scale up* industriale (capitolo 3). Accanto a ciò sono state esaminate alcune caratteristiche di lavorabilità di malte aeree e pozzolaniche preparate con il NopalGel e alla luce dell'interesse della bioarchitettura per le costruzioni in terra cruda si è proceduto alla preparazione di campioni di terra cruda addizionata con mucillagine OFI.

L'uso di costruzioni in terra cruda è ancora oggi molto diffuso nel mondo e costituisce un patrimonio comune a molte nazioni tanto che il loro valore storico artistico risulta costituire circa il 20% della World Heritage List dell'Unesco.

La preparazione di mattoni in terra cruda è un processo elementare, accessibile, economico che impiega le risorse materiali locali, che presentano però variazioni nella costituzione della materia prima, costituita dall'argilla. Normalmente nel processo si richiede terra ricca in argilla, acqua e talvolta anche degli additivi che possono essere di diverso tipo come fibre animali, fibre vegetali, colle, olio o paglia. Questi hanno la funzione di contrastare il ritiro conseguente all'asciugatura che avviene dopo che i "mattoni" sono tolti dagli stampi e asciugati all'aria.



Fig. 5.10 - Campioni in terra cruda e paglia

Per la preparazione di un set di campioni (Fig. 5.10) si è utilizzata argilla reperita presso la cava Bernasconi in Umbria e paglia proveniente da un campo di grano tenero coltivato in Abruzzo, seguendo uno dei diversi metodi di preparazione riportati in letteratura, tutti però molto empirici. Preliminarmente alla preparazione dei provini con il bioadditivo, per testare il metodo di preparazione, sono stati allestiti provini di riferimento. La paglia è stata preventivamente sminuzzata e mescolata in quantità pari al 10% in peso, me-



scolandola a secco con la terra. Infine è stata aggiunta acqua fino ad ottenere un impasto plastico. Il composto è stato poi inserito negli stampi in uguale quantità e pressato manualmente. In seguito i campioni sono stati tolti dallo stampo e lasciati asciugare all'aria. Con questa metodologia sono stati allestiti poi i campioni con le mucillagini OFI (Fig. 5.10), aggiunte in concentrazioni pari al 2%, 5%, 10% e 20% (v/v).

Le mucillagini aggiunte sono state preparate mediante solubilizzazione dei liofilizzati di OFI ottenuti con estrazione tradizionale e attraverso un processo industriale, descritto nella tesi (Martina, 2018). Le misure di velocità US hanno permesso di ricavare il valore del modulo elastico, che per i campioni preparati con mucillagine risulta maggiore di quello ricavato su campioni preparati senza additivi. Il valore più alto del modulo elastico è stato ottenuto su provini con concentrazioni di NopaGel inferiori al 2%. Nel confronto il prodotto migliore risulta quello ottenuto per liofilizzazione di mucillagine estratta in acqua.

Sperimentazione per il consolidamento delle preparazioni pittoriche su tela

A fianco della attività prevalente sulle malte, sono state studiate le proprietà consolidanti della mucillagine di *Opuntia ficus-indica* nel restauro dei dipinti su tela e, più nello specifico, negli strati preparatori a base di carbonato di calcio.

I test di valutazione sono stati impostati in maniera comparativa con diversi consolidanti naturali, utilizzati frequentemente nelle pratiche di restauro. I prodotti per i trattamenti consolidanti richiedono una stabilità a lungo termine, per questo motivo si è ritenuto opportuno condurre test di invecchiamento artificiale per la valutazione delle proprietà richieste nel tempo. I prodotti scelti sono stati selezionati in base alla caratteristica di non tossicità per l'operatore e per l'ambiente circostante e sono stati applicati su una tela preparata *ad hoc* su cui, tramite invecchiamenti accelerati, si è indotto il degrado; l'allestimento delle prove ha quindi riguardato il tensionamento di

una tela di lino grezzo ad intreccio semplice, fitta e bilanciata (riduzione: trama 10, ordito 12), su un telaio in legno di pioppo di formato 30x50 cm². La preparazione della tela è stata scelta considerando una semplificazione delle preparazioni a base di carbonato di calcio su tela, maggiormente utilizzate tra 1800 e 1900 (Pugliese, 2006):

CaCO₃ + colla di coniglio + olio di lino cotto

Il legante è stato dato in percentuale minore rispetto alle pratiche abituali in modo tale da indurre il degrado più facilmente. La colla di coniglio è stata pertanto sciolta in acqua con rapporto 1:20⁴, poco più diluita rispetto al rapporto utilizzato comunemente nella preparazione delle tele (1:18). Il supporto è stato diviso in 60 quadrati di misura pari a 5x5 cm, per un totale di 60 aree di indagine, identificate con sistema alfanumerico (Fig. 5.11).



Fig. 5.11 - Fotografie in luce radente della superficie divisa in aree di indagine (a) e particolare della tela pre (b) e post (c) invecchiamento artificiale



- 4 La colla di coniglio in grani è stata posta in acqua demineralizzata per 24 ore; successivamente è stata riscaldata a bagnomaria fino all'ottenimento di una soluzione limpida; il carbonato di calcio è stato setacciato fino al raggiungimento di polveri fini, in appositi crivelli da 1-2 mm. La preparazione della miscela è stata effettuata a bagnomaria, in contenitori di vetro, ottenendo la naturale precipitazione dell'inerte nella colla, fino al punto di saturazione. Per rendere la miscela più elastica (e quindi adatta al supporto in tela di lino) è stato aggiunto olio di lino cotto all'1% v/v.



La tela – il nostro provino da consolidare – è stata poi sottoposta a tre diversi cicli di invecchiamento⁵ al fine di ottenere una superficie decoesa (Fig. 5.11) che potesse quanto più possibile avvicinarsi ad una situazione realistica di degrado. Temperatura e umidità relativa sono state fatte variare secondo quanto indicato in Fig. 5.12. Si è partiti da condizioni meno aggressive, per poter osservare l'evolversi del degrado.

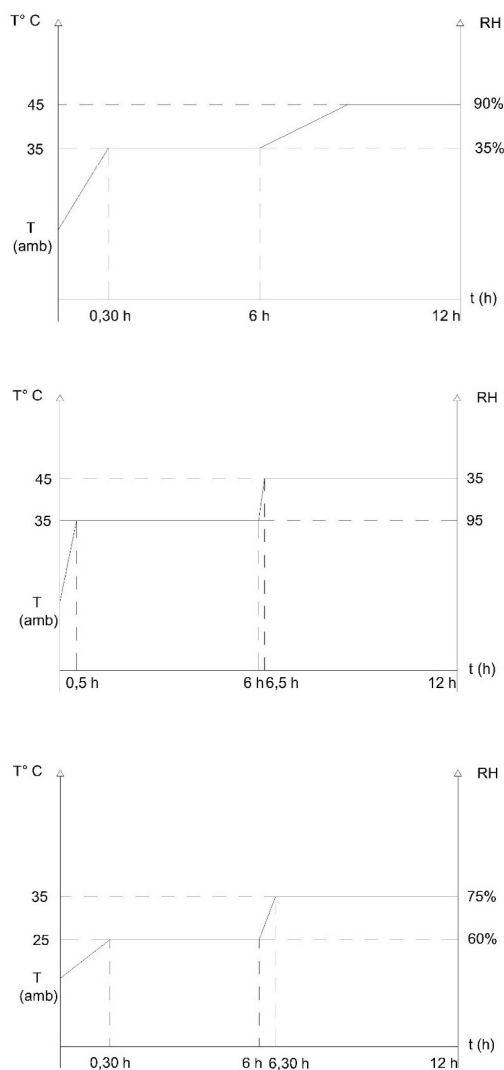


Fig. 5.12 - Schema dei cicli di invecchiamento

La scelta dei consolidanti da comparare con la mucillagine di *Opuntia* è stata effettuata valutando quelli solubili in acqua. Considerando la pre-

5 I processi di invecchiamento accelerati sono stati eseguiti da Alessandro Picca e Alessandro Zambotti presso i Laboratori del Centro Ricerche Casaccia ENEA.

	Prodotto	Classe di appartenenza
1	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Vegetale polisaccaride
2	<i>Funori</i>	
3	<i>Colla di pelli</i>	Animale proteica
4	<i>Colla di storione</i>	

Tab. 5.1 - Consolidanti presi in esame: di origine vegetale e animale

senza in commercio di una vasta scelta di prodotti, sono stati presi in considerazione quelli di facile reperimento presso ditte fornitrici di materiali per il restauro. Sono stati scelti consolidanti naturali, sia di origine vegetale che animale (Tab. 5.1).

Ogni prodotto è stato preparato secondo un diverso protocollo brevemente riassunto di seguito. I consolidanti scelti sono stati applicati in diverse percentuali, riportate in Tab. 5.2, al fine di valutarne le proprietà ottimali a seconda della concentrazione.

Opuntia ficus-indica

La mucillagine di OFI è stata estratta per macerazione in acqua in rapporto 1:1 (vedi capitolo 3).

Funori

Il Funori, costituito da un'alga secca, dopo la rimozione dei filamenti più scuri, è stato posto in acqua demineralizzata per 12h e successivamente riscaldato a bagnomaria fino all'ottenimento della mucillagine (Cross *et al.*, 2010). Quest'ultima è stata separata dalla matrice vegetale attraverso 3 fasi di filtrazione mediante un panno di cotone puro, precedentemente bagnato per impedire l'assorbimento della mucillagine.⁶

6 Il Funori è ricavato da tre tipi di alghe marine rosse della famiglia delle Rodoficee: la *Gloiopeltis tenax* (mafunori), la *Gloiopeltis complanata* (hana-funori) e la *Gloiopeltis furcata* (fukuro-funori); crescono lungo le coste del Giappone, della Corea, del sud della Cina e del Nord America. Le alghe sono polimeri naturali composti da più unità di monosaccaridi (zuccheri) che si ripetono; questi, chiamati funorani, variano in percentuale in funzione del tipo di alga utilizzato, del metodo di estrazione e anche da fattori stagionali (Swider *et al.*, 2005). Nonostante sia un polimero naturale, ricerche scientifiche condotte



Colla di pelli e colla di storione

Per le colle di origine animale, costituite anch'essa da un prodotto secco, si è proceduto all'immersione in acqua demineralizzata per 24h e successivamente al riscaldamento a bagnomaria fino all'ottenimento della completa soluzione. Infine le miscele sono state filtrate mediante panno di cotone puro per l'eliminazione di eventuali impurità⁷.

Affinché la soluzione consolidante impregnasse correttamente la superficie è stato ritenuto importante considerare sia le caratteristiche adesive

sul Funori evidenziano la sua scarsa attaccabilità da microrganismi e l'ottima stabilità chimica nel tempo (Finozzi et al., 2011). Le alghe vengono raccolte in Giappone nei mesi più caldi, accuratamente selezionate e asciugate sulla spiaggia. Successivamente vengono trasportate in laboratorio e messe a mollo in acqua, lavate, pressate e trasformate in strati sottili. Nella fase successiva i fogli vengono lavati e sbiancati in una soluzione diluita di perossido di sodio che fa virare il loro colore dal rosso al giallo-verde pallido. In seguito i fogli sono esposti al sole per l'essiccamento e stesi su stuoie di riso. Il suo utilizzo ha origini antiche in Giappone e spaziava dalla produzione della seta, al settore alimentare e tessile. Attualmente trova impiego come adesivo, addensante e detergente soprattutto nell'industria della seta e come consolidante di statue in legno dipinte o finite a lacca. Quando impiegata nella conservazione, l'alga viene prima sbiancata per eliminarne la caratteristica colorazione rossa. Come consolidante presenta una buona capacità di penetrazione bagnando facilmente la superficie. È completamente reversibile con acqua e possiede un pH neutro; è totalmente atossico e non allergenico.

- 7 Le colle animali sono dispersioni acquose colloidali derivanti da vari tessuti connettivi (pelli, cartilagini, ossa ecc.) e sono costituite principalmente da sostanze proteiche (in particolare da una proteina animale il collagene) e da quantità minori di sostanze non proteiche di origine sia organica che inorganica (sali ecc.). L'aspetto, la composizione chimica e le proprietà fisiche delle colle variano a seconda della provenienza, della preparazione e del processo di purificazione. Le qualità meno purificate sono chiamate comunemente colle forti, quelle più pure, gelatine (costituite quasi esclusivamente da collagene). Le soluzioni colloidali che formano le colle con l'acqua sono reversibili; una volta seccate (per evaporazione dell'acqua) mantengono le proprietà originali; possono quindi essere ridisciolte e, nel caso, riutilizzate. Le principali proprietà fisiche che hanno determinato nel tempo un impiego così diffuso delle colle animali, sono da ricercare soprattutto nelle loro spiccate qualità adesive e nella facilità di impiego. Il meccanismo di adesione delle colle animali, avviene attraverso due processi: l'evaporazione del solvente, nel caso specifico l'acqua, e il raffreddamento.

del prodotto applicato che il metodo di applicazione: la soluzione infatti fluisce per capillarità all'interno degli strati depositandosi in tutti gli spazi disponibili e pertanto, per evitare di creare accumuli altrimenti evidenti sullo strato pittorico, il consolidante deve essere steso in maniera più uniforme possibile. Nel caso in oggetto, la metodologia più adatta al consolidamento di una superficie morfologicamente non integra è risultata essere l'impregnazione dal retro del supporto, per evitare un'eventuale rimozione di particelle decoese dagli strati preparatori polverulenti. Il supporto è stato posto con la parte preparata verso il basso, su una superficie piana protetta da Melinex mono-siliconato disposto in modo da prevenire l'incollaggio degli strati preparatori sul piano da lavoro. L'applicazione delle soluzioni consolidanti è stata effettuata mediante l'utilizzo di spugne naturali⁸, che hanno permesso un'impregnazione omogeneamente diffusa del retro del supporto. Successivamente all'applicazione, il retro del supporto è stato "stirato" mediante l'utilizzo di un termocauterio, alla temperatura di 40-45 °C, con l'interposizione di spessori di carta assorbente⁹. Infine i provini sono stati lasciati sotto peso per il tempo necessario all'evaporazione dell'acqua, garantendo il mantenimento della planarità del supporto¹⁰. Le righe B-C-D, sono state dedicate al consolidamento con le diverse percentuali di NopalGel (Np); E ed F al Funori (Fn); G alla colla di pelli (CP); H alla colla di storione (CS) e la riga I è stata lasciata come riferimento.

Le concentrazioni sono state scelte sulla base di prove preliminari atte a identificare le percentuali

-
- 8 Ogni spugna è stata pretrattata mediante immersione prolungata in acqua demineralizzata, per l'eliminazione di eventuali sostanze estranee che avrebbero potuto interferire con l'operazione, e asciugata a temperatura ambiente.
- 9 Questa operazione è stata effettuata omogeneamente su tutte le aree di consolidamento per facilitare l'evaporazione dell'acqua e, allo stesso tempo, verificare l'avvenuto assorbimento dei consolidanti.
- 10 I vantaggi di questa metodologia sono stati la mancanza di contatto con la superficie polverulenta e una distribuzione sufficientemente uniforme e controllata, grazie alla capacità delle spugne di riassorbire facilmente quantità indesiderate di consolidante.



S.*	Cons.*	Solv.*	Conc.*	Rapporto	Metodo	N. Appl.	Tapp* (°C)
B2, B3 B4, B5	Np	Soluzione acquosa	1:1	Peso/ volume	Spugna naturale	3	20
C2, C3 C4, C5	Np	Soluzione acquosa	1:2	Peso/ volume	Spugna naturale	3	20
D2, D3 D4, D5	Np	Soluzione acquosa	1:4	Peso/ volume	Spugna naturale	3	20
E2, E3 E4, E5	Fn	Soluzione acquosa	1%	Peso/ volume	Spugna naturale	3	35
F2, F3 F4, F5	Fn	Soluzione acquosa	2%	Peso/ volume	Spugna naturale	3	35
G2, G3 G4, G5	CP	Soluzione acquosa	1:20	Peso/ volume	Spugna naturale	3	35
H2, H3 H4, H5	CS	Soluzione acquosa	1:22	Peso/ volume	Spugna naturale	3	35

Tab. 5.2 - Tipi di consolidanti applicati sui provini
*S., sigla del provino; Cons., consolidante; Solv., solvente; Conc., concentrazione;
Tapp, temperatura di applicazione

più adatte per ogni tipo di applicazione specifica¹¹. In Tab. 5.2 sono indicati i trattamenti effettuati.

Per valutare l'effetto dei trattamenti è stata condotta una seconda fase di invecchiamenti impostando valori di temperatura e umidità relativa tali da simulare le condizioni espositive museali (Fig. 5.13).

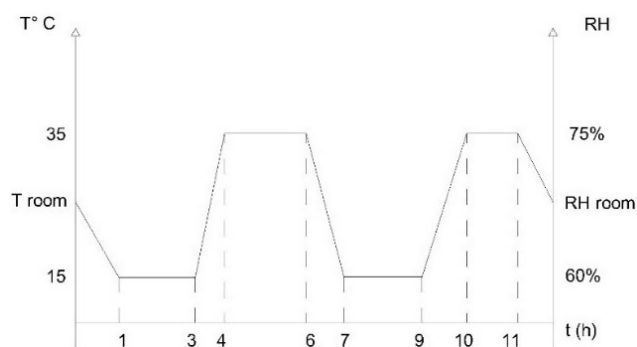


Fig. 5.13 - Invecchiamento termo-igrometrico finale.
30 cicli da 12h → 360h tot → 15gg

¹¹ Numerose fonti letterarie suggeriscono di impiegare soluzioni a concentrazioni molto basse per permettere al consolidante di entrare in profondità evitando depositi superficiali.

Le indagini diagnostiche, precedentemente descritte, sono state effettuate per valutare l'efficacia dei trattamenti e sono state eseguite sui provini nelle tre fasi sperimentali: prima e dopo il consolidamento e successivamente all'invecchiamento termo-igrometrico finale.

Risultati e discussione

Le misure colorimetriche non hanno evidenziato alterazione cromatica su tutte le aree della tela ($\Delta E < 4$) (Rotili, 2010), indicando una variazione non visibile ad occhio nudo. Le variazioni minori sono state riscontrate per il NopalGel 1:1 e per la colla di storione.

Il peeling-test ha permesso di evidenziare differenze nella capacità di adesione tra i quattro consolidanti (Tab. 5.3).

I risultati hanno indicato globalmente una maggiore coesione del materiale nei provini trattati con NopalGel 1:1 e con colla di storione. Il NopalGel in rapporto 1:2 e 1:4, non ha quasi apportato



Campione	Tipologia di campione	FASE 0 Materiale asportato (g)	FASE 1 Materiale asportato (g)	FASE 2 Materiale asportato (g)
B	NopalGel 1:1	0,0277	0.0004	0,0003
C	NopalGel 1:2	0,0017	0,0011	0,0008
D	NopalGel 1:4	0,0012	0,0010	0,0009
E	Funori 1%	0,0015	0,0021	0,0017
F	Funori 2%	0,0014	0,0017	0,0007
G	Colla di pelli 1:20	0,0009	0,0011	0,0027
H	Colla di storione 1:22	0,0012	0,0005	0,0005
I	Area non consolidata	0,0007	-	0,0037

Tab. 5.3 - Risultati peeling-test nelle 3 fasi sperimentali (il valore in G è il risultato della media di 4 "strappi" effettuati in aree diverse del provino)

modifiche alla coesione interna dei provini, probabilmente a causa di una diluizione troppo alta. Il Funori, in entrambe le percentuali, e la colla di pelli, hanno fornito i risultati peggiori, probabilmente derivanti dall'eccessivo apporto d'acqua agli strati preparatori. Il Funori ha presentato problematiche di penetrazione già in fase di applicazione; la colla di pelli ha parzialmente solubilizzato lo strato, probabilmente per la grande affinità con la colla di coniglio presente all'interno della formulazione dei provini.

Si può concludere che la mucillagine di *Opuntia ficus-indica* nella formulazione 1:1 ha prodotto risultati soddisfacenti sia nei test eseguiti dopo l'applicazione, che nelle indagini finali, post-invecchiamento; in particolare si è evidenziato un buon livello di coesione interna post-consolidamento e post-invecchiamento (Fig. 5.14).

La misura della bagnabilità delle superfici è stata valutata misurando l'angolo di contatto creato sulla superficie da una goccia di acqua. I risultati hanno evidenziato che quasi tutti i trattamenti consolidanti non hanno modificato il caratte-

re idrofobo delle superfici dei provini in fase 0 (Tab. 5.4).

Come atteso i provini I - non trattati - al termine dei cicli di invecchiamento accelerato hanno mostrato un aumento della bagnabilità; il comportamento migliore è stato riscontrato nei provini H (colla di storione), che hanno raggiunto un valore

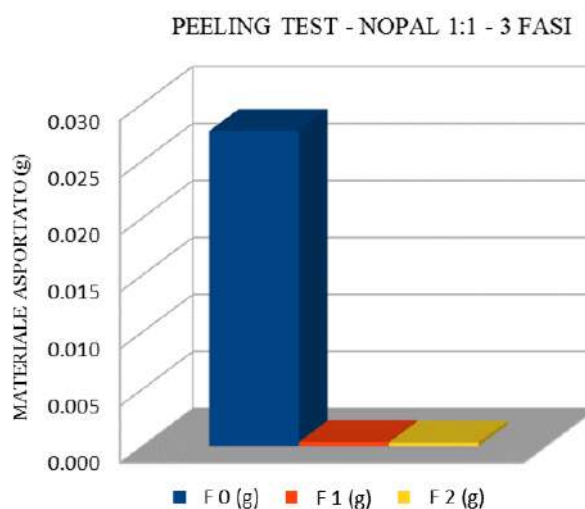


Fig. 5.14 - Il materiale prelevato (g) dai nastri adesivi risulta approssimabile allo 0, sia dopo il trattamento (Fase 1) che dopo l'invecchiamento artificiale (Fase 2)



S	FASE 0 - $\alpha 1$	FASE 1 - $\alpha 2$	FASE 2 - $\alpha 3$
B	116°	119°	102°
C	81°	103°	93°
D	117°	98°	99°
E	107°	103°	104°
F	105°	115°	97°
G	108°	106°	102°
H	120°	145°	115°
I	103°	---	88°

Tab. 5.4 - Risultati angolo di contatto nelle 3 fasi sperimentali

massimo dell'angolo di contatto pari a 145°, indice di idrofobicità; mentre i provini D (NopalGel 1:4) hanno evidenziato una superficie più idrofila dopo il trattamento.

L'invecchiamento dei campioni aveva provocato dei sollevamenti che dopo i trattamenti risultano di nuovo adesi perfettamente al supporto. Le superfici dei provini si mostrano perfettamente consolidate al tatto e non hanno subito modificazioni morfologiche riscontrabili al microscopio ottico e al SEM. Va considerato inoltre che tale consolidante è risultato avere buone possibilità di applicazione nel settore del restauro in quanto già nella fase di applicazione ha richiesto un apporto non eccessivo di acqua.

Sperimentazione sull'impiego della mucillagine di NopalGel come nuovo additivo per gli stucchi di natura carbonatica

Il presente paragrafo intende descrivere lo studio sull'utilizzo della mucillagine di *Opuntia ficus-indica* come additivo nella formulazione degli stucchi a base carbonatica. Saranno descritte le prove di stuccatura sperimentali che hanno fornito il presupposto per il *case-study* sul dipinto *Resurrezione* di Giulio Bargellini (capitolo 7).

Come già visto, la capacità di ritenzione idrica della mucillagine OFI previene la rapida essiccazione delle malte, aiutando a trattenere l'umidità necessaria che permette una omogenea distribuzio-

ne interna, rendendo possibile così una corretta messa in opera, evitando fessurazioni o cretture durante il processo di presa. Partendo da questa proprietà, ci si è posti l'obiettivo di ottimizzare la percentuale di mucillagine da aggiungere alla formulazione degli stucchi per il restauro, considerando la necessità di formulazioni elastiche, di semplice impiego e meno soggette a fessurazioni e ritiri che potrebbero compromettere la pellicola pittorica circostante.

Le prove di stuccatura sono state portate avanti in tre fasi consequenziali: la prima, con lo scopo di studiare il comportamento delle miscele; la seconda, per la definizione del giusto rapporto inerte/legante; la terza, per la scelta della percentuale di NopalGel più adatta nelle formulazioni.

Prima fase

La prima fase delle prove di stuccatura ha riguardato la realizzazione di 8 provini, 2 per ogni tipologia di campione preparato con le concentrazioni indicate in Fig. 5.15.

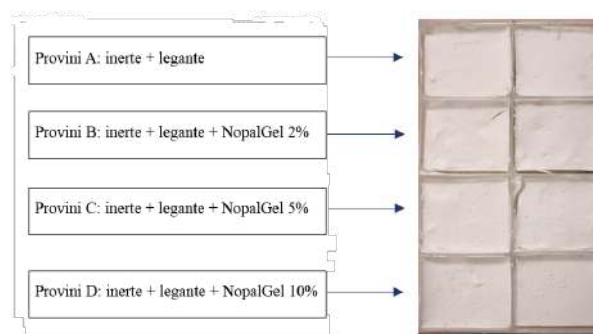


Fig. 5.15 - Prove di stuccatura - Prima fase



Per la preparazione dei campioni si è utilizzata la colla di storione, un consolidante di origine animale utilizzato nel restauro, che è stata rigonfiata e sciolta in acqua demineralizzata in rapporto 1:20¹². Il carbonato di calcio è stato setacciato 3 volte, in crivelli via via più piccoli (da 3 a 1 mm) ed è stato aggiunto alla colla calda in rapporto 1:1 p/v (100 g di CaCO₃, 100 ml di colla). Per i provini con l'aggiunta della mucillagine¹³ la miscela è stata precedentemente lasciata raffreddare fino alla temperatura ambiente.

Durante la preparazione si è osservato che l'aggiunta della mucillagine modificava istantaneamente le miscele B, C e D, che divenivano più fluide, più facilmente mescolabili rispetto al provino A (solo inerte + legante). Inoltre, la completa dispersione del carbonato di calcio risultava più semplice.

Porzioni delle miscele sono stati colati all'interno di contenitori in forma cubica, con lato di 4 cm, in modo da permettere le successive indagini agli ultrasuoni; le restanti parti sono state date a pennello su una tela di lino con preparazione industriale, per osservare le caratteristiche degli stucchi dopo l'asciugatura.

Risultati - fase 1

Al termine delle prime prove, risultava già chiaro che la concentrazione di NopalGel pari al 2% era quella che dava i risultati migliori. I campioni al 5 e al 10%, a parità di quantità di carbonato di calcio, risultavano, in termini di consistenza, trop-

po liquidi. L'eventuale aggiunta di carbonato per compensare la parte liquida avrebbe squilibrato il rapporto inerte/legante con la formazione di stucchi polverulenti e decoesi.

I provini C e D risultavano ancora fluidi dopo 48h; il provino A, non contenente NopalGel, risultava asciutto già dopo 24h; il provino B ha mostrato tempi più lunghi di asciugatura (48h) e ha dimostrato maggiore elasticità e semplicità nella lavorazione (Fig. 5.16).

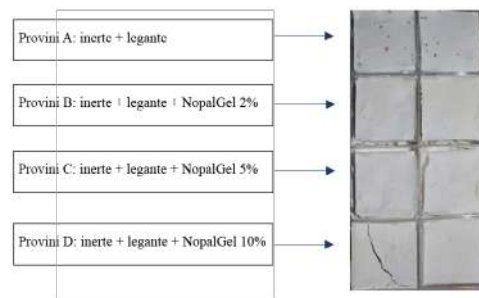


Fig. 5.16 - Prove di stuccatura - Prima fase - Insorgenza attacco biologico

Dopo 7 giorni, i provini sono stati osservati nuovamente: il contenitore dei provini è stato lasciato chiuso creando un microclima umido. Al termine della settimana, sul provino A era evidente l'insorgenza di un attacco biologico. Piccole macchie nere infatti, iniziavano a ricoprire la superficie esposta del provino (Fig. 5.17). L'elemento più significativo di questa fase è stata l'assenza di attacco biologico sui provini B, C e D. Inoltre, considerando che i provini giacevano tutti nel medesimo contenitore, la possibilità di contaminazione tramite spore risultava molto elevata. Si è potuta quindi ipotizzare l'assenza di biorecettività negli stucchi contenenti la mucillagine.

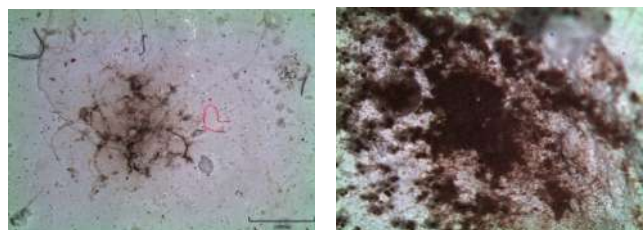


Fig. 5.17 - Attacco biologico su provini A

12 La colla di storione è stata preparata facendo rigonfiare parti del materiale secco in acqua (a freddo) per circa 24 ore. Per completare la solubilizzazione si è proseguito con un moderato riscaldamento a bagnomaria (60 °C ca.), senza raggiungere temperature prossime all'ebollizione per evitare l'azione denaturante del calore sulle proteine. Successivamente la soluzione è stata filtrata, attraverso un panno di cotone bagnato, per l'eliminazione delle impurità e dei residui solidi non disciolti.

13 La mucillagine di OFI è stata estratta ponendo cubetti di cladodo di 1 cm³ circa in acqua demineralizzata in rapporto 1:1 p/v per 24h, in accordo al metodo di estrazione tradizionale. Successivamente la mucillagine è stata separata dalla matrice vegetale mediante colatura per gravità attraverso crivelli.



Il contenitore è stato nuovamente chiuso ed osservato dopo 30 giorni e dopo 6 mesi: il provino A ha presentato un andamento crescente nel tempo della proliferazione fungina; i provini B, C e D hanno mantenuto lo stato iniziale senza proliferazioni (Tab. 5.5).

Nome	24h	48h	7gg	30gg	6m
A	-	-	+	++	++++
B	-	-	-	-	-
C	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-

Tab. 5.5 - Andamento della proliferazione fungina dei provini

Al termine delle prime fasi di prova, i risultati hanno confermato il miglioramento dell'elasticità e della lavorabilità e, allo stesso tempo, l'assenza di attacco biologico sugli stucchi con l'aggiunta della mucillagine.

Seconda fase

Una seconda fase di prova è stata effettuata considerando come parametro variabile la concentrazione di carbonato di calcio nella colla di storione, al fine di trovare il giusto rapporto tra i due composti; la verifica sperimentale di ciò è stata effettuata attraverso indagini agli ultrasuoni. In Tab. 5.6, sono descritte le preparazioni con la colla di storione (Cs) unita alle diverse percentuali di carbonato di calcio.

Nome	Preparazione
A-2	Cs 1:20 in acqua demin + 80% CaCO ₃ (80 g in 100 ml di colla) +1% Np
B-2	Cs 1:20 in acqua demin + 90% CaCO ₃ (90 g in 100 ml di colla) +1% Np
C-2	Cs 1:20 in acqua demin + 95% CaCO ₃ (95 g in 100 ml di colla) +1% Np
D-2	Cs 1:20 in acqua demin + 100% CaCO ₃ (100 g in 100 ml di colla) +1% Np

Tab. 5.6 - Prove di stuccatura - preparazione seconda fase

Risultati - fase 2

Gli stucchi sono apparsi tutti molto fluidi, facili da stendere soprattutto dopo l'aggiunta della mucillagine. Dopo 24h risultavano tutti asciutti, elastici, di facile lavorazione a bisturi e carte abrasive. Al termine dell'indagine lo stucco che è risultato più compatto è stato il D-2, ovvero quello composto dalla miscela contenente 100 g di carbonato di calcio (Fig. 5.18).

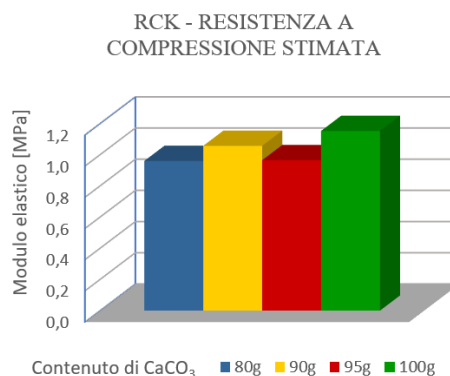


Fig. 5.18 - Resistenza a compressione stimata sui campioni preparati con diverso contenuto di CaCO₃

Terza fase

L'ultima fase di prova è stata messa a punto considerando l'insieme dei risultati raggiunti. I nuovi provini sono stati eseguiti aggiungendo la mucillagine in un range di concentrazione inferiore, dall'1 al 2% (Tab. 5.7).

I provini sono stati realizzati per gradi, aspettando una asciugatura omogenea dello strato sottostante, considerando la necessità di ottenere campioni di stucchi in forma cubica per le indagini agli ultrasuoni. Per permettere una migliore asciugatura sono state realizzate delle piccole cassettoni *ad hoc*, con regoli di legno, con dimensioni 4x4x2,5 cm³.

Al termine delle prove, nuovi test agli ultrasuoni sono stati eseguiti al fine di individuare la percentuale migliore di mucillagine per l'ottenimento di uno stucco compatto e, allo stesso tempo, col minor indice di ritiro percentuale possibile.



Nome	Preparazione	Dopo 24h	Dopo 48h
A-3	Cs 1:20 in H ₂ O demin. + CaCO ₃ 1:1 p/v	Secco	Meno elastico
B-3	Cs 1:20 in H ₂ O demin. + CaCO ₃ 1:1 p/v + 1% Np	Plasmabile	Elastico
C-3	Cs 1:20 in H ₂ O demin. + CaCO ₃ 1:1 p/v + 1,5% Np	Plasmabile	Elastico
D-3	Cs 1:20 in H ₂ O demin. + CaCO ₃ 1:1 p/v + 2% Np	Plasmabile	Elastico

Tab. 5.7 - Prove di stuccatura - preparazione e osservazioni - terza fase

Risultati - fase 3

I risultati dei test hanno evidenziato migliori caratteristiche in termini di compattezza dello stucco C-3, corrispondente alla concentrazione di mucilagine dell'1,5% (Fig. 5.19).

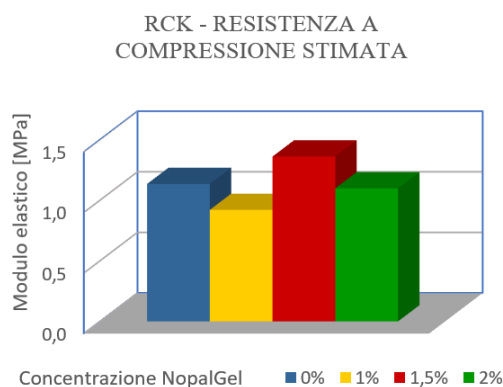


Fig. 5.19 - Resistenza a compressione stimata sui campioni preparati con diverse percentuali di NopalGel

La formulazione finale con caratteristiche migliori, derivante dalla analisi complessiva dei risultati diagnostici, risulta composta da 100 ml di colla di storione (1:20 in H₂O demineralizzata), 100 g di carbonato di calcio e l'aggiunta dell'1,5% (v/v) di NopalGel, (aggiunto alla miscela a temperatura ambiente).

In conclusione, il presente studio ha evidenziato che l'aggiunta di NopalGel alla formulazione degli stucchi permette di ottenere un impasto più fluido e più facilmente stendibile, inoltre, previene spaccature e fessurazioni e garantendo un minor ritiro percentuale preserva la pellicola pittorica.

Inoltre, la formulazione è risultata performante già durante l'applicazione. I risultati delle caratterizzazioni di laboratorio hanno aperto la strada dell'applicazione dello stucco nel *case-study* sul dipinto *Resurrezione* descritto in dettaglio nel capitolo 7.

Sperimentazione su carte moderne e biofilm

La tesi di Dottorato di Fabrizio Scognamiglio, "Cellulose Nanocrystals (NCC) from Cotton Waste & Mucilage and Fibres from *Opuntia ficus-indica* (OFI) - Extraction and Application in Paper and Thermoplastic Starch Films", svolta in stretta collaborazione tra l'Università di Camerino e l'ENEA, nell'ottica di trovare nuovi materiali compostabili in grado di sostituire le plastiche, ha riguardato la possibilità di riutilizzare biomasse di scarto, come lo sono i cladodi dell'*Opuntia ficus-indica*.

Pertanto la ricerca sperimentale ha mirato ad ottimizzare l'estrazione a basso costo di una sostanza pregiata, le mucillagini di *Opuntia ficus-indica*, in modo da introdurla in due materiali moderni, i film di amido termoplastico (Thermoplastic Starch Films - TPS) e la carta al fine di ottenere il miglioramento delle loro prestazioni. L'applicazione sulla carta (sia moderna che antica) è stata effettuata con la finalità di testare le proprietà consolidanti del NopalGel.

Per quanto riguarda l'applicazione del NopalGel nella fabbricazione della carta, il progetto ha ri-



guardato, prima di tutto, l'estrazione di mucillagini dai cladodi OFI. Sono stati adottati tre metodi: i) macerazione per 24 ore al buio, con rapporto 1:1 p/v tra materiale parenchimale e acqua distillata (MA); ii) miscelazione meccanica (ME); iii) estrazione meccanica a seguito di macerazione (MPM), che consente di utilizzare il più possibile il materiale parenchimale. Per ogni processo sono state eseguite diverse fasi di filtrazione, con *mesh* da 2 millimetri a 250 micron.

La seconda fase ha previsto l'effettuazione dell'analisi del Potenziale Zeta, ovvero la misura della stabilità di una dispersione e delle interazioni elettrostatiche. Questa misura, generalmente effettuata sulle carte per determinare la carica superficiale delle fibre e delle cariche organiche, permette di valutare variazioni del Potenziale Zeta a seguito dell'aggiunta di mucillagine OFI alla polpa di carta. Per ogni soluzione si è registrato un aumento in valore assoluto: questo risultato è stato ritenuto interessante al fine di utilizzare la mucillagine OFI in sostituzione della Carboxymethyl Cellulose (CMC), un efficace, ma costoso, additivo per la fabbricazione della carta.

Si è proceduto con l'introduzione della soluzione NopalGel nella polpa contenente gli additivi *Kymene™*, implementando così le caratteristiche della carta (ad esempio la resistenza della carta in condizioni ambientali sia umide che secche, la ritenzione e il drenaggio di acqua e una migliore lavorabilità). Le aggiunte di NopalGel sono state effettuate fino a raggiungere un valore predefinito di Potenziale Zeta; le fasi successive sono state la formazione del foglio di carta e la sua caratterizzazione meccanica (*Double Fold Test*).

Oltre alla sperimentazione del NopalGel come additivo organico nella produzione di carte, è stata studiata la possibilità di utilizzare la mucillagine vegetale su carta già preparata. Sono stati studiati due diversi tipi di supporti in carta, uno precedentemente impregnato di Poly(VinylAlcohol) (PVA) e uno non trattato. I due campioni di carta sono stati immersi in mucillagine OFI riscaldando a 60 °C, e quindi essiccati in un forno a 105 °C per 1 minuto; i

risultati sulle proprietà sono stati valutati mediante caratterizzazione meccanica (*Double Fold Test*) e morfologica (microscopia ottica). Mentre i risultati della caratterizzazione con il *Double Fold Test* hanno dimostrato che l'impregnazione della carta con mucillagine di NopalGel ne peggiora le qualità meccaniche, è stato evidenziato sulla carta senza additivi un incremento della coesione delle fibre, valutato al microscopio ottico. Questo risultato è stato ritenuto interessante per indagare l'applicazione di NopalGel (portato a pH neutro) per il restauro di carte antiche, in modo da sostituire il polivinilacetato, un composto di sintesi organica utilizzato attualmente in questo settore.

Per quanto riguarda l'applicazione di NopalGel come riempitivo di Thermoplastic Starch Films (TPS), le procedure sperimentali svolte hanno riguardato: l'autoproduzione di diversi compositi a base di amido, originati da tre diversi tipi di amido comunemente disponibili (patata, mais e riso) e con un contenuto variabile di glicerolo, al fine di selezionare la formulazione e la procedura più appropriate. La scelta è caduta su un film TPS a base di fecola di patate, con un alto contenuto di glicerolo (circa 30%).

In tutti i casi, il pH della mucillagine estratta era nella regione di 4.7, senza variazioni significative. Come previsto, il suo comportamento era quello di un fluido non newtoniano ed è stata misurata la viscosità della soluzione, producendo risultati nella regione di 10 cps per l'estrazione MA, 150 cps per l'estrazione MPM e 220 cps per l'estrazione ME.

La fase successiva è stata l'introduzione della mucillagine OFI nella matrice TPS, ottenendo tre diversi film di mucillagine TPS-Nopal [spessore (mm): TPS - $0,125 \pm 0,015$; MA - $0,150 \pm 0,009$; ME - $0,145 \pm 0,01$; MPM - $0,139 \pm 0,008$].

Con la finalità di valutare il miglioramento delle prestazioni, sono stati confrontati i film TPS tal quali e quelli contenenti la mucillagine OFI; le misure effettuate hanno coinvolto diversi metodi di analisi: Microscopia Ottica (OM) e Microscopio



pia Elettronica a Scansione (SEM) delle pellicole tal quali, per valutarne la morfologia, e in seguito prove di trazione, per studiare la superficie di frattura; analisi qualitativa degli elementi presenti sulla superficie mediante spettrometria a raggi X a dispersione di energia (EDS); prove di trazione utilizzando provini ad “osso di cane” di lunghezza pari a 40 mm; calorimetria differenziale a scansione (DSC) per valutare l’evoluzione del comportamento dei film con la temperatura.

Con l’idea di ottenere un riciclo completo dei rifiuti OFI, la seconda fase dello studio sulle mucillagini OFI si è concentrata anche sull’utilizzo di fibre secche per rinforzare i film TPS.

Il primo step è stato il pretrattamento delle fibre OFI provenienti da scarti di giardino, con azioni di pulizia, taglio, sonicazione, essiccazione e macinazione.

Le dimensioni finali delle fibre ottenute non erano superiori a 1 mm di lunghezza, e con *aspect ratio* molto variabili, da circa 1, ad altri compresi tra 10 e 20 mm.

Poi è stata effettuata l’introduzione delle fibre secche di *Opuntia ficus-indica* nella matrice TPS, producendo tre tipi di TPS-NopalFibersFilms: i) composito A, con una quantità di fibre pari al 16% in peso del contenuto totale di amido e glicerolo, ottenuto dopo agitazione di 1 ora; ii) composito B, con una quantità di fibre pari al 16% in peso del contenuto totale di amido + glicerolo, ottenuto dopo un’agitazione di 5 ore per aumentare l’omogeneità; iii) composito C, prodotto come il composito A, ma con una quantità di fibre pari all’8% in peso del contenuto totale di amido + glicerolo [spessore (mm): TPS - $0,125 \pm 0,015$; A - $0,157 \pm 0,013$; B - $0,438 \pm 0,035$; C - $0,156 \pm 0,008$.

Anche qui il confronto tra TPS Film tal quali e dopo l’introduzione delle fibre secche OFI, al fine di valutarne il miglioramento delle prestazioni, ha coinvolto diversi metodi di analisi: OM e SEM; analisi SEM-EDS; prove di trazione utilizzando provini ad “osso di cane” di lunghezza pari a

37 mm; DSC.

I risultati delle misure di trazione indicano una grande variabilità tra i campioni, attribuibile però al TPS che mostra lo stesso comportamento anche nel campione senza additivo. È evidente però che la mucillagine consente di ottenere un aumento sostanziale dell’allungamento finale dei film.

Esaminando la morfologia delle zone di frattura, risulta che il TPS ha un comportamento fragile, presentando una linea netta di frattura, rispetto ai film con mucillagine OFI, che evidenziano lesioni meno profonde.

Osservando i bordi dopo la frattura da trazione, possiamo vedere che solo la pellicola MPM non mostra alcun segno di fibrillazione.

Per quanto riguarda i risultati ottenuti mediante DSC, l’inserimento di mucillagine OFI nel caso dei film ME, sembra spostare le alterazioni del materiale verso temperature più elevate il che, in linea di principio, estenderebbe l’usabilità del materiale; è necessario però tenere conto delle sue prestazioni meccaniche, che presentano dei limiti. Meno significative sono le differenze ottenute nei casi di altri blended film, MA e MPM.

Le immagini SEM delle superfici dei film hanno evidenziato una minore fragilità dei film con aggiunta di fibre di OFI rispetto a quelli TPS puri. Per quanto riguarda invece il film ME, l’evidente presenza di bolle d’aria e l’irregolarità della superficie suggerisce una forte presenza di difetti che possono spiegare le scarse prestazioni meccaniche di questo film. Un’ottimizzazione dei processi di deposizione potrebbe portare all’eliminazione di questi difetti e all’ottenimento di film con caratteristiche meccaniche superiori.

L’analisi EDS ha evidenziato la varietà di sali inorganici presenti in questo materiale vegetale. In particolare, i film MA hanno mostrato in alcune zone la presenza di potassio, zolfo, ossigeno, magnesio, alluminio, calcio e cloro, mentre in altre sono presenti potassio, carbonio, ossigeno, cloro,



magnesio e tracce di alluminio e silicio. Gli stessi elementi sono presenti nei film ME e MPM, anche se in questo è possibile osservare la presenza di differenti morfologie, in particolare a “fiore” che potrebbero essere correlate alla presenza di calcite nella mucillagine OFI. Un'altra evidenza della presenza di questo sale è stata data dalle micrografie ottiche dei campioni di mucillagine essiccata, con strutture tridimensionali molto regolari di tipo dendritico.

Circa l'introduzione di fibre OFI nei film TPS, un'osservazione qualitativa dell'aspetto dei campioni prima e dopo l'analisi DSC consente di valutare che, mentre per gli altri campioni si hanno importanti variazioni di colore dovute alla temperatura, meno evidenti sono state le variazioni nel caso del composito B. Per questo composito, il diagramma calorimetrico di flusso termico mostra un aumento della temperatura di fusione, aumento non presente per gli altri materiali.

Per quanto riguarda la caratterizzazione della trazione, i risultati hanno mostrato una notevole diminuzione in termini di massima sollecitazione oltre che massima deformazione per tutti i compositi rispetto al TPS puro. Ciò può essere attribuito alla distribuzione casuale e alla grande dispersione dimensionale delle fibre OFI nei film.

Per quanto riguarda le superfici di frattura tutti i compositi con NopalGel mostrano fratture trasversali prima del cedimento generatesi durante l'allungamento rispetto a quella del TPS che invece si presenta netta.

Per quanto riguarda il SEM, le immagini hanno sottolineato che, rispetto al TPS tal quale, i compositi mostrano una maggiore porosità. La superficie composita più compatta è riscontrabile dal composito B.

Anche qui l'analisi EDS ha evidenziato la presenza di depositi salini sulla superficie, in particolare contenenti calcio, alluminio, silicio, potassio e ferro.

In generale, per quanto riguarda l'utilizzo del NopalGel nel campo dei biocompositi, i limiti osservati sono il fatto che la produzione di film blend non era sufficiente a migliorare la resistenza meccanica del TPS, come si può vedere dalla riduzione dello stress di trazione e sforzo.

D'altra parte, il metodo di estrazione MPM ha offerto un notevole allungamento, superiore rispetto a quello del TPS puro, mentre l'inserimento di una notevole quantità di fibre ha comportato un miglioramento della temperatura di fusione rispetto al TPS nudo (Scognamiglio *et al.*, 2019; Scognamiglio *et al.*, 2020).



Bibliografia

Calicchia, P., Colao, F., Capitani, D., De Simone, S., Di Tullio, V., Luvidi, L., Prestileo, F., Romani, M., Tati, A., Proietti, N., Reliefs of moisture infiltration in the apse of the church of San Nicola in Carcere during the restoration work, *Proceedings of the 1st conference: Rome, 30 September 2019*, DTC Lazio, *Distretto tecnologico beni e attività culturali, Centro di Eccellenza, Studia Archaeologica* 236, L'Erma di Bretschneider, pp. 149-151, 2020, ISBN 978-88-9131-970-8, ISSN 0081-6299

D. Magaloni Kerpel, Metodología para el análisis de Técnica Pictórica Mural Prehispánica: el templo Rojo de Cacaxtala, *Tesis de Licenciatura en Restauración*, ENCRyM-INAH, 1990

T. Falcòn, D. Magaloni, *En torno a la conservaciòn de la pintura mural prehispànica*, ENCRM-INAH, 1990

Y. Kita, The functions of vegetable mucilage in lime and earth mortars - A review, *3rd Historic Mortars Conference*, 11-14, Glasgow, Scotland, 1-6, September 2013

Cárdenas, W.M. Arguelles, F.M. Goycoolea, On the possible role of *Opuntia ficus-indica* mucilage in lime mortar performance in the protection of historical buildings, *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 3, 1998

H. Majdoub, L. Picton, D. Le Cerf, S. Roudesli, Water Retention Capacity of Polysaccharides from Prickly Pear Nopals of *Opuntia ficus-indica* and *Opuntia Litoralis*: Physical-Chemical Approach, *Journal of Polymers and the Environment*, 18(4): 451-458, 2010

F. Persia, R. Ponti, Invecchiamenti accelerati in provini di terra cruda: durabilità dei materiali e problematiche legate alla simulazione delle condizioni reali di invecchiamento, *International Conference and Exhibition – CITTAM 2007 STONE BUILDING between innovation and tradition*, Napoli, 219-222, 2007

S. Watanabe, K. Hishikawa, K. Kamae, S. Namiki, Study on estimation of compressive strength of concrete in structure using ultrasonic method. *Jpn Architect Rev.*, 2018, no. 1, pp. 1-9
<https://doi.org/10.1002/2475-8876.100910.1002/2475-8876.1009>

F. Persia, C. Alisi, L. Bacchetta, E. Bojorquez, C. Colantonio, M. Falconieri, M. Insaurrealde, A. MezaOrozco, A.R. Sprocati, A. Tati, Nopal as organic additive for bio-compatible and eco-sustainable lime mortars. *Proceedings of VIIIth International Conference "Diagnosis, Conservation and Valorization of Cultural Heritage"*, Naples, Italy, 15-16 December 2016; pp. 245-251, ISBN: 978-88-942118-0-1

Martina V. "Valorizzazione di risorse biologiche da *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller e sviluppo di prodotti innovativi *bio-based*", tesi sperimentale del Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Industriali nella Macroarea di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali presso università di Roma Tor Vergata

Scognamiglio, F., Mirabile Gattia, D., Roselli, G., Persia, F., De Angelis, U., Santulli, C., Thermoplastic starch films added with dry nopal(*Opuntia ficus-indica*) fibers, (2019) *Fibers*, 7 (11), 10 p.]

Scognamiglio, F., Mirabile Gattia, D., Roselli, G., Persia, F., Angelis, U., Santulli, C., Thermoplastic starch (TPS) films added with mucilage from *Opuntia ficus-indica*: *Mechanical, microstructural and thermal characterization*, *Materials* 2020, 13(4), 1000; <https://doi.org/10.3390/ma13041000>



6. La biorecettività dei materiali trattati con NopalGel e NopalCap

di Chiara Alisi, Lorenza Cardone, Paola Prudentino, Annarosa Sprocati

Il termine “biorecettività” coniato da Guillitte nel 1995 (Guillitte, 1995) è definito come “la suscettibilità di un materiale a essere colonizzato da uno o più organismi, senza subire necessariamente biodeterioramento”. Molti materiali sono esposti alla colonizzazione da parte di organismi viventi, il che può alterarne le proprietà fisico-chimiche. In alcuni casi, queste trasformazioni possono essere viste come un processo necessario e positivo; tuttavia, quando accade su beni artistici, tali fenomeni sono percepiti come processi negativi e/o distruttivi, sia dal punto di vista storico-culturale sia da quello economico. La composizione chimica e mineralogica, la rugosità e la porosità sono gli aspetti che maggiormente influenzano la colonizzazione di un materiale. Il potenziale di colonizzazione è quindi intrinseco al materiale ed è influenzato dalle condizioni ambientali a cui è esposto. Gli studi sulla biorecettività dei materiali sono di grande importanza per capire quali fattori influenzano lo sviluppo della colonizzazione biologica e possono aiutare a selezionare i materiali più appropriati da utilizzare per la conservazione e il restauro di beni culturali.

Nel caso della mucillagine di *Opuntia*, essendo costituita per la massima parte da composti organici (vedi capitolo 3), il suo uso come additivo nelle malte e come consolidante per la carta o altri supporti potrebbe influenzare la biorecettività di questi materiali favorendo e/o sostenendo la proliferazione di microorganismi potenzialmente biodeteriogeni. Per questo motivo la biorecettività dei campioni realizzati o trattati con mucillagine è stata studiata sin dall’inizio del Progetto e successivamente, nel Progetto Mobilità 2018-2020, si è voluto introdurre anche l’uso di un estratto di frutti di *Capsicum*, pianta nota per le sue proprietà antimicrobiche, da combinare con il prodotto a base di mucillagine di *Opuntia* (NopalGel) per la realizzazione di un prodotto, il NopalCap,

che potesse diminuire ulteriormente la suscettibilità all’attacco biologico delle superfici trattate.

I test di biorecettività sono stati condotti nel Centro ENEA Casaccia contaminando artificialmente con organismi fotosintetici, o con microfunghi e batteri (per 3 volte consecutive) i provini di materiali realizzati o trattati con mucillagine fresca o con i prodotti NopalGel e NopalCap. I campioni sono stati seguiti valutando la contaminazione mediante microscopia ottica e/o con tecniche colturali classiche (piastramenti su terreno di crescita solido).

Biorecettività della mucillagine

Come è stato ben discusso nei capitoli precedenti, la mucillagine di *Opuntia* è un idrocolloide composto principalmente da carboidrati, e questa caratteristica la rende un potenziale terreno di crescita per i microorganismi. Prima di procedere ad utilizzarla come additivo o consolidante, abbiamo ritenuto importante realizzare dei test preliminari per valutarne la biorecettività intrinseca, cioè la capacità di essere attaccata e degradata. A questo scopo è stato usato un ceppo fungino scelto tra i più comuni biodeteriogeni: *Fusarium solani* CERV14 proveniente dalla collezione di ceppi ENEA-MIRRI e isolato in ambiente ipogeo, dalle pareti della Tomba dei Rilievi nella Necropoli di Cerveteri.

La contaminazione artificiale è stata condotta in vitro, inoculando le spore del fungo nella mucillagine di *Opuntia* ottenuta per macerazione in acqua. La contaminazione è stata seguita per 25 giorni; come mostrato in Fig. 6.1, le spore fungine non riescono a svilupparsi all’interno della mucillagine. Questo dato fornisce una prima indicazione sulla bassa capacità della mucillagine ad essere utilizzata dai funghi come substrato di crescita.



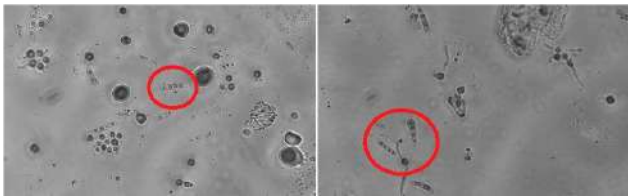


Fig. 6.1 - Immagini al microscopio ottico di mucillagine di *Opuntia* inocolata con spore di *Fusarium* (nel cerchio rosso) e incubata a 28 °C: a sinistra dopo 3 giorni; a destra dopo 25 giorni (ingrandimento 400X)

Biorecettività delle malte aeree

Una volta stabilito che la mucillagine non costituiva di per sé una fonte di rischio per i materiali in cui veniva aggiunta, si è proceduto allo studio della biorecettività sui provini di malta realizzati come descritto nel capitolo 5, sottoponendoli a prove di contaminazione artificiale. Per le prove di attacco microbiologico sui provini di malta aerea abbiamo scelto 6 microrganismi, tra i più comuni biodeteriogeni rilevabili su pareti di interesse artistico. I batteri e i funghi usati per i test appartengono alla collezione di ceppi ENEA-MIRRI e sono stati a loro volta isolati da pareti di siti di interesse storico-artistico. Le prove mirano a misurare le eventuali capacità inibitorie del NopalGel sulla vitalità (biocida) o sulla crescita e replicazione (microstatico).

I funghi *Penicillium comune* Fcont, *Cladosporium sp.* DAF6, *Fusarium sp.* CERV14F1 sono stati cresciuti su terreno solido fino a sporificazione. Le spore sono state poi raccolte, stemperate in tampone fosfato e distribuite sui provini: 1 ml di ogni ceppo per piastra da 5 cm (contaminazione singola), e 3 ml delle spore dei tre funghi per la piastra da 9 cm (contaminazione mista). Come controllo positivo, è stato inoculato il *Galactomyces geothrycum* NOP1 isolato dalla mucillagine fermentata (contaminante spontaneo). Come controlli negativi, provini di malta con e senza NopalGel sono stati bagnati con le stesse quantità di acqua distillata sterile e con la stessa frequenza dei provini contaminati. I batteri *Rhodococcus opacus* CER14.3, *Bacillus amyloliquefaciens* CER14.4 e *Virgibacillus sp.* NOT1 sono stati cresciuti su ter-

reno solido, le cellule raccolte e stemperate a trasmittanza 50%, e lasciati ad affamare a 4 °C per 24 ore. Poi distribuite sui provini: 1 ml di ogni ceppo per piastra da 5 cm (contaminazione singola), e 3 ml delle cellule dei tre batteri per la piastra da 9 cm (contaminazione mista).

I provini contaminati sono stati incubati in camera umida (RH 96%) a 28 °C e analizzati ad intervalli di 30 giorni per tre mesi. In questo intervallo di tempo è stato osservato che nessun ceppo batterico riusciva a colonizzare la bio-malta; si è notato invece lo sviluppo del fungo sulla malta di controllo (Fig. 6.2a) mentre sulla malta addizionata di NopalGel a due mesi dall'inoculo erano visibili solo rare colonie, ma alla fine del terzo mese le ife fungine erano scomparse (Fig. 6.2b). Ciò è spiegato dal fatto che la crescita iniziale del fungo non è avvenuta per la capacità di attaccare la bio-malta, ma a scapito delle riserve cellulari interne, portate dal terreno di coltura utilizzato per l'inoculo sul campione (Persia *et al.*, 2016).

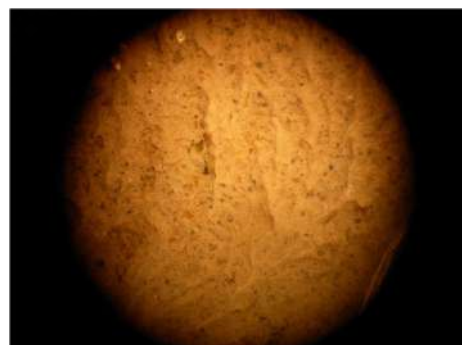
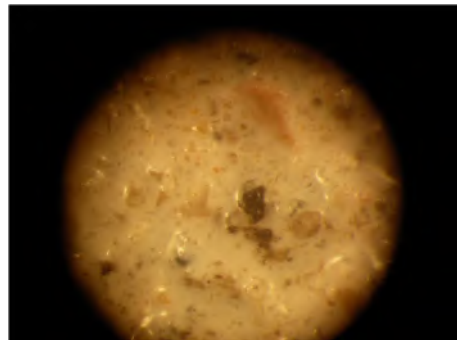


Fig. 6.2 - Provini di malta inoculate con spore di *Cladosporium sp.*: in alto, malta di controllo dopo 2 mesi; in basso, malta addizionata di NopalGel dopo 3 mesi (microscopio ottico, 50x)



Successivamente, i provini di malta aerea sono stati sottoposti a prove di contaminazione con colonizzatori primari utilizzando un biofilm fotosintetico costituito principalmente dal cianobatterio *Leptolyngya* CSC3W, isolato dalle catacombe di S. Callisto (Roma) e gentilmente fornito dalla Prof. Laura Bruno dell'Università di Tor Vergata, Roma (Bruno *et al.*, 2014). L'inoculo è stato preparato prelevando da una piastra di terreno solido contenente il biofilm dei frammenti di agar e dissolto in 3 ml di PBS, vortexato finché le cellule sono abbastanza disperse nel liquido. A questo punto la sospensione viene distribuita in aliquote da 100 µl sui provini di controllo e su quelli addizionati di NopalGel. I provini contaminati sono stati incubati in piastra Petri a temperatura ambiente e analizzati ad intervalli di 30 giorni per tre mesi. I risultati in Fig. 6.3 mostrano la crescita del biofilm sui provini di controllo a partire dal quindicesimo giorno dopo l'inoculo, mentre sulla malta con NopalGel non si osserva attecchimento del biofilm (Alisi *et al.*, 2021).

A conclusione di queste sperimentazioni, possiamo affermare che le malte aeree addizionate di NopalGel non risultano suscettibili all'attacco microbico, né fungino, né di cianobatteri, mostrando una minore biorecettività rispetto alla malta di controllo.



Fig. 6.3 - Provini di malta inoculate con biofilm fotosintetico: in alto la progressione dell'attacco nella malta di controllo dopo 15, 30 e 62 giorni. Nelle foto in basso, la malta addizionata di NopalGel non viene colonizzata dal biofilm

Biorecettività delle malte idrauliche

Per la contaminazione artificiale dei provini di malta idraulica la scelta dei microrganismi da innestare è ricaduta su tre tipologie di biodeteriogeni (selezionati tra i microrganismi contenuti nella banca ceppi ENEA-MIRRI) la cui presenza è comunemente riscontrabile nell'ambito del degrado biologico sui materiali lapidei esposti in ambiente esterno: il fungo *Cladosporium uridenicola* DAF6 isolato dalle pareti della Domus Aurea di Roma, un biofilm contenente protonemi di muschio CSC2 e il cianobatterio *Leptolyngya* sp., isolati dalle catacombe di S. Callisto (Roma) e gentilmente forniti dalla Prof. Laura Bruno dell'Università di Tor Vergata, Roma (Bruno *et al.*, 2014).



Fig. 6.4 - I tre tipi di biodeteriogeni. Da sinistra verso destra *Cladosporium uridenicola* DAF6, *Protonema di muschio*, *Leptolyngya* su terreni di coltura solidi (Foto: Tesi di Lorenza Cardone)

Dopo la crescita in coltura su terreno solido (Fig. 6.4), gli organismi biodeteriogeni sono stati prelevati singolarmente e applicati in diversi punti della superficie di ognuno dei provini: le spore del fungo sono state raccolte e sospese in soluzione fisiologica (10^6 spore per ml), le cellule di *Leptolyngya* centrifugate da coltura liquida per concentrarle; di entrambi, 100 µl della sospensione sono stati distribuiti in un angolo del provino. I protonemi di muschio sono stati prelevati dalla coltura solida e distribuiti sui provini come mostrato

in Fig. 6.5. Al termine della contaminazione i provini sono stati conservati all'interno di contenitori sterili e mantenuti umidi con acqua sterile per 3 mesi, successivamente sono stati esposti all'aperto in condizioni di luce e temperatura ambiente per 18 mesi.



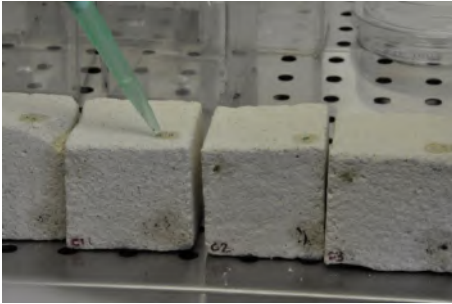
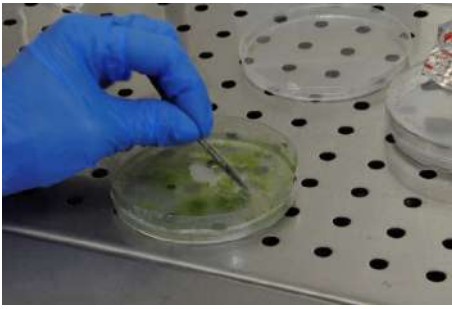


Fig. 6.5 - In alto: prelievo dei protonemi di muschio per la contaminazione;
in basso: contaminazione artificiale dei campioni
(Foto: Tesi di Lorenza Cardone)

Sui provini di malta idraulica, a un anno dalla contaminazione artificiale si è notata (Fig. 6.6) la proliferazione del fungo *Cladosporium uridenicola* DAF6 solo sui campioni di controllo (provini di malta senza NopalCap) mentre sui campioni di malta realizzati con l'aggiunta dell'additivo NopalCap, a 18 mesi di distanza, non si riscontra alcuna crescita di biodeteriogeni (Fig. 6.7).

La mancata proliferazione degli organismi fototrofi – muschi e cianobatteri – è dovuta probabilmente ai differenti tempi di crescita necessari a queste specie ma è altresì indicativa della bassa biorecettività delle malte analizzate. La crescita di organismi eterotrofi come i funghi è interessante ai fini di questa sperimentazione in quanto la malta additivata con NopalCap risulta avere la capacità di ritardarne l'attecchimento rispetto ad una malta tradizionale e consente quindi la realizzazione di una biomalta più stabile e duratura nel tempo.

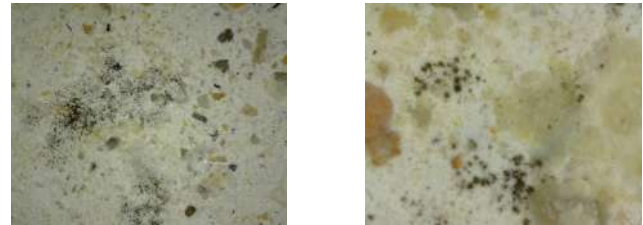
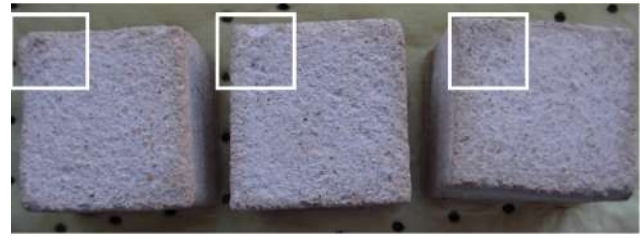


Fig. 6.6 - in alto: provini di malta idraulica di controllo. Evidenziato nel riquadro il punto di inoculo della specie fungina, ingrandito nelle foto in basso che mostrano la proliferazione del *Cladosporium uridenicola* DAF6 dopo 18 mesi (50X e 220X)
(Foto: Tesi di Lorenza Cardone)

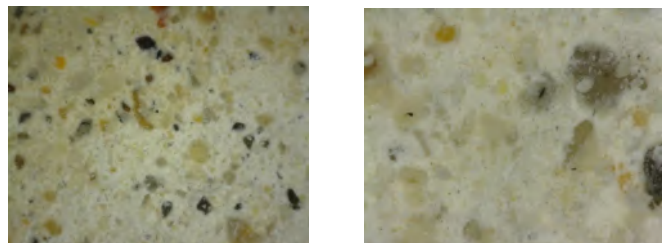
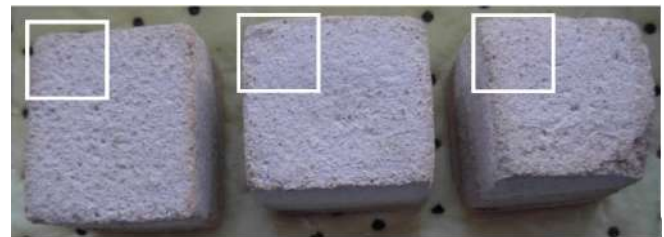


Fig. 6.7 - In alto: fotografie dei provini di malta idraulica preparati con NopalCap. Evidenziato nel riquadro il punto di inoculo della specie fungina, ingrandito nelle foto in basso che evidenziano l'assenza di proliferazione fungina dopo 18 mesi
(Foto: Tesi di Lorenza Cardone)

Biorecettività della carta trattata con Nopalgel

Così come per le malte da restauro, anche per usare il NopalGel come trattamento consolidante nel restauro di materiali cartacei bisognava verificarne la sua biorecettività. I tipi di carta utilizzati per le prove di contaminazione artificiale sono stati forniti dall'Istituto Nazionale per la Grafica, grazie alla collaborazione della Dr.ssa Giovanna Pasquariello. Le carte scelte hanno composizione e grammatura diversa e presentano diversi tipi di stampa (calcografica, xilografica) per mostrare una casistica il più completa possibile dell'effetto del trattamento su un materiale così delicato: Fabriano (lotto anni '70) 100% cellulosa; Fabriano Rosaspina 60% cotone, grammatura 290 g; Magnani di Pescia 50% cotone e 50% pura cellulosa (grammatura 190 g); Ventura di Cernobbio, 50% cotone e 50% pura cellulosa (grammatura 190 g), carta giapponese Kozo-shi.

Prima del test, filtri di nitrocellulosa sono stati applicati sulle carte per verificarne il carico microbico (contaminazione "naturale"). Questo test viene generalmente utilizzato come procedura per caratterizzare meglio i campioni prima di qualsiasi trattamento di contaminazione artificiale. I filtri (una coppia per ciascun campione) sono stati tenuti in contatto con la superficie della carta e quindi trasferiti in piastre di Petri con terreni di coltura TSA (Tryptic Soy Agar) e PDA (Potato Dextrose Agar), per osservare la crescita di eventuali batteri e funghi rispettivamente. I risultati visibili nella Fig. 6.8 mostrano la presenza di diverse specie sia fungine che batteriche, indice di una contaminazione naturale, più abbondante nelle carte Fabriano Rosaspina (Tab. 6.1) e più limitata nella carta giapponese Kozo-shi.

Il trattamento è stato effettuato spandendo a pennello il NopalGel portato a pH 7 con CaCO₃ fino a completo assorbimento, su ogni tipo di carta, lasciandone una parte senza trattamento per fungere da controllo. Dalle carte, trattate e non, sono stati tagliati frammenti di dimensioni 2x5 cm, o comunque adatti ad es-



Figura 6.8 - Esempio di contaminazione "naturale" a seguito della prova con il filtro di nitrocellulosa, delle carte impiegate nel test. A sinistra, la crescita di specie fungine su terreno PDA, a destra la crescita di specie batteriche su terreno TSA (Foto: Tesi di Master Paola Prudentino)

Campione di carta	Differenti morfotipi fungini	Differenti morfotipi batterici
1-Fabriano Rosaspina	5	4
2-Magnani di Pescia	3	4
3-Magnani di Pescia	2	4
4- Fabriano (lotto anni '70)	4	6
5- Fabriano Rosaspina	4	5
6- Ventura di Cernobbio	3	3
7- Kozo-shi	1	3

Tab. 6.1 - Contaminazione "naturale": tipi di funghi e batteri presenti sui diversi tipi di carta analizzata

sere collocati dentro le piastre di Petri sterili.

Una parte dei campioni sono stati sterilizzati in autoclave a 120 °C per 20 minuti, per eliminare i contaminanti naturali che potrebbero competere con i funghi usati per la contaminazione artificiale. Gli inoculi sono stati eseguiti con le spore di due specie fungine cellulolitiche: *Penicillium brevicompactum* DAF8 e *Fusarium solani* CERV14, isolate da ambienti archeologici e conservate nella banca di ceppi ENEA-MIRRI. Il contenuto finale di spore fungine nella sospensione era di 10⁶ spore per ml in soluzione fisiologica. I campioni di



carta sono stati inoculati con 10 µl di sospensione di spore in quattro punti diversi della superficie. Tutti i campioni di carta sono stati conservati in piastre Petri sterili, collocati in un incubatore statico a una temperatura di 28 °C e 98% di umidità relativa, condizioni ottimali per la crescita dei microrganismi.

I campioni di carta inoculati con i due ceppi fungini sono stati osservati al microscopio a intervalli di 1 settimana per 6 mesi. Questi campioni e i loro controlli non hanno mostrato alcuna proliferazione fungina (Fig. 6.9) o degradazione della carta. Su alcuni dei campioni non trattati con NopalGel si è invece osservato lo sviluppo dei conidiofori di *Penicillium brevicompactum* DAF8 (Fig. 6.10), che però non hanno proliferato ulteriormente e non hanno dato luogo a una contaminazione diffusa.

I test di biorecettività su campioni di carta ci hanno consentito di stabilire che il trattamento con il NopalGel non facilita la colonizzazione della superficie da parte di funghi.

Le prove di biorecettività condotte sui diversi materiali hanno dato risultati incoraggianti, mostrando che l'uso del NopalGel, sia come additivo nella malta che come trattamento consolidante per la carta, non dà adito a un aumento della suscettibilità del materiale all'attacco dei biodeteriogeni. La malta aerea di grassello e polvere di marmo mostra una biorecettività intrinseca ma l'aggiunta di *nopal* non favorisce la biorecettività rispetto alla malta priva di additivi organici.

Inoltre, introducendo l'estratto di *Capsicum* nella formulazione del prodotto NopalCap si è potuto ottenere un effetto ritardante sulla contaminazione delle malte idrauliche realizzate con questo additivo.

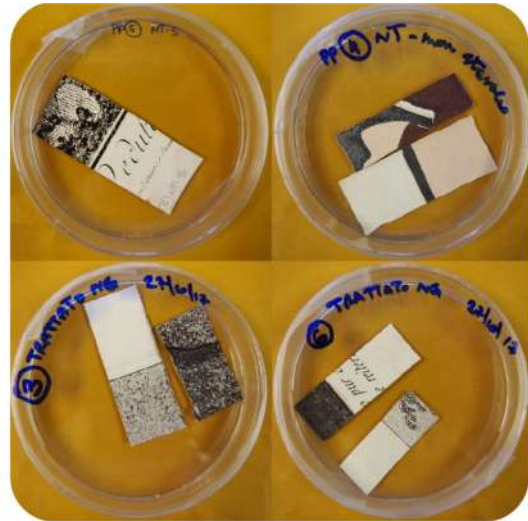


Figura 6.9 - Esempio di frammenti di carte inoculate con le spore fungine (Foto: Tesi di Master Paola Prudentino)



Figura 6.10 - Campioni di carta non trattati, 8 settimane dopo l'inoculo con spore fungine (ingrandimento 50x). in alto: carta Kozo-shi; in basso: carta Fabriano



Bibliografia

L. Bruno, S. Bellezza, F. De Leo, C. Urzi., 2014. A study for monitoring and conservation in the Roman Catacombs of St. Callistus and Domitilla, Rome (Italy). In Saiz-Jimenez C. (Ed.), *The Conservation of Subterranean Cultural Heritage*. CRC Press, Chapter 5, pp. 37-44, ISBN 978-1-138-02694-0

L. Cardone, 2020. La sperimentazione del NopalCap come additivo per le malte idrauliche utilizzate nell'ambito della conservazione. Diploma accademico di II livello in Restauro, Accademia Di Belle Arti Di Napoli

O. Guillitte, 1995. Bioreceptivity: a new concept for building ecology studies. *The Science of the Total Environment* 167: 215-220

F. Persia, C. Alisi, L. Bacchetta, E. Bojorquez, C. Colantonio, M. Falconieri, M. Insaurralde, A. Meza Orozco, A.R. Sprocati, A. Tati, (2016) Nopal As Organic Additive For Bio-Compatible And Eco-Sustainable Lime Mortars. VIth Conference "Diagnosis, Conservation and Valorization of Cultural Heritage" 15/16 December 2016, Naples. ISBN 978-1-942118-0-1

P. Prudentino, 2017. Potential applications of natural plant products as consolidants for paper heritage: investigation of NopalGel. International II Level University Master in Biology for the knowledge and conservation of Cultural Heritage. Università Roma Tre



7. Casi studio di applicazioni di NopalGel e NopalCap in lavori di restauro

Dal 2014 stiamo studiando le caratteristiche funzionali della mucillagine di *Opuntia ficus-indica* come additivo nelle malte aeree per la conservazione dei beni culturali, con eccellenti risultati per il miglioramento delle proprietà chimico-fisiche delle malte. Nel corso dei progetti abbiamo formulato nuovi prodotti derivati da due piante multifunzionali (*Opuntia ficus-indica* e *Capsicum spp.*) attraverso una trasformazione degli estratti vegetali. Il NopalGel è progettato a partire dalla mucillagine estratta dal cladodio del fico d'india. Come descritto nei precedenti capitoli 3 e 4, la mucillagine, estratta con diverse modalità, viene poi trasformata in un prodotto in polvere da usare come additivo dopo un processo di reidratazione. Il NopalCap è costituito da NopalGel cui viene aggiunto l'estratto di peperoncino (come descritto nel capitolo 3) per aumentare la capacità di controllo sullo sviluppo dei biodeteriogeni (capitolo 6). I prodotti messi a punto nel corso del Progetto Bilaterale, testati con successo in laboratorio (capitolo 5), sono stati impiegati in una serie di lavori di restauro, frutto della collaborazione tra i ricercatori dell'ENEA e i restauratori di Sovrintendenze, dell'Istituto Centrale per il Restauro, di Accademie e di ditte indipendenti.

Qui si riportano alcuni casi studio, tra i più significativi e pionieristici, nel trattamento di materiali e superfici diverse con questi bioprodotto.

Lavori di restauro della cupola della chiesa di San Costanzo, Ronciglione (VT): sperimentazione di NopalGel in acqua di calce per consolidare l'intonaco decoeso

di Maria Fernanda Falcon Martinez

Il restauro dei dipinti murali della cupola della chiesa di San Costanzo a Ronciglione ha inizio nel 2014, subito dopo la richiesta di somma urgenza disposta dalla soprintendenza Archeologia Belle

Arti e Paesaggio per l'area metropolitana di Roma, la provincia di Viterbo e l'Etruria meridionale.

L'incuria e l'abbandono hanno caratterizzato la storia della chiesa, innescando il degrado dei materiali che inevitabilmente ha portato a un severo deterioramento delle opere pittoriche. Uno degli aspetti principali da risolvere è stato il grave problema di disgregazione delle malte e del consolidamento che doveva coinvolgere l'intera superficie della cupola.

In quello stesso periodo era in corso il progetto di cooperazione tra Messico e Italia e le prime sperimentazioni in laboratorio dell'uso della mucillagine di fico d'india (NopalGel). Il restauro della cupola, perciò, si è presentato sin da subito come una ottima occasione per poter testare questo prodotto al di fuori delle sperimentazioni in laboratorio.

Il risultato di questi test è stato molto utile per valutare le prestazioni del materiale nel campo del restauro e portare avanti con maggior consapevolezza lo studio di un materiale eco-sostenibile per un futuro di "green restoration" in ambito dei beni culturali.

• L'opera e il contesto conservativo Notizie storiche

Sappiamo da documenti di archivio che nel 1614 fu costruito un altare decorato in stucco e pitture murali in stile barocco. Con il passare degli anni sono stati documentati diversi interventi di restauro e manutenzione necessari per via dei gravi problemi di umidità presenti all'interno della chiesa già segnalati nel 1607 nel corso di una visita pastorale. I documenti di archivio hanno trovato un riscontro nella presenza di numerose ridipinture di diversi colori (bianco, ocra) sugli stucchi e sugli affreschi. Uno di questi lavori è registrato in un documento del 1838 e un altro nel 1889.

La storia della cupola non è da meno, anzi si rileva la zona più problematica dal punto di vista conservativo, con una lunga storia di infiltrazioni



e problemi strutturali, risolti nel 2014 con i lavori di restauro.

• Stato di conservazione

I molteplici episodi di infiltrazione nella cupola nel corso del tempo hanno portato alla perdita di coesione e al degrado delle malte, al distacco e alla carbonatazione degli strati pittorici, con la conseguente perdita di materiale originale. Inoltre bisogna tenere in considerazione gli strati sovrapposti relativi ai diversi momenti decorativi: infatti, nel corso dei sondaggi preliminari è emerso un dipinto murale diverso da quello mostrato in superficie, una decorazione che emulava un soffitto a cassettoni, probabilmente del XVII secolo, sulla quale è stata aggiunta un'altra decorazione che ripete il modello precedente.

Fin dal principio il restauro ha mostrato numerose difficoltà operative per l'esistenza di molti spazi vuoti e distacchi dagli strati pittorici. L'esecuzione di saggi di descialbo sulla superficie indicava una distribuzione non omogenea della decorazione originale, il che ha suggerito che la seconda decorazione sia stata realizzata su un dipinto murale già deteriorato e incompleto. Nelle aree meno danneggiate, i primi test di pulizia hanno messo in luce i dettagli di una decorazione murale di indiscutibile bellezza e sebbene lo stato di conservazione fosse fortemente compromesso, sono emerse figure di angeli seduti avvolti tra le nuvole. Pertanto, è stato necessario affrontare il restauro e il recupero di un dipinto murale con due strati pittorici successivi allo strato originale e tutti solidali tra loro e un substrato disaggregato, appiattito, fragile con presenza di sali. Lo stato di conservazione delle malte contribuiva alla definizione del tipo di intervento da adottare e gli strati carbonatati, ormai solidi tra loro ma generalmente fragili, non consentivano di procedere con metodi tradizionali, chimici o meccanici; pertanto per la rimozione di questi strati si è optato per l'uso di tecnologia laser.

Gli intonaci si presentavano decoesi e lo stato di conservazione generale era mediocre, com'è stato confermato dallo studio mineralogico e petro-

grafico. Per risolvere il problema del consolidamento è stato scelto un trattamento combinato in due fasi: prima con acqua di calce e solo successivamente con silicati. Il trattamento con acqua di calce è stato fondamentale per attuare un primo consolidamento della fragile struttura degli intonaci. Contemporaneamente, lo studio del NopalGel effettuato su provini avanzava con buoni risultati sulle malte a base di calce; per questa ragione si è pensato di fare una prova in una zona della cupola. Essendo la sperimentazione all'inizio, si è scelta un'area limitata, che chiameremo *testimone*, con una percentuale bassa di frammenti di affresco, circa il 5%. La preparazione dell'acqua di calce è stata realizzata nel seguente modo: il secchio con grassello di calce stagionato veniva coperto di acqua per circa 10-15 cm, quando l'acqua di calce non era più torbida ma trasparente si estraeva l'idrossido di calcio in superficie con una siringa e successivamente per ogni litro di idrossido di calce si aggiungevano 5g/L di urea e si procedeva all'applicazione.

Nella zona scelta come testimone, per potenziare l'azione dell'acqua di calce, si è scelto di addizionarla con mucillagine ottenuta per macerazione a freddo (vedi capitolo 3). In 750 ml di acqua di calce sono stati miscelati 5g di urea e 250 ml di NopalGel. Su tutta la cupola si è fatto il trattamento con acqua di calce data a spruzzo per evitare qualsiasi azione meccanica sulle superfici, con una applicazione al giorno per 30 giorni consecutivi.

• Risultati della sperimentazione con NopalGel

Nel settore del restauro sono diversi i metodi di valutazione per considerare l'utilizzo di un materiale a sfavore di un altro. Nel nostro caso sappiamo che nella prima fase il consolidamento era affidato alla capacità di ottenere la carbonatazione dell'idrossido di calce all'interno degli intonaci, azione favorita dalla presenza dell'urea.

Dopo i risultati osservati nelle prove di laboratorio del NopalGel addizionato alla calce, era importante valutare altri aspetti come: la facilità di applicazione, l'assorbimento e la formazione di eventuali





Fig. 7.1 - A sinistra: la zona scelta come testimone per fare una prova di consolidamento con l'acqua di calce addizionata di NopalGel; al centro: l'applicazione a spruzzo del trattamento; a destra: la zona di confine tra il trattamento con l'acqua di calce e NopalGel (lato sinistro) e quella con solo acqua di calce (lato destro)

patine o discromie associate all'additivo. Dal punto di vista applicativo:

- la soluzione con aggiunta di NopalGel non ha creato nessun tipo di problema nell'essere incorporato all'acqua di calce;
- la soluzione si spruzza e si distribuisce sulla superficie in modo omogeneo;
- il *testimone* non presenta nessun tipo di residuo o differenza cromatica sulla superficie.

• Conclusioni

Alla fine di questa prima fase di consolidamento la superficie si presentava più resistente all'azione meccanica: quando si passava un dito sopra non spolverava né lasciava cadere frammenti. L'aggiunta del NopalGel, pur essendo questo un materiale di origine vegetale, non ha favorito la crescita di organismi viventi sugli intonaci degradati, confermando su casi reali i risultati dei test di laboratorio sulla biorecettività.

Dopo questo primo approccio si è deciso di approfondire le sperimentazioni indirizzate al consolidamento di pitture murali ad affresco dando, in questo modo, la possibilità di indagare sugli effetti del NopalGel puro o in presenza di acqua di calce.

Caso studio su elemento scultoreo di epoca romana: uso del NopalCap nell'esecuzione di microstuccatura con malta aerea

di Maria Fernanda Falcon Martinez

Il NopalCap è stato usato per la prima volta come additivo in una malta aerea per le stuccature su una superficie erosa e macchiata, aggredita dagli agenti atmosferici e da attacco biologico; l'intervento è stato effettuato durante i lavori di restauro sui leoni di pietra della Chiesa di San Pietro a Coppito a L'Aquila.

• L'opera e il contesto conservativo

Nel XIII secolo dichiarata chiesa capo quarto della città de L'Aquila, San Pietro a Coppito vanta un'antica storia, ed è per questa ragione che nel corso dei suoi lunghi anni di vita questo edificio ha subito numerosi interventi che ne hanno cambiato l'aspetto. Uno di questi cambiamenti vede protagonisti, ai lati della porta principale, due muti custodi scolpiti in pietra: due leoni stilofori di epoca romana, probabilmente materiale di reimpiego, entrambi con una potente ripresa plastica e appartenuti agli scavi della vicina Amiternum.



Nel mese di luglio 2015 è iniziato l'intervento di restauro della chiesa per riparare gli ingenti danni causati dalle scosse di terremoto all'Aquila del 2009.

Non è possibile conoscere il motivo della attuale collocazione dei due leoni all'esterno della chiesa, avvenuta in un momento imprecisato del XIX secolo, probabilmente durante i lavori di sistemazione della chiesa descritti dal Signorini e avvenuti tra 1862 e 1863. Non si conosce nemmeno il loro stato conservativo al momento della ricollocazione, tuttavia il loro aspetto denuncia l'evidente mancanza di manutenzione, il lungo vissuto e l'esposizione agli agenti esterni.



Fig. 7.2 - Scultura di pietra a destra del portale d'ingresso della Chiesa di San Pietro (Coppito, L'Aquila)

• Stato di conservazione

Si tratta di due elementi scolpiti in pietra bianca che il tempo e le condizioni di conservazione avverse hanno ridotto in ruderi. Entrambi i leoni sono privi di un basamento e mutilati degli arti inferiori. Il deterioramento provocato dall'incuria,

dall'esposizione agli agenti atmosferici e dal tempo restituisce due sculture molto rovinate. Alcune zone più riparate delle criniere sono in condizioni migliori e restano una testimonianza di quello che fu un modellato plastico di buona qualità.

Lo stato di conservazione rilevato all'inizio dei lavori era pessimo e richiedeva un intervento generale. La maggior parte della superficie presentava erosione eolica/meteorica e attacco biologico diffuso. È già noto come le attività microbiche contribuiscano al deterioramento di superfici come la pietra, alla quale si uniscono anche altre cause prodotte da fattori estrinseci: umidità, radiazione solare, regime di venti, piogge, inquinamento. In un ambiente esterno i processi di gelo e disgelo provocano cambiamenti sulla superficie della pietra rendendola più aspra e porosa con formazione di micro-fessure. Trovando le condizioni ideali, i microrganismi sono cresciuti utilizzando i componenti minerali della pietra, alterando sempre di più la matrice lapidea. La conseguenza di questa evoluzione ci restituisce circa il 70% della superficie erosa e coperta da patine biologiche.



Fig. 7.3 - In alto: macrofotografia della superficie erosa con patina biologica; in basso: patina biologica al microscopio digitale (50x)



• Risultati della sperimentazione del NopalCap

L'operazione di restauro era necessaria e, seguendo i principi di Cesare Brandi, l'intervento rivolto al rudere è stato di consolidamento e conservazione della sua condizione.

Per questo motivo è stato previsto, prima di tutto, l'eliminazione dell'attacco biologico per lasciare spazio in seguito alla microstuccatura atta ad occludere la maggior parte delle fessure e delle lacune, per limitare le condizioni che possano favorire il riformarsi della colonizzazione.

L'attacco biologico è stato eliminato con trattamenti di Preventol® R180, prodotto biocida a base di sali d'ammonio quaternario. La fase successiva prevedeva la stuccatura con l'applicazione dello stucco per rimediare ai difetti di continuità della superficie. L'intervento di stuccatura si valuta in relazione all'opera nonché al contesto ambientale; in questo caso è stato considerato non soltanto il valore conservativo ma anche estetico. L'occlusione delle numerose concavità e buchi formatesi sulla superficie ripristina parzialmente la continuità della superficie, migliorando l'aspetto estetico e prevenendo la nuova colonizzazione da parte di microorganismi. Dal punto di vista dei materiali, poiché le sculture rimangono sempre all'aperto ed esposte agli agenti atmosferici, si è pensato a una stuccatura con una malta composta di calce e inerti additivata con il prodotto NopalCap, che in test di laboratorio aveva mostrato sia di conferire migliori proprietà meccaniche alle malte che la capacità di ritardare l'attacco dei comuni microorganismi biodeteriogeni.

Ricetta della malta per la microstuccatura:

- 1 parte di sabbia gialla setacciata fine;
- 1/2 parte di botticino
- 1/2 parte di sabbia grigia setacciata fine;
- 1 parte di grassello di calce +additivo a base di NopalCap (3%)



Fig. 7.4 - In alto: preparazione della malta con aggiunta di NopalCap; in basso: esecuzione della microstuccatura

• Conclusioni

La sperimentazione ha avuto inizio nel mese di marzo del 2018 ed è stata portata avanti solo su una delle due sculture: il leone a destra del portone d'ingresso. È stato utilizzato come legante grassello di calce stagionato e cariche locali. L'aggiunta di NopalCap come additivo non ha determinato variazioni nella colorazione della malta e ha migliorato le proprietà plastiche dell'impasto; con esso sono state occluse tutte le piccole lacune e discontinuità della superficie che avrebbero potuto favorire l'accumulo di polvere, terriccio e acqua, ricreando le condizioni favorevoli per un attacco biologico. Il risultato è una malta con caratteristiche superiori per quanto riguarda la compattezza e la biorecettività, rallentando le probabilità di nuove colonizzazioni. L'opera è stata oggetto di monitoraggio continuo in tutte le quattro stagioni nell'arco degli ultimi due anni. Le stucature non presentano segni, lesioni o attacco biologico pur essendo state eseguite su un'opera esposta agli agenti esterni e ai fenomeni meteorologici estremi (gelo e disgelo) propri della zona. Si conclude che l'uso di NopalCap come additivo



nella malta per le microstuccature ha conferito ottima resistenza al logorio delle malte di restauro, diminuendo così la formazione di microlesioni in cui si creano le condizioni favorevoli per lo sviluppo di biodeteriogeni, e ha aumentato di conseguenza la vita utile dell'intervento.

Il restauro della scultura monumentale di Ludwig Van Beethoven: sperimentazione del NopalCap come inibitore della biorecettività nelle malte idrauliche da restauro

di Chiara Alisi; Lorenza Cardone; Jessica Scarpelli;
Luciana Festa

I materiali lapidei naturali, frequentemente utilizzati in ambito artistico in esterno, sono tra i materiali maggiormente soggetti al biodeterioramento. In particolare, quando questi sono direttamente esposti all'azione degli agenti atmosferici, la materia dell'opera d'arte diventa suolo fertile per la proliferazione di organismi biodeteriogeni. La scultura monumentale di Ludwig van Beethoven oggetto di questo studio, sita nel Conservatorio di Musica San Pietro a Majella di Napoli, ubicata all'aperto ed in un'area verde, rientra in questa categoria. L'opera presentava un'estesa patina biologica omogenea che colonizzava tutte le diverse superfici lapidee, ed era particolarmente riscontrabile sulle stuccature di connessione dei singoli elementi che la compongono. La presenza di tale forma di degrado preludeva alla disgregazione delle malte, causando quindi discontinuità delle superfici attraverso le quali potevano innescarsi altri processi che avrebbero messo in pericolo l'integrità dell'opera, come l'attecchimento di vegetazione superiore e le infiltrazioni di acqua, con conseguente indebolimento della struttura. È stato valutato quindi di effettuare una sperimentazione durante il restauro dell'opera tenendo conto delle più recenti tendenze nell'ambito del bio-restauro, utilizzando cioè prodotti naturali per rallentare la proliferazione biologica. La sperimentazione ha previsto l'aggiunta di NopalCap (composto da mucillagine di *Opuntia ficus-indica* e estratto

di *peperoncino*) alla malta, preparata con legante idraulico, usata per il restauro.

• **L'opera e il contesto conservativo**

L'opera oggetto della presente sperimentazione è stata realizzata agli inizi del Novecento da Francesco Jerace e raffigura il grande compositore tedesco Ludwig van Beethoven (Fig. 7.5). Il monumento in marmo e calcare sito all'interno del Chiostro Grande del Conservatorio di Musica San Pietro a Majella di Napoli, risulta essere una seconda versione di un'opera realizzata in gesso dallo stesso Jerace nel 1895 per partecipare alla prima edizione dell'Esposizione Internazionale d'Arte della città di Venezia. Il marmo napoletano venne realizzato dallo scultore calabrese per volere di Rocco Pagliara che all'interno dell'Istituto svolse prima il ruolo di bibliotecario e successivamente quello di direttore amministrativo e disciplinare.

Il manufatto è composto da due blocchi di marmo con i quali è scolpita la figura del compositore, un conglomerato di blocchi calcarei di forma irregolare che simulano una roccia naturale e da un basamento quadrangolare con un rivestimento in malta cementizia, che costituisce l'appoggio al terreno. I diversi blocchi di marmo e di pietra calcarea sono tenuti insieme da grappe in lega metallica e stuccature in malta cementizia.



Fig. 7.5 - A sinistra la statua di Beethoven di Francesco Jerace nel cortile del Conservatorio in una foto del 1930, a destra il monumento prima dell'intervento di restauro (novembre 2018)



- **Stato di conservazione**

La scultura monumentale oggetto di questo studio, ubicata all'aperto ed in un'area verde, è direttamente esposta all'azione degli agenti atmosferici ed è particolarmente soggetta all'attacco da parte di organismi biodeteriogeni. A causa della sua collocazione, infatti, l'intera opera si presentava ricoperta da una patina scura e molto adesiva di natura biologica e da depositi superficiali coerenti ed incoerenti di varia natura, che ne alteravano completamente la cromia impedendone la corretta lettura (Fig. 7.5). Le condizioni ambientali sfavorevoli alla conservazione avevano inoltre provocato l'insorgere di fenomeni di degrado tipici delle sculture esposte in ambiente esterno, quali erosione del materiale lapideo, colature, ampie e spesse croste nere nei sottosquadri e colonizzazione da parte di piante superiori (Fig. 7.6).



Fig. 7.6 - Particolari dell'opera in cui si evidenzia la presenza di patine scure di natura biologica e di piante superiori

Sulle stuccature di giuntura tra i blocchi di roccia calcarea si era sviluppata un'estesa e vistosa patina biologica, morfologicamente differenziata (Fig. 7.7). Le indagini preliminari hanno rilevato la presenza di licheni e muschi che alteravano il colore originale delle malte stesse.



Fig. 7.7 - Patine biologiche sulla superficie di due grandi stuccature in malta cementizia

- **Risultati della sperimentazione del NopalCap**

La sperimentazione ha previsto l'aggiunta di NopalCap per realizzare una bio-malta con un legante idraulico, valida a risarcire le mancanze nel manufatto napoletano. Al fine di verificare l'efficacia a lungo termine della bio-malta nell'inibire lo sviluppo dei biodeteriogeni in un ambiente favorevole, si è proceduto alla realizzazione di campioni di malta con e senza bio-additivi, che sono stati successivamente sottoposti a indagini diagnostiche e a contaminazione artificiale con tre tipologie di microrganismi comunemente riscontrati come biodeteriogeni sui materiali lapidei, i cui risultati sono descritti nel capitolo 5 "Applicazioni sperimentali di laboratorio".

A quasi due anni dalla conclusione delle operazioni di restauro, la malta utilizzata per colmare mancanze e fratturazioni non risulta essere interessata da degrado di natura biologica. Osservando le fotografie di seguito riportate (Fig. 7.8), è possibile notare come sulla superficie del basamento in malta cementizia (senza NopalCap) poggiato

direttamente sul terreno dell'aiuola si sia sviluppata un'evidente patina biologica di colore verde acceso, fatta eccezione per le aree risarcite con la bio-malta durante le operazioni di restauro. Il ripresentarsi di tale fenomenologia sottolinea quanto la collocazione del monumento favorisca

la crescita dei biodeteriogeni ma permette anche di valutare l'efficacia del NopalCap come inibitore della biorecettività se utilizzato come additivo nelle malte idrauliche



naturali. I risultati ottenuti sull'opera di Francesco Jerace mostrano che l'impiego di additivi a base di *Opuntia* e *Capsicum* nella formulazione di malte per il restauro sono utili per preservare i manufatti lapidei da attacchi biologici.

Fig. 7.8 - Da sinistra a destra: il Monumento a Beethoven nel mese di ottobre 2018, prima del restauro; a febbraio 2019, subito dopo l'intervento; infine, a febbraio 2020, a un anno dall'intervento. Sulla base si nota la crescita di un biofilm fotosintetico, solo nelle zone non stuccate con NopalCap



• Conclusioni

La sperimentazione ha confermato che l'aggiunta di NopalCap nella malta idraulica, oltre a aumentarne la compattezza (come descritto nel capitolo 5) conferisce resistenza all'attecchimento di microrganismi anche in condizioni sfavorevoli come la collocazione della statua in un giardino. I risultati portano dunque alla conclusione che l'aggiunta di questo prodotto non rappresenta un fattore di rischio per la conservazione dell'opera, apportando invece un miglioramento alle caratteristiche della malta stessa, riducendone la possibilità a medio-lungo termine di nuovi attacchi biologici.

Caso studio sul dipinto Resurrezione di Giulio Bargellini della Galleria Nazionale di Roma: sperimentazione della mucillagine di nopal come additivo nella formulazione di stucature durante il restauro

di Stefania D'Ottavio, Franca Persia, Daniele Mirabile Gattia

L'intervento di restauro di un manufatto artistico prevede generalmente differenti fasi, atte alla

conservazione della materia e al raggiungimento di un aspetto estetico che possa quanto più possibile rievocare l'originale. La fase di stuccatura ha come obiettivo principale il ristabilimento dell'unità della pellicola pittorica e quindi delle forze che ne garantiscono la stabilità strutturale e allo stesso tempo ha lo scopo di colmare le lacune (discontinuità della pellicola pittorica) fungendo come preparazione necessaria alla fase di ritocco. Le formulazioni per gli stucchi sono comunemente composte da una parte inerte più un legante, di origine naturale o sintetica a seconda del periodo storico e di esigenze particolari di applicazione. Qualunque sia la sua formulazione, allo stucco sono richieste alcune proprietà come elasticità, resistenza a compressione, basso indice di ritiro percentuale e di biorecettività. La tela di grande formato di Giulio Bargellini, oggetto di questo studio, presentava numerose lacune della pellicola pittorica, dovute a distacchi e cadute di colore causate dall'erronea tecnica esecutiva del dipinto. La pellicola pittorica, costituita da prodotti leganti di origine naturale, presentava un'elevata elasticità e richiedeva quindi delle stucature che



ne potessero quanto più possibile accompagnare i movimenti. Il caso studio presentato è partito dalla conoscenza delle applicazioni di NopalGel, seguite da un approfondimento sia di carattere bibliografico che sperimentale. La capacità di ritenzione idrica della mucillagine previene la rapida essiccazione nelle malte, aiutando a trattenere l'umidità necessaria che permette un'omogenea distribuzione interna per una corretta messa in opera, evitando fessurazioni o cretature durante il processo di presa. Con questi presupposti, si è deciso l'utilizzo di NopalGel come additivo nella formulazione di uno stucco creato *ad hoc* che potesse soddisfare le esigenze conservative del dipinto *Resurrezione*, considerando la necessità di un impasto elastico, di semplice impiego e meno soggetto a fessurazioni e ritiri che avrebbero potuto compromettere ulteriormente la pellicola pittorica circostante la lacuna.

- **Notizie storiche**

L'opera oggetto del presente studio, conosciuta come *Resurrezione, Luce o Giordano Bruno*, fu eseguita nel 1911 da Giulio Bargellini per l'Esposizione Internazionale che a Roma celebrava il cin-

quantenario dell'Unità d'Italia. Il dipinto, conservato nei depositi della Galleria Nazionale d'Arte Moderna e Contemporanea di Roma, è realizzato con tecnica mista su tela di lino di grande formato ed ha come soggetto una rappresentazione allegorica del filosofo Giordano Bruno (Fig. 7.9).

La materia pittorica è consistente ed eterogenea e vede la sovrapposizione di numerosi strati di colore (5/6), a seconda del livello di corposità voluto dall'artista, che arriva in alcune zone a vere e proprie parti in rilievo. La pellicola pittorica, quindi, appare composta da zone compatte e sottili, con pennellate larghe, molto liquide e omogenee e risulta corposa e materica in particolare nelle figurazioni dei personaggi e negli oggetti. La tavolozza è caratterizzata da colori caldi, per lo più terre, oro e bianchi. Lo strato protettivo è stato concepito dall'artista come strato di finitura con funzione estetica. Esso, infatti, è differenziato a seconda delle zone, non è omogeneo e, seguendo in molti punti l'andamento delle figurazioni, si propone come un vero e proprio gesto artistico, creando ombreggiature alle figure. Esso è ben visibile in numerosi gocciolamenti riconducibili alla forma estremamente liquida con cui è stato applicato (Fig. 7.10).



Fig. 7.9 - Giulio Bargellini, *Resurrezione*, GNAM, Roma, 1911 ca.

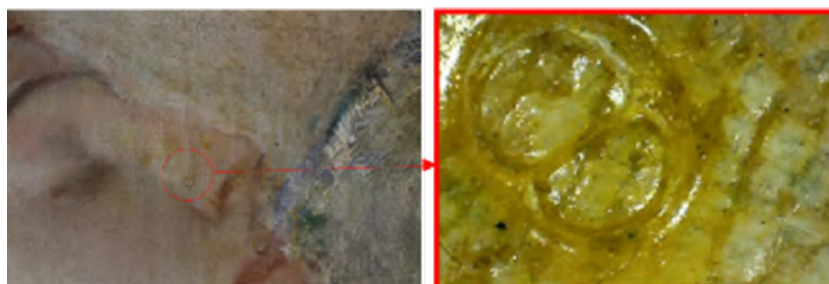


Fig. 7.10 - Gocciolamenti di strato superficiale applicato in forma liquida



• Stato di conservazione

L'aspetto più preoccupante del cattivo stato di conservazione del dipinto riguardava la perdita di materia originale, traducibile in cadute di colore e decoesione che coinvolgevano sia gli strati preparatori che la pellicola pittorica. Gli strati sovrapposti presentavano lacune, sollevamenti e cretture accentuate, che lasciavano intravedere le stesure sottostanti, con una concentrazione maggiore in corrispondenza delle zone del dipinto interessate da pennellate consistenti e spesso sovrapposte, ove questo fenomeno assumeva l'aspetto di uno "sfogliamento" degli strati pittorici stessi. La causa di questa tipologia di degrado è riscontrabile in un errore intrinseco alla tecnica esecutiva del dipinto, che vede una sovrapposizione di stesure non compatibili tra di loro; una sorta di "difetto di fabbrica" che col passare del tempo e in condizioni conservative non idonee porta a numerose tipologie di degrado.

Le origini di questa problematica possono risalire ai cambiamenti e allo sviluppo del mercato dei prodotti per la pittura determinato dalla rivoluzione industriale. Dalla fine del '700 in poi, lo sviluppo della tecnologia e della chimica ha offerto agli artisti nuovi materiali e nuove possibilità tecniche, che hanno trasformato i tradizionali procedimenti di grafica, pittura e scultura, influenzando notevolmente anche sull'immaginario poetico e figurativo. Le novità introdotte nel mercato dei prodotti per l'arte hanno contribuito nel corso dell'800 all'affrancamento dalla formazione accademica, in favore dello sperimentalismo.

• Risultati

Al termine delle prove di stuccatura descritte nel capitolo 5, mediante la comparazione dei risultati, è stata selezionata la migliore formulazione, in termini di prestazioni:

- 100 ml di colla di storione (1:20 in H₂O demineralizzata);
- 100 g di carbonato di calcio (CaCO₃);
- 1,5% (v/v) di NopalGel, aggiunto alla miscela a temperatura ambiente.



Fig. 7.11 - Sollevamenti e cadute di pellicola pittorica



Fig. 7.12 - Sfogliamenti di strati preparatori sovrapposti

I risultati hanno consentito la messa a punto di uno stucco con caratteristiche adatte per l'impiego negli interventi di restauro per elasticità, compattezza, basso indice di ritiro percentuale, assenza di biorecettività, ottima lavorabilità, asciugatura più lenta e omogenea.

Quest'ultima caratteristica possiede un doppio vantaggio: da un lato previene spaccature e fessurazioni e dall'altro concede più tempo all'operatore per raggiungere il livello di stuccatura specifico.

La ricerca è terminata con la valutazione pratica della messa in opera dello stucco, negli interventi sul dipinto *Resurrezione*. Al termine dell'asciugatura, gli stucchi non hanno subito alcun ritiro significativo, hanno aderito perfettamente alla superficie risultando stabili e compatti. Inoltre, è stato possibile lavorarli col bisturi anche dopo 48h.

Ad oggi, le stuccature con l'aggiunta di NopalGel hanno mantenuto le caratteristiche richieste restituendo continuità ed elasticità alla superficie.





Figura 7.13 - Fasi di stuccatura. Uso della nuova formulazione con NopalGel durante il restauro sul dipinto Resurrezione di G. Bargellini

• Conclusioni

Scopo della ricerca consisteva nel verificare se l'aggiunta della mucillagine di NopalGel nella formulazione degli stucchi potesse aumentarne la plasticità, diminuirne l'indice di ritiro percentuale e la tendenza a fratture e cretture dopo l'asciugatura. La sperimentazione ha individuato la corretta percentuale da aggiungere come additivo per il miglioramento dello stucco. I risultati delle indagini diagnostiche hanno evidenziato un aumento della compattezza interna degli stucchi, un'asciugatura più lenta ed omogenea che previene fessurazioni e quasi azzerò il ritiro percentuale. L'assenza di biorecettività negli stucchi contenenti la mucillagine porta inoltre alla conclusione che questo prodotto non rappresenta un fattore di rischio per la conservazione dell'opera, nonostante la sua origine vegetale.

8. Conclusioni

Tutti i risultati acquisiti in questi anni di lavoro portano a una serie di conclusioni positive e nel contempo aprono prospettive future, anche in campi diversi da quelli dei beni culturali.

Il primo risultato che qui vogliamo evidenziare è l'assenza di crescita di biodeteriogeni nei materiali addizionati di NopalGel o NopalCap. Nelle prove effettuate sui campioni di malta aerea e idraulica o su carte o su intonaci, così come nelle applicazioni reali effettuate a partire dal 2016, l'effetto ritardante e/o inibente nella crescita dei biodeteriogeni (anche in condizioni molto favorevoli all'attacco biologico) rassicura sul fatto che mescolare NopalGel o NopalCap a materiali di restauro nei beni culturali non favorisce la proliferazione microbiologica.

I diversi processi di estrazione testati portano a concludere che variando i rapporti acqua/biomassa si può migliorare la resa di estrazione; inoltre l'analisi dei fattori critici di estrazione ha permesso di stabilire le condizioni operative ottimali per massimizzare le rese in un processo con scale-up industriale, che costituiva un altro dei nostri obiettivi.

Ogni processo estrattivo ha dato origine a prodotti con diverse caratteristiche chimiche consentendo di individuare il metodo più idoneo rispetto all'obiettivo di impiego della mucillagine. Ad esempio, il processo tradizionale messicano, con macerazione e rapporto biomassa acqua 1:1, anche se non ottimale in termini di resa, consente di ottenere un prodotto che si presta bene all'impiego nelle malte da restauro, sia per la presenza di un'elevata quantità di acidi uronici, sia per il contenuto di acqua idoneo per questa applicazione; inoltre la limpidezza del composto, ottenuto grazie all'eliminazione del clorenchima, evita indesiderate alterazioni di colore, requisito importante per i beni culturali.

L'obiettivo di poter fornire ai restauratori un prodotto secco è stato parzialmente raggiunto e i risultati preliminari sono promettenti perché le

analisi chimiche hanno stabilito che i prodotti ottenuti da matrice fresca o da liofilizzato sono molto simili, con variabilità minime tra repliche diverse. In particolare, i picchi FTIR attribuiti alla presenza di acidi uronici, responsabili della capacità gelificante della mucillagine, restano invariati. Questo suggerisce che le componenti funzionali implicate nel miglioramento delle caratteristiche delle malte prodotte con l'additivo vegetale restano invariate sia usando una mucillagine fresca che utilizzandone una ottenuta dalla reidratazione del liofilizzato.

Nel confronto tra i processi di disidratazione liofilizzazione e *spray dryer* sono emerse differenze sostanziali che indicano la liofilizzazione, soprattutto se condotta su scala industriale, il processo più idoneo per la stabilizzazione del prodotto. Nello sviluppo futuro, la ricerca potrà essere indirizzata sulla possibile aggiunta di stabilizzanti o agenti di supporto alla mucillagine fresca, per ottenere un prodotto con *shelf life* accettabile e facilmente conservabile nel medio-lungo periodo.

I test di laboratorio con la misura della velocità di propagazione degli ultrasuoni su provini di malta aerea, idraulica e di stucco, *ad hoc* preparati con il NopalGel aggiunto a diverse concentrazioni, hanno fornito un range di concentrazione ottimale di additivo vegetale da mescolare ai diversi materiali da restauro. Tale intervallo è risultato essere tra 1% e 3%, che è il valore che abbiamo utilizzato nelle diverse applicazioni reali. Inoltre l'aggiunta di NopalCap all'interno delle malte idrauliche ha creato una sinergia tra l'effetto positivo della mucillagine (che ne migliora le proprietà meccaniche agevolando la coesione tra le particelle e quindi la coesione della malta stessa) con la proprietà antimicrobica dell'estratto di peperoncino.

Sono preliminari, ma promettenti, i risultati della sperimentazione su carte moderne, con esiti ritenuti interessanti per indagare l'applicazione di NopalGel per il restauro di carte antiche, in modo da sostituire il polivinilacetato, un composto di sintesi organica utilizzato attualmente in questo settore.



Nello studio sul miglioramento delle prestazioni per biofilm, la mucillagine consente di ottenere un aumento sostanziale dell'allungamento finale dei film TPS. I biofilm con aggiunta di NopalGel, rispetto al controllo, hanno indicato una minore fragilità della superficie, evidenziando la necessità di approfondire la sperimentazione.

Le diverse positive applicazioni di NopalGel e/o NopalCap in casi reali e soprattutto il controllo dell'efficacia del restauro effettuato a distanza di tempo (ad esempio, per gli affreschi della chiesa di San Costanzo a Ronciglione sono trascorsi più di quattro anni dalla realizzazione dell'intervento di restauro) ci confortano sulla bontà dei prodotti da noi messi a punto.

Possiamo pertanto concludere che il lavoro di ricerca svolto in questo progetto ha verificato le basi scientifiche dell'uso della mucillagine secondo la tradizione preispanica messicana, validandone l'impiego in interventi di restauro anche al giorno d'oggi.

La possibilità di utilizzare estratti naturali ottenuti con metodi ecocompatibili comporta già in sé il vantaggio di limitare l'uso di prodotti chimici di sintesi, talvolta tossici. Questo aspetto è stato colto in pieno dai restauratori, dagli studenti delle Accademie d'Arte e dell'Istituto Centrale per il Restauro e dagli studenti dei corsi universitari di Restauro e di Diagnostica per i Beni Culturali che si sono rivolti a noi. La possibilità di poter sperimentare e poi utilizzare due prodotti green, anche solo per piccole aree del bene in restauro, ha attratto molto il mondo della conservazione. Il poter sostituire prodotti di sintesi organica con il NopalGel, estratto da quello che qui in Italia è considerato uno scarto, e ancor più poter sostituire i biocidi, tossici per l'operatore e per l'ambiente, con il NopalCap che ritarda la crescita dei biodeteriogeni, ha invogliato il settore del restauro a sperimentare.

Inoltre, lo studio di queste piante "multifunzionali" ha permesso di comprendere meglio le potenzialità dei loro sottoprodotti e soprattutto, nel

caso del ficodindia, di valorizzare, attraverso la formulazione di bioprodotti ad alto valore aggiunto, il cladodio che è, ancora oggi in Italia, prevalentemente uno scarto di potatura e un costo per l'agricoltore.

La collaborazione bilaterale ha allargato il nostro sguardo, consentendo una contaminazione culturale, che ha migliorato la nostra visione della ricerca. Infatti, se il lavoro scientifico descritto ha rivolto la sua attenzione a un settore specifico come quello della conservazione dei beni culturali, il suo merito è quello di aver aperto opportunità verso nuove applicazioni, verso altri settori produttivi (alimentare, nutraceutico, trattamento delle acque, cosmetico, agricolo) migliorando la nostra conoscenza e le potenzialità progettuali. A questo scopo diventa indispensabile individuare partner industriali disposti a investire nell'attività di ricerca e sperimentazione, per rendere non solo NopalGel e NopalCap prodotti commerciabili e fruibili anche su larga scala, ma anche per sviluppare nuovi bioprodotti da inserire in un mercato in rapida crescita. Anche solo rimanendo nel campo edilizio, la bibliografia riporta come questi estratti possano essere validi additivi non solo nelle costruzioni ma anche come isolanti e protettivi.

Se molti risultati sono stati raggiunti, altrettanti aspetti meritano di essere ancora approfonditi: ad esempio gli studi sulle qualità reologiche degli estratti e sulla loro stabilità oppure sulle biomolecole alla base della bassa biorecettività delle biomalte. Ulteriori sperimentazioni su casi studio reali permetteranno di consolidare le conoscenze scientifiche fin qui acquisite con un approccio sempre più sostenibile.



Autori, email e affiliazioni

Chiara Alisi *chiara.alisi@enea.it*
Anna Rosa Sprocati *arsrosae@gmail.com*
Fabio Zaza *fabio.zaza@enea.it*
Lorenza Cardone (tesista) *cardonelorenza@gmail.com*

ENEA, Dipartimento Sostenibilità dei sistemi produttivi e territoriali, Divisione Protezione e valorizzazione del territorio e del capitale naturale, Laboratorio di Osservazioni e Misure per l'ambiente e il clima

Loretta Bacchetta *loretta.bacchetta@enea.it*
Oliviero Maccioni *oliviero.maccioni@enea.it*
Salvatore Palazzo *salvatore.palazzo@enea.it*
Silvia Procacci *silvia.procacci@enea.it*
Claudio Russo *claudio.russo@enea.it*
Paola San Giorgio *paola.sangiorgio@enea.it*
Alessandra Verardi *alessandra.verardi@enea.it*
Vittorio Martina (tesista) *vittorio552@gmail.com*
Giovambattista Platamone (dottorando) *g.platamone@outlook.it*

ENEA, Dipartimento Sostenibilità dei sistemi produttivi e territoriali, Divisione Biotecnologie e Agroindustria, Laboratorio Bioprodotti e Bioprocessi

Daniele Mirabile Gattia *daniele.mirabile@enea.it*
Franca Persia *franca.persia@gmail.com*
Angelo Tati *angelo.tati@enea.it*
Stefania D'Ottavio (tesista) *stefaniadottavio@gmail.com*
Fabrizio Scognamiglio (tesista) *fabrizio.scognamiglio@unicam.it*

ENEA, Dipartimento Sostenibilità dei sistemi produttivi e territoriali, Divisione Tecnologie e processi dei materiali per la sostenibilità, Laboratorio Materiali e Processi Chimico-Fisici

Mauro Falconieri *mauro.falconieri@enea.it*
Serena Gagliardi *serena.gagliardi@enea.it*

ENEA, Dipartimento Fusione e Tecnologie per la Sicurezza Nucleare, Divisione Tecnologie Fisiche per la Sicurezza e la Salute

Margherita Moreno *margherita.moreno@enea.it*

ENEA, Dipartimento Tecnologie Energetiche e Fonti Rinnovabili, Divisione Produzione, Storage e Utilizzo dell'Energia, Laboratorio Accumulo di Energia, Batterie e tecnologie per la produzione e l'uso dell'Idrogeno

Jesús Emanuel Bojórquez-Quintal *tochis_83@hotmail.com*
Alejandro Meza Orozco *alejandro.meza@colmich.edu.mx*
Mirta Insaurralde *m.insaurralde@gmail.com*

Colegio de Michoacán, Mexico

Maria Fernanda Falcón Martínez *falconfernanda@libero.it*

Soprintendenza Archeologia, Belle Arti e Paesaggio per la Città dell'Aquila e i Comuni del Cratere



Tesi sostenute sull'argomento

Lorenza Cardone

Restauro della scultura monumentale di Ludwig Van Beethoven dello scultore Francesco Jerace

Anno Accademico 2019/2020

Diploma Accademico di II Livello in Restauro Materiali lapidei e derivati, superfici decorate dell'architettura
Accademia di Belle Arti di Napoli

Relatore: Prof.ssa Luciana Festa, Prof.ssa Federica De Rosa

Correlatore: Dott.ssa Chiara Alisi

Ilaria Cavaterra

Il pavimento in opus sectile nel sito archeologico di Poggio Moscini a Bolsena: restauro, conservazione e manutenzione

Anno Accademico 2019/2020

Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in Conservazione e Restauro dei Beni Culturali
Università della Tuscia

Relatori: Dott.ssa Francesca Montozzi, Prof. Salvatore De Vincenzo

Correlatore Interno: Dott.ssa Claudia Pelosi

Correlatore Esterno: Dott.ssa Chiara Alisi

Stefania D'Ottavio

Il restauro del dipinto Resurrezione di Giulio Bargellini presso la Galleria Nazionale di Roma: metodologie d'approccio per un intervento ecosostenibile. Indagini sperimentali sull'utilizzo della mucillagine di Opuntia ficus-indica, come consolidante naturale per le preparazioni

Anno Accademico 2017/2018

Diploma Accademico di II Livello in Restauro
Accademia di Belle Arti di Napoli

Relatori: Prof.ssa Barbara Lavorini, Prof. Maurizio Coladonato, Prof.ssa Giovanna Cassese

Correlatori: Dott.ssa Paola Carnazza, Dott.ssa Franca Persia, Dott. Daniele Mirabile Gattia

Giulia Formichella

La mucillagine del fico d'India per applicazioni nella conservazione e nel restauro dei Beni Culturali

Anno Accademico 2016/2017

Corso di laurea in Tecnologie per la conservazione ed il restauro dei Beni Culturali
Università Sapienza di Roma

Relatore: Prof.ssa Maria Bernardini

Correlatore: Dott.ssa Anna Rosa Sprocati

Marta Ledda

Prodotti Biotecnologici per il Restauro Sostenibile: un caso studio alle Terme di Diocleziano, Roma

Anno Accademico 2017/2018

Corso di Laurea in Biotecnologie Industriali
Università di Sassari

Relatore: Dott.ssa Elena Tamburini

Correlatore: Dott.ssa Chiara Alisi



Vittorio Martina

Valorizzazione di risorse biologiche da Opuntia ficus indica (L.) Miller e sviluppo di prodotti innovativi bio-based

Anno Accademico 2017/2018

Corso di Laurea Magistrale in Biotecnologie Industriali, Macroarea di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

Università degli Studi di Roma Tor Vergata

Relatore: Prof.ssa Cinzia Forni

Correlatore: Dott.ssa Loretta Bacchetta

Giovanbattista Platamone

Sustainable Agro-Industrial Supply Chains: Opuntia ficus-indica

Dottorato di Ricerca XXXVth Cycle 2019-2022 ENEA e Università Tor Vergata

Supervisor Università: Prof.ssa Cinzia Forni

Supervisor ENEA: Dott.ssa Loretta Bacchetta, Dott.ssa Silvia Procacci, Dott. Oliviero Maccioni

Paola Prudentino

Potential applications of natural plant products as consolidants for paper heritage: investigation of NopalGel

Anno Accademico 2016/2017

International II Level University Master in Biology for the knowledge and conservation of Cultural Heritage. Univerità di Roma Tre

Supervisor: Dott.ssa Giovanna Pasquariello, Dott.ssa Chiara Alisi

Fabrizio Scognamiglio

Cellulose Nanocrystals (NCC) from Cotton Waste & Mucilage and Fibers from Opuntia Ficus Indica (OFI) Extraction and Application in Paper and Thermoplastic Starch Films

Anno Accademico 2019/2020

Doctoral Course in Science and Technology – Computer Science XXXII cycle

Università di Camerino

Relatore: Prof. Carlo Santulli

Correlatore: Dott. Daniele Mirabile Gattia



Ringraziamenti

Tante sono state le Istituzioni e le persone con cui negli anni abbiamo avuto uno scambio di esperienze e che vogliamo qui ringraziare.

I nostri primi ringraziamenti vanno all'ILLA perché, con l'opportunità dataci nel 2014 di presentare le attività dell'ENEA sui beni culturali, ha permesso casualmente di entrare in contatto con El Colegio de Michoacán con cui poi sono nati il Progetto Esecutivo e il Grande Rilevanza, finanziati dal MAECI e dal CONACYT, l'organismo che ha supportato i nostri partner messicani, e naturalmente dall'ENEA. Senza il supporto finanziario da parte di queste tre istituzioni, che qui ringraziamo, tutta la nostra attività scientifica sulle mucillagini di Opuntia e sul Capsicum non avrebbe potuto aver luogo.

Prima di ringraziare i colleghi che hanno collaborato all'attività sperimentale, un grazie va a Claudia Colantonio, stagista nel 2015 del Progetto "Torno subito" della Regione Lazio, che per prima ci ha aiutato nella ricerca bibliografica sulle applicazioni della mucillagine di Nopal nei Paesi latino-americani.

Un grazie va ai colleghi Alessandro Picca e Alessandro Zambotti che ci hanno sempre ospitato per le prove di invecchiamento dei nostri provini, impegnando per lunghe ore la loro camera climatica e al collega Luciano Pilloni che ha dedicato diverse ore del suo tempo per analizzare al SEM i nostri provini.

Un ringraziamento particolare alla dott.ssa Federica Di Napoli Rampolla, funzionario restauratore per la SABAP per l'area metropolitana di Roma, la provincia di Viterbo e l'Etruria meridionale, per avere permesso il primo intervento con NopalGel su una porzione di intonaco della cupola nella chiesa di San Costanzo a Ronciglione e alla dott.ssa Biancamaria Colasacco, funzionario storico per la SABAP dell'Aquila (adesso in pensione), per l'opportunità di provare il NopalCap sull'intervento sulle sculture della chiesa di San Pietro a Coppito (AQ). Grazie anche alla Dott.ssa Giovanna Pasquariello dell'Istituto Centrale della Grafica, che ha fornito le carte per la sperimentazione.

Siamo grati a tutti i restauratori che hanno voluto sperimentare i nuovi prodotti: a partire da quelli della Galleria di Arte Moderna di Roma, fino ai docenti dell'Accademia di Belle Arti di Napoli e quelli dell'Università della Tuscia, al Dott. Marco Bartolini e ai restauratori dell'Istituto Centrale per il Restauro che hanno permesso di presentare i nostri risultati e che si sono dimostrati entusiasti dei nostri nuovi prodotti. Alla restauratrice e artista Anna Onesti che con spirito da pioniere ha provato i prodotti sulle sue opere.

Un grazie anche alle aziende che producono fichi d'india che hanno partecipato ai nostri convegni e hanno portato la loro esperienza e consigli preziosi.

Un grazie va al gruppo editoriale dell'ENEA e in particolare a Cristina Lanari e Giuliano Ghisu (che ha dedicato molto del suo tempo da pensionato) per il progetto grafico ed editoriale.







ENEA - Servizio Promozione e Comunicazione

enea.it

Stampa: Laboratorio tecnografico ENEA – Centro Ricerche Frascati

Maggio 2021



ISBN 978-88-8286-407-1