



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI GENOVA**

Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche

Corso di laurea in Farmacia

Tesi di laurea

**VALORIZZAZIONE DEGLI SCARTI DELL'INDUSTRIA
ITTICA: UNA POTENZIALE FONTE DI MOLECOLE
BIOATTIVE.**

Relatore:

Prof.ssa Boggia Raffaella

Correlatori:

Dott.ssa Tiso Micaela

Dott. Romanò Michele

Candidato:

Pennazzo Marco

Anno Accademico 2019-2020

INDICE

INTRODUZIONE	- 1 -
1 CAPITOLO 1	- 3 -
1.1 <i>L'industria ittica nel mondo</i>	- 3 -
1.2 <i>Bythos.</i>	- 4 -
1.3 <i>P.Ri.S.Ma.MED.</i>.....	- 4 -
2 CAPITOLO 2	- 6 -
2.1 <i>Gli scarti della filiera ittica</i>	- 6 -
2.2 <i>Composizione degli scarti ittici</i>	- 7 -
2.3 <i>Prodotti bioattivi ottenibili dagli scarti dell'industria ittica</i>.....	- 9 -
❖ COMPOSTI AZOTATI:	- 9 -
❖ COMPOSTI LIPIDICI:	- 15 -
❖ CHITINA E CHITOSANO	- 18 -
❖ PIGMENTI NATURALI	- 23 -
❖ ELEMENTI MINERALI	- 24 -
3 CAPITOLO 3	- 27 -
3.1 <i>Metodi di estrazione tradizionali</i>.....	- 28 -
3.1.1 <i>Estrazione mediante solvente</i>	- 28 -
3.1.2 <i>Estrazione mediante idrolisi enzimatica</i>	- 30 -
3.2 <i>Metodi di estrazione 'Green'</i>.....	- 32 -
3.2.1 <i>Supercritical Fluid Extraction (SFE)</i>	- 33 -
3.2.2 <i>Microwave Assisted Extraction (MAE)</i>	- 38 -
3.2.3 <i>Ultrasound Assisted Extraction (UAE)</i>	- 42 -
CONCLUSIONI	- 46 -
BIBLIOGRAFIA	- 48 -

INTRODUZIONE

Con l'aumento della popolazione mondiale, anche la produzione di residui alimentari è in aumento e la maggior parte degli scarti generati dai processi produttivi del settore alimentare è ancora largamente sottoutilizzata. Questo fatto comporta un duplice problema: da un lato si ha la necessità di doverli smaltire in maniera onerosa (sia da un punto di vista ambientale che economico) e dall'altro il mancato guadagno dovuto alla perdita di sostanze chimiche preziose ancora contenute negli scarti stessi alimentari¹. A titolo di esempio, basti pensare che circa 10^{12} - 10^{14} tonnellate di chitina vengono prodotte ogni anno da organismi viventi oceanici (Dhillon et al., 2013), di cui $2,8 \times 10^{10}$ kg sono generati da artropodi di acqua dolce e $1,3 \times 10^{12}$ kg da artropodi marini (Cauchie, 2002). Questa enorme quantità di chitina fornirebbe abbastanza materia prima, se fossero sviluppate procedure economicamente sostenibili per l'estrazione di polimeri ad alto valore aggiunto da tale materiale di scarto. Abitualmente, i residui “marini” vengono bruciati, conferiti in discarica, scaricati in mare o addirittura abbandonati, con tutta una serie di impatti negativi sulla salute umana, sulla biodiversità e sull'ambiente.

Nel 2017 la produzione ittica globale è stata stimata intorno ai 175 milioni di tonnellate, ma stime recenti prevedono che essa raggiungerà i 194 milioni di tonnellate entro il 2026 (FAO, 2018).

L'espansione della lavorazione del pesce sta creando quantità crescenti di “flussi produttivi collaterali” e di scarti di filiera, quali: pelle, teste, squame, visceri e scarti di taglio dalla filettatura del pesce (FAO, 2018). Questi “scarti” possono rappresentare fino al 70% del pesce utilizzato nella trasformazione industriale. Inoltre, la cattura di pesci di basso valore e le specie ittiche sottoutilizzate (che generalmente sono definite come “unwanted catches”, abbreviati con l'acronimo “UWC”) costituiscono un'altra fonte di potenziali sottoprodotti² della filiera ittica e sono stati stimati mediamente

¹ Gli scarti sono costituiti dalla massa di cibo commestibile che si “perde” all'interno della filiera produttiva, cioè durante le fasi di produzione agricola, movimentazione e stoccaggio, trasformazione e confezionamento degli alimenti

essere pari al 18.6% del pescato totale (Bruno et al., 2019).

Oltre alle specie prive di valore commerciale, entrano a far parte dei UWC anche gli individui di specie target (cioè specie desiderate) sotto la taglia minima di conservazione, che cioè non hanno ancora avuto tempo di riprodursi, riducendo drasticamente la loro produttività.

Questi prodotti (o “flussi produttivi collaterali”), quando scartati e “gettati” nell'ambiente, generano notevoli problemi ambientali e importanti sfide tecnico-alimentari a causa del loro elevato carico enzimatico e microbico, che li rende suscettibili a un rapido degrado se non trattati correttamente o conservati in condizioni appropriate. Nella migliore delle ipotesi essi vengono destinati alla formulazione di prodotti a basso valore commerciale, quali mangimi per animali (es. mangimi per acquacoltura).

² Definizioni tratte da Decreto del ministero dell'Ambiente e della tutela del territorio e del mare 13 ottobre 2016, n. 264, pubblicato in [GU Serie Generale n.38 del 15-02-2017](#)

- a) prodotto: ogni materiale o sostanza che e' ottenuto deliberatamente nell'ambito di un processo di produzione o risultato di una scelta tecnica. In molti casi e' possibile identificare uno o piu' prodotti primari;
- b) residuo di produzione (di seguito «residuo»): ogni materiale o sostanza che non e' deliberatamente prodotto in un processo di produzione e che puo' essere o non essere un rifiuto;
- c) sottoprodotto: un residuo di produzione che non costituisce un rifiuto.

In generale è un sottoprodotto e non un rifiuto, qualsiasi sostanza od oggetto che soddisfa tutte le seguenti condizioni:

1. La sostanza o l'oggetto è originato da un processo di produzione, di cui costituisce parte integrante, e il cui scopo primario non è la produzione di tale sostanza od oggetto;
2. È certo che la sostanza o l'oggetto sarà utilizzato, nel corso dello stesso o di un successivo processo di produzione o di utilizzazione, da parte del produttore o di terzi;
3. La sostanza o l'oggetto può essere utilizzato direttamente senza alcun ulteriore trattamento diverso dalla normale pratica industriale;

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

1 CAPITOLO 1

1.1 L'industria ittica nel mondo

In tutto il mondo il pesce viene ricavato dalla pesca e dall'acquacoltura; nel 2011 sono state prodotte circa 154 milioni di tonnellate di pesce e circa l'85% sono state destinate al consumo umano, mentre il restante 15% è stato utilizzato per la produzione di mangimi per animali o esche. In Europa, nel 2017, le imprese che lavoravano il pesce erano circa 3500 con più di 130.000 addetti ai lavori e un fatturato del settore di circa 32 miliardi di €³. L'Italia, senza alcun dubbio, è il Paese con il maggior numero di piccole imprese e il consumo dei prodotti ittici, nel periodo dal 2014 al 2018, è aumentato di circa il 10%, soprattutto per quanto riguarda quelli trasformati (come, ad esempio, il tonno in scatola)³.

Il mercato del pesce, a livello Europeo, fa sempre più affidamento sulle importazioni per garantire un approvvigionamento sufficiente e costante di materie prime. Il Canada, per esempio, è uno dei maggiori esportatori al mondo di prodotti ittici, distribuendo circa il 75% della propria produzione a oltre 80 Paesi (Ghaly et al., 2013). È stato stimato che circa il 50% del pesce allevato o catturato non venga consumato direttamente e che, dunque, la maggior parte di esso sia destinato a diventare scarto. Per questo motivo, nel corso degli anni si è resa sempre più importante la necessità di trasformare in maniera ecosostenibile questi scarti in nuove risorse da destinare non solo al settore alimentare, ma anche ad altri settori quali l'industria farmaceutica, cosmetica e dei biomateriali in generale.

A tal proposito, sono stati finanziati numerosi progetti di ricerca, anche a livello europeo, tra cui il progetto Bythos, che vede coinvolti alcuni enti di ricerca italiani e il progetto P.Ri.S.Ma.MED, che interessa, in particolare, enti di ricerca liguri.

³ The EU Fish Processing Sector: Economic Report (STECF 19 15) 2020 - Report del comitato tecnico scientifico ed economico europeo per il settore ittico. URL: https://stecf.jrc.ec.europa.eu/reports/economic/-/asset_publisher/d71e/document/id/2644697

1.2 Bythos.

Dal 2019 la Commissione Europea ha elaborato alcune proposte legislative sugli scarti di produzione del mercato ittico al fine di indirizzare i vari Stati Membri verso un'economia circolare promuovendo sia la crescita economica sia la sostenibilità della filiera.

Nel 2018, ha ricevuto un finanziamento dall'UE il progetto BYTHOS (progetto di cooperazione territoriale Interreg-Alcotra Italia-Malta), un programma transfrontaliero che mira a trasformare gli scarti di pesce in materie prime per trasformazioni biotecnologiche utili alla salute umana e al settore cosmetico, incrementando la cosiddetta "crescita blu"(<http://www.bythos.eu/>). Gli obiettivi principali di questo progetto sono:

- Definire le procedure biotecnologiche atte a produrre e sfruttare a livello commerciale i prodotti ricavabili dagli scarti ittici (prevalentemente derivanti da: tonno, crostacei, molluschi e pesce azzurro).
- Promuovere una gestione più sostenibile e una produzione più 'green' nell'industria ittica e nel suo indotto.
- Ridurre al minimo le quantità di rifiuti e scarti provenienti dal settore ittico.

1.3 P.Ri.S.Ma.MED

A livello della regione Liguria è stato recentemente finanziato dall'Unione Europea il progetto P.Ri.S.Ma.MED (Piano rifiuti e scarti in mare di pesca, acquacoltura e diporto nel Mediterraneo). Il progetto in questione è finanziato nell'ambito del 'Programma di Cooperazione Territoriale Interreg Italia-Francia Marittimo' (<http://interreg-maritime.eu/web/prismamed/progetto>) ed ha come finalità principale quella di innovare la gestione degli scarti derivanti dalla pesca e dal mercato ittico in generale.

Attualmente la gestione di questo materiale risulta decisamente inefficiente, anche a causa della mancanza di spazi per lo stoccaggio e di modalità corrette per attuare il recupero e lo smaltimento, comportando così un ulteriore incremento delle problematiche ambientali.

Gli obiettivi principali dichiarati dal progetto sono:

- Sperimentazione e proposta di “Best Practice” per la gestione dei rifiuti
- Predisposizione dei protocolli di “Best Practice”
- Adozione dei protocolli elaborati

2 CAPITOLO 2

2.1 *Gli scarti della filiera ittica*

Circa il 70% del pesce viene processato prima della vendita finale, creando una percentuale di scarti che può variare tra il 20% e l'80%, sia in base al tipo di lavorazione che subisce il prodotto, sia a seconda della tipologia di pesce (Ghaly et al., 2013). Oltre a ciò, una significativa quantità di pescato viene scartata ancora prima della lavorazione.

A titolo di esempio si può citare il lavoro di Arason et al. (2009), i quali hanno stimato che nella lavorazione industriale del merluzzo solo il 40% della materia prima “pesce” viene utilizzato per la produzione alimentare e i “flussi collaterali” rappresentano quasi il 60% della produzione totale, come illustrato in Figura 1.

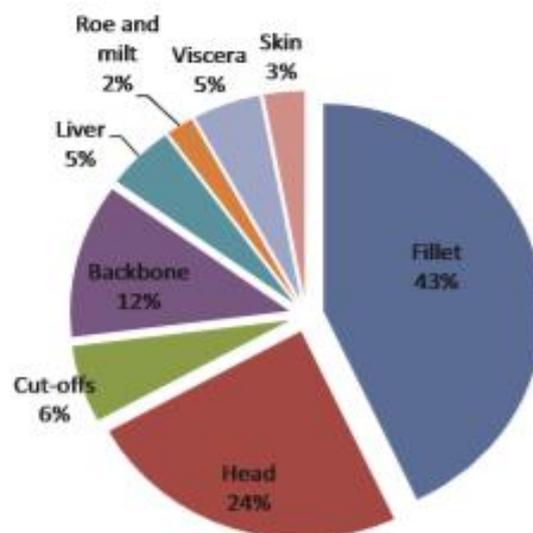


Figura 1. Prodotti e flussi collaterali della filiera “merluzzo lavorato a terra”
(Adattato da Arason, S. et al. (2009). *Maximum Resource Utilisation – Value Added Fish By-products*. Nordic innovation Centre, Oslo, Norway
<http://www.divaportal.org/smash/record.jsf?pid=diva2%3A707165&dswid=868>).

Nel 2019 Al Khawli et al. hanno rivisto e rielaborato questi dati concludendo che, in relazione ai diversi settori della pesca, i sottoprodotti non utilizzati per il consumo umano diretto sono stimabili tra il 30% e l'85% del peso del pesce, a seconda delle diverse tipologie di cattura. Questo intervallo percentuale così ampio è dovuto al fatto che il rapporto pesce/sottoprodotto varia in base alla zona di pesca, alla stagione, alle dimensioni e alle specie del pesce preso in esame.

Oltre alle catture accessorie (UWC), i potenziali sottoprodotti della pesca e dell'acquacoltura comprendono i già citati scarti che mediamente sono stati stimati avere le seguenti proporzioni: le teste rappresentano il 9% –12%, le viscere il 12% –18%, la pelle l'1% –3%, le ossa 9% –15% e le squame circa il 5% in peso del pesce intero.

È importante ricordare che la maggior parte degli scarti derivati dal pesce vengono smaltiti nell'oceano; qui, batteri aerobi presenti nell'acqua provocano un abbattimento della materia organica in presenza di ossigeno, il quale subisce una notevole riduzione. La diminuzione di ossigeno in acqua crea una condizione anaerobica che porta al rilascio di gas come acido solfidrico, ammoniaca, acidi organici e gas serra come anidride carbonica e metano. Conseguentemente si verifica un sovraccarico di azoto, fosforo e ammoniaca nelle acque che porta ad una variazione del pH, ad un aumento della torbidità dell'acqua e, quindi, alla decomposizione delle alghe (Ghaly et al., 2013).

Gli scarti degli impianti di trasformazione del pesce ammontano a circa 20 milioni di tonnellate, che equivalgono al 25% della produzione mondiale proveniente dalla pesca marina (Ghaly et al., 2013). I rifiuti derivanti dal pesce risultano essere una fonte estremamente preziosa per l'estrazione di molecole bioattive quali: collagene marino, acidi grassi della serie omega-3 e numerose altre sostanze di interesse per l'industria cosmetica, farmaceutica e nutraceutica e per la produzione di biodiesel.

La frazione proteica concentrata del pesce rappresenta, ad esempio, una fonte nutritiva preziosa sia per l'uomo sia per gli animali soprattutto per la completezza del suo profilo amminoacidico.

2.2 Composizione degli scarti ittici

La composizione del pesce varia in base alla specie, sesso, età, stato nutrizionale, periodo dell'anno e salute. La maggior parte del pesce contiene mediamente il 15-30% di proteine, lo 0-25% di grassi e il 50-80% di acqua.

I rifiuti solidi del pesce sono costituiti da testa, coda, pelle, viscere, pinne e lische. Questi sottoprodotti dell'industria di trasformazione possono essere classificati in due tipologie: un primo gruppo che include prodotti facilmente degradabili con alto contenuto di enzimi, come le viscere e il sangue, e un secondo gruppo che include i prodotti meno deperibili dei precedenti (ossa, testa e pelle). Inutile sottolineare il fatto che la loro tempestiva raccolta, così come l'opportuno trattamento iniziale per stabilizzarli, siano step fondamentali per preservarne la qualità e renderli riutilizzabili come materia prima di prodotti ad alto valore aggiunto. Ne consegue, quindi, che, per riuscire ad utilizzare le risorse ittiche in modo responsabile ed efficiente, è indispensabile stabilire metodi efficienti e sicuri per l'estrazione dei nutrienti e di altri composti bioattivi target. A tal proposito, l'eliminazione dell'acqua, e quindi l'essiccamento immediato degli scarti, risulta sicuramente uno dei passaggi cruciali nel loro possibile riciclo.

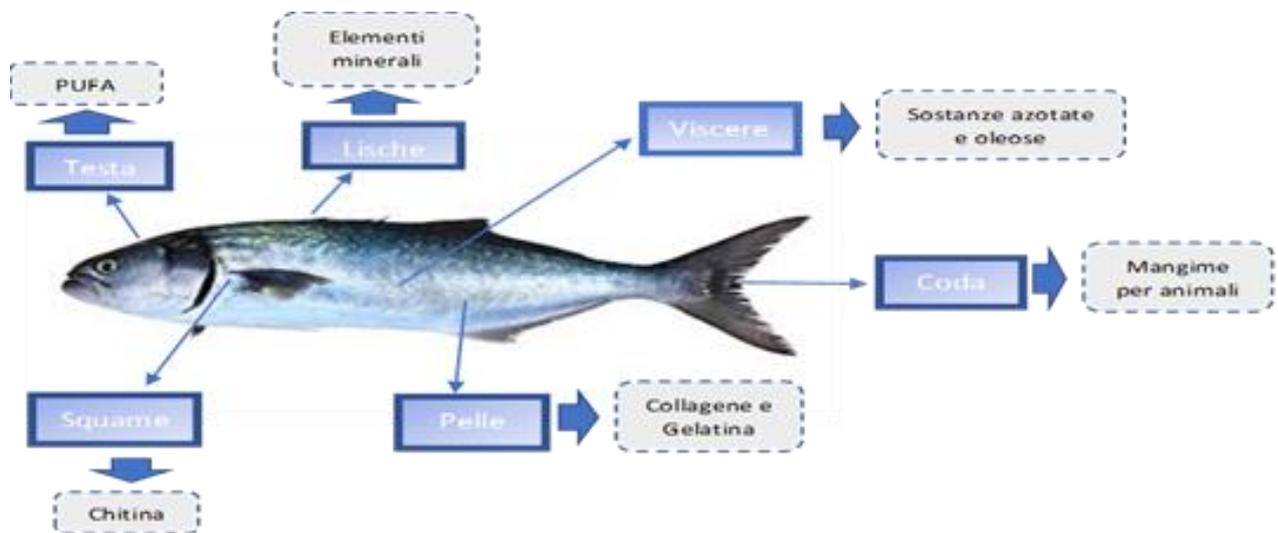


Figura 2 Possibilità di ottenimento di composti bioattivi dai sottoprodotti della lavorazione del pesce.

L'utilizzo dei sottoprodotti della pesca sta attirando l'attenzione dei ricercatori e delle aziende in quanto consente di ottenere, oltre a prodotti a basso valore aggiunto (quali farine e oli), composti con un valore aggiunto maggiore come chitina, collagene, peptidi, carotenoidi ed elementi inorganici: questi possono essere estratti e riutilizzati come ingredienti nutraceutici o additivi nelle industrie alimentari, farmaceutiche e cosmetiche; inoltre possono rappresentare anche una fonte promettente per la produzione di biocarburanti.

In Tabella 1 è riportata la composizione chimica media degli scarti ittici.

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

Tabella 1 Composizione chimica media di scarti ittici

(Estrapolata dal lavoro di Brooks MS, Ramakrishnan VV. 2013. «Fish Processing Wastes as a Potential Source of Proteins, Amino Acids and Oils: A Critical Review». *Journal of Microbial & Biochemical Technology* 05 (04). <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000110>)

2.3 *Prodotti bioattivi ottenibili dagli scarti dell'industria ittica*

In accordo con il lavoro del 2006 di Kim e Mendis, la panoramica seguente riporta i composti bioattivi ottenibili dai sottoprodotti della pesca e dai UWC e alcuni dei possibili ambiti di utilizzazione industriale, dettagliando solamente quelli di maggior interesse nel settore alimentare/dietetico e accennando brevemente gli altri:

❖ **COMPOSTI AZOTATI:**

- **Proteine e amminoacidi:** le proteine del pesce sono dotate di valore nutrizionale maggiore rispetto alle proteine vegetali e si trovano in grandi quantità nelle lisce,

dalle quali potrebbero essere estratte attraverso idrolisi enzimatica. In linea generale sono più termosensibili delle proteine dei mammiferi e comunque sia la loro T50 (ossia la temperatura necessaria per denaturare il 50% delle proteine) è influenzata dal pH (Ghaly et al., 2013). Alcuni peptidi bioattivi sono dotati di proprietà farmacologiche (antiipertensive, antibatteriche, anticoagulanti, antinfiammatorie, antiossidanti...) (Harnedy et al.,2012) e possono trovare largo impiego non solo nell'industria farmaceutica, ma anche in quella cosmetica, nutraceutica ed alimentare (Aspevik et al., 2017). A tal proposito, si ricordano alcuni tra i prodotti già disponibili a livello commerciale quali: Vasotensin®, integratore a base di peptidi ricavati dagli scarti del pesce bonito, con vantati effetti adiuvanti a livello antiipertensivo; Seacure®, integratore alimentare formulato a partire dagli scarti della filettatura del pesce bianco, indicato per promuovere la salute gastrointestinale e Fortidium®, un altro integratore alimentare a base di idrolizzati proteici da viscere di pesce, con effetti benefici antistress e antiossidanti vantati in etichetta (Torres-León et al.,2018)

- **Enzimi:** estratti principalmente dalle viscere, risultano avere una elevata attività catalitica anche a basse concentrazioni. In accordo con quanto riportato dal lavoro del 2013 di Ghaly et al., tra questi vengono ricavati:
 - Pepsina: viene impiegata per estrazione di collagene e come sostituta del caglio nelle produzioni casearie.
 - Chimotripsina: endoproteasi (in grado di agire a livello degli amminoacidi aromatici) che risulta avere una attività maggiore, ma composizione amminoacidica diversa rispetto alla corrispondente chimotripsina bovina.
 - Tripsina: endopeptidasi pancreatica in grado di rompere i legami nei quali sono coinvolte le estremità carbossiliche dei residui di lisina e arginina, molto simile come composizione alla tripsina dei mammiferi.

- **Collagene:** contenuto in grandi quantità nella pelle del pesce, dalla quale viene estratto mediante idrolisi acida o basica. Largamente utilizzato nell'industria farmaceutica, cosmetica e come integratore alimentare, differisce dalle altre proteine in quanto ricco di amminoacidi non polari come prolina, glicina, alanina

e valina (Ghaly et al., 2013). Il collagene ha una complessa organizzazione strutturale e gerarchica e, finora, ne sono stati individuati più di 28 tipi diversi in base alla loro specifica organizzazione in tessuti distinti. Il seguente elenco, estrapolato dal lavoro del 2014 di Silva et al., fornisce esempi di tessuti animali in cui sono presenti i tipi più abbondanti di collagene:

- Tipo I: osso, derma, tendine, legamenti, cornea;
- Tipo II: cartilagine, corpo vitreo, nucleo polposo;
- Tipo III: pelle, parete vasale, fibre reticolari della maggior parte dei tessuti;
- Tipo IV: membrane basali;
- Tipo V: spesso si distribuisce con il collagene di tipo I nella cornea.

Essendo queste tipologie (collagene da I a V) le più abbondanti, rappresentando circa il 90% di tutti i collageni, sono anche quelle maggiormente sfruttate a livello commerciale isolandoli e purificandoli, principalmente da tessuti bovini e suini, mediante processi di produzione convenzionali e ad alto rendimento, che portano a lotti di collagene di alta qualità (Silva et al., 2014). Tuttavia, il collagene suino e bovino, sebbene caratterizzato da una stabilità termica superiore a quella del collagene marino (es. il collagene con un peso molecolare più elevato di solito ha una maggiore stabilità termica, anche grazie al suo contenuto amminoacidico), desta non poche preoccupazioni religiose e igienico-sanitarie, che rendono interessanti eventuali alternative come quello di origine marina (Kim e Mendis, 2006). L'incidenza su vasta scala dell'epidemia di encefalopatia spongiforme bovina (BSE) ha portato di conseguenza alla sfiducia dei consumatori sui prodotti a base di collagene da fonti bovine e suine; il mondo intero è, quindi, alla ricerca di fonti alternative di collagene (Kim e Mendis, 2006).

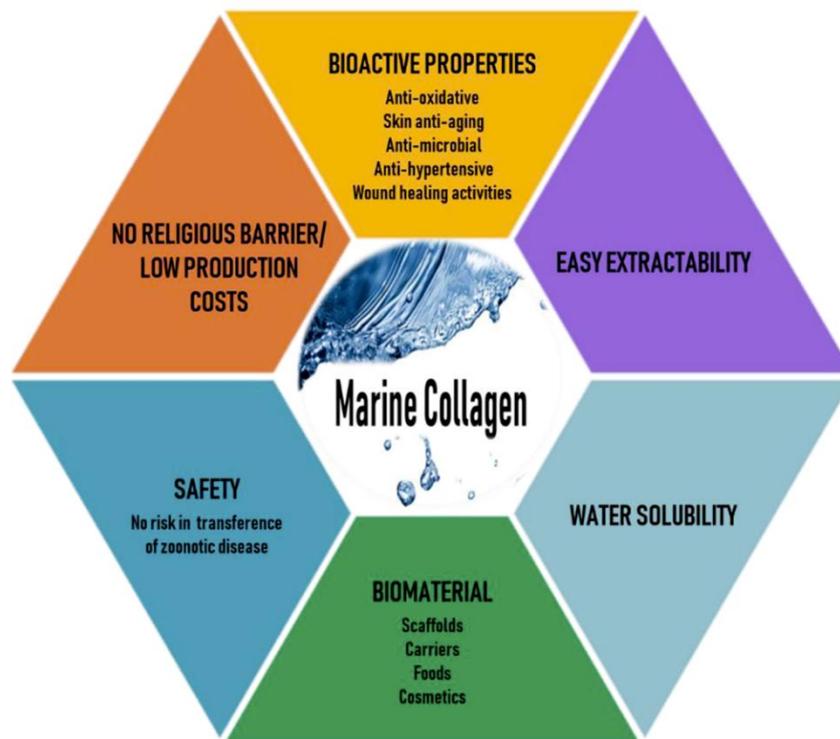


Figura 3 Vantaggi dell'impiego di collagene marino.
 (Figura estrapolata dal lavoro di Sadowska, M.; Kolodziejaska, I.; Niecikowska, C. Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chem.* 2003, 81, 257–262)

In particolare, i collagene marini possono essere ottenuti da diverse fonti: spugne, meduse e frattaglie di pesce come lisce, pelle, squame e pinne (Silva et al., 2014). I collagene marini sono sia fibrillari che non fibrillari, hanno temperature di gelificazione e fusione inferiori rispetto al collagene dei mammiferi, ma viscosità relativamente più elevate rispetto ad analoghi composti di natura bovina.

Il collagene di pesce è più sensibile al calore a causa di legami crociati labili rispetto a quello dei mammiferi (quindi più facilmente denaturabile) (Silva et al., 2014).

Nei settori biomedico e farmaceutico, il collagene ha diverse applicazioni: è usato come eccipiente per i farmaci e in campo biomedico per la produzione di sostituti della pelle umana, di vasi sanguigni e legamenti. Diversi studi ne valutano le proprietà antimicrobiche, antiossidanti e antiipertensive (Regenstein et al., 2007; Venkatesan et al., 2017).

Quando si parla di “collagene idrolizzato” (detto anche idrolizzato di collagene), si intende un prodotto che viene ottenuto dal collagene tramite un processo di idrolisi della sequenza amminoacidica primaria ed è la forma più frequentemente presente in prodotti commerciali, quali integratori alimentari pubblicizzati per la salute delle articolazioni nella prevenzione di artrosi e osteoporosi, nonché come trattamento anti-aging a livello della cute (Pal et al., 2016; Venkatesan et al., 2017).

Nella Figura 4, estratta dall’articolo di Silva et al., sono riportati numerosi esempi di diverse tipologie di collagene marino estratti da particolari scarti di alcune specie ittiche.

Collagen Type	Source of Collagen	Source Tissue
	Bigeye snapper	Bone
	Largefin longbarbel catfish	
	Seaweed pipefish	Skin
	Brown backed toadfish	
	Ocellate pufferfish	
	Lizard fish	
Type I	Horse mackerel	
	Grey mullet	Scales
	Flying fish	
	Yellowback seabream	
	Bigeye tuna	Bone
	Squid	Skin
	Cuttlefish	Skin
	Edible Jellyfish	Umbrella
	Brownbanded bamboo shark	Cartilage
Type II	Blacktip shark	Cartilage
	Ribbon jellyfish	Umbrella
Type IV	Marine Sponge	

Figura 4 Esempi dei diversi tipi di collagene marino isolati e la varietà di fonti marine. (Estrapolata dal lavoro di Silva, T.; Moreira-Silva, J.; Marques, A.; Domingues, A.; Bayon, Y.; Reis, R. *Marine Origin Collagens and Its Potential Applications. Marine Drugs* **2014**, 12 (12), 5881–5901. <https://doi.org/10.3390/md12125881>)

- **Gelatina:** ottenibile dalla parziale idrolisi del collagene, possono esservene due principali tipologie: la gelatina di tipo A che si ottiene dalla procedura di idrolisi acida e quella di tipo B che, invece, si ricava dalla procedura di idrolisi alcalina. Viene utilizzata come agente gelificante nei prodotti alimentari, farmaceutici e cosmetici. La gelatina estratta dalla pelle di pesce risulta avere proprietà

antiossidanti e antipertensive maggiori della gelatina di origine bovina (Ghaly et al., 2013). Ad oggi, l'80% della gelatina alimentare prodotta in Europa è derivata dalla cotenna del maiale, il 15% viene ricavato dal bifido bovino, cioè da uno strato sottile presente sotto la pelle, e il rimanente 5% viene ricavato quasi tutto da ossa di maiali e bovini, ma anche in questo caso si è alla ricerca di fonti alternative per le stesse problematiche già citate nel precedente paragrafo in riferimento al collagene. La gelatina derivata dai frutti di mare rilascia un aroma e un sapore particolare e possiede una maggiore digeribilità rispetto alla gelatina animale.

- **Protamina:** miscela purificata di proteine basiche a basso peso molecolare, solubili in acqua e non coagulabili al calore, ricavate principalmente dallo sperma di salmone e aringa. Contiene un'elevata percentuale di arginina e, in natura, si trova combinata con acidi nucleici a formare nucleoprotidi. A livello alimentare ha dimostrate proprietà antimicrobiche (Hansen et al., 2001).

La protamina solfato è impiegata a livello farmaceutico come antidoto antagonista dell'eparina: il suo funzionamento si basa sulla capacità di determinare la dissociazione del complesso eparina-antitrombina III (legame importante che favorisce la fluidificazione del sangue inibendone la coagulazione) formando un complesso eparina-protamina che risulta inattivo (<https://www.aifa.gov.it/>).

Ad oggi è prodotta principalmente attraverso l'uso del DNA ricombinante.

- **Proteoso-Peptoni:** miscela di polipeptidi e aminoacidi ricavati dalla degradazione enzimatica controllata delle proteine. Vengono impiegati per la produzione di terreni di coltura per fini microbiologici o biotecnologici e ne costituiscono gli ingredienti generalmente più costosi (tra 80 e 300 € / kg) (Vázquez et al., 2020)

❖ **COMPOSTI LIPIDICI:**

- **Olio:** estraibile da circa il 50% degli scarti di pesce, in particolare da acciughe, sardine e alcune specie di salmone; può essere destinato sia al consumo umano sia alla produzione di biodiesel.

L'olio di pesce è ricco di due acidi grassi polinsaturi semi-essenziali che i pesci non sintetizzano, ma che ottengono attraverso la loro dieta (da alghe e plankton): l'acido eicosapentaenoico (EPA) e l'acido docosaesaenoico (DHA), derivanti dall'acido alfa-linolenico (ALA). Entrambi hanno un impatto positivo sulla salute umana: DHA è importante per un ottimale sviluppo neurologico nei bambini (è infatti raccomandata l'assunzione alle donne in gravidanza e un arricchimento nelle formule per lattanti), mentre EPA migliora la funzionalità cardiovascolari. È stato osservato come in pazienti geriatrici l'impiego terapeutico di omega-3 possa contribuire alla prevenzione di demenza senile, morbo di Alzheimer e disturbi comportamentali. (Ashraf et al., 2020). Secondo l'ultima revisione dei LARN (i Livelli di assunzione di riferimento di nutrienti ed energia per la popolazione italiana) l'assunzione di omega 3 dovrebbe soddisfare tra lo 0,5 e il 2% del fabbisogno energetico quotidiano a qualsiasi età (<https://sinu.it>).

L'EFSA (l'autorità europea per la sicurezza alimentare) ha respinto molti dei claims salutistici ('*Health Claims*')⁴ proposti per EPA e DHA, ma ha approvato quelli secondo cui:

- EPA (acido eicosapentaenoico) e DHA (acido docosaesaenoico) contribuiscono al normale funzionamento del cuore (https://ec.europa.eu/info/departments/health-and-food-safety_it);
 - Il DHA assunto dalla madre contribuisce al normale sviluppo dell'occhio del feto e dei bambini allattati al seno (https://ec.europa.eu/info/departments/health-and-food-safety_it).
- **Fosfolipidi:** estratti dall'olio di pesce mediante varie procedure. I fosfolipidi di origine marina contengono PUFA (acidi grassi poli-insaturi) omega-3, alcuni dei quali sono presenti solo nelle fonti marine. Vengono utilizzati come emulsionanti

⁴ Stabiliti dal Regolamento [CE] n. 1924/2006

nell'industria alimentare e cosmetica o come eccipienti nell'industria farmaceutica.

- **Squalene:** è un idrocarburo terpenico (isoprenoide), intermedio della sintesi del colesterolo, di altri ormoni steroidei e della vitamina D. Negli esseri umani è sintetizzato nel fegato e nel derma, secreto in grandi quantità dalle ghiandole sebacee risultando, dunque, un componente del sebo umano (circa il 12% di lipidi secreti da queste ghiandole sono costituiti da squalene).

A livello industriale viene estratto da fegato, stomaco, pancreas, reni e altri organi di alcune specie di squali. Tuttavia, l'Europa ha drasticamente ridotto negli ultimi anni le quote di pesca degli squali per la tutela dell'ecosistema marino. È, quindi, di cruciale importanza trovare fonti alternative di questa preziosa biomolecola.

Lo squalene ha largo impiego nell'industria:

- cosmetica in quanto sono state dimostrate le sue proprietà idratanti, riparatrici della pelle danneggiata e antiaging (scavenger di radicali liberi grazie alla sua resistenza alla ossidazione lipidica) (Mannina et al., 2019).
- alimentare e in quella farmaceutica per la preparazione di emulsioni stabili, sia come ingrediente principale che secondario. Queste emulsioni vengono sfruttate nella formulazione di vaccini e di preparazioni ad uso topico per il trattamento delle ustioni;

Sono state anche studiate le sue potenziali proprietà antitumorali, antifungine, antiossidanti e antibatteriche (Ashraf et al. 2020). È inoltre impiegato per la sua capacità di migliorare i processi digestivi, normalizzando condizioni di costipazione e diarrea, e per la sua efficacia nel trattamento della gastrite; oltre a ciò, essendo coinvolto nella produzione di ormoni steroidei, sono stati studiati potenziali effetti benefici nella sindrome premestruale e nelle problematiche legate alla menopausa e all'infertilità (Ashraf et al. 2020).

Lo squalene, infine, può essere introdotto nella dieta umana come integratore al fine di coadiuvare le funzionalità cardiovascolari e delle articolazioni (Ashraf et al. 2020).

Nonostante sembri avere una potenziale azione protettiva contro lo stress

ossidativo nei confronti di DNA, proteine e lipidi, ad oggi l'EFSA non ha concesso alcun *'Health Claim'*⁵.

- **Vitamina A:** retinolo, retinale ed acido retinoico, che preformati si trovano solo negli alimenti di origine animale (carne, uova, latte e derivati, in particolare burro, e pesci); mentre nei vegetali (carote, albicocche, pesche, pomodori, zucca, spinaci ecc.) si trovano solo le forme provitaminiche (carotenoidi). La struttura della vitamina A è di tipo isoprenoide (4 unità isopreniche che formano un anello: beta-ionone) con presenza di doppi legami in catena laterale coniugati in forma trans (Mannina et al., 2019). Altamente instabile all'aria e alla luce a causa della sua facilità di subire ossidazione, è conosciuta per il suo coinvolgimento nella prevenzione e trattamento di numerose patologie oculari e della pelle (Ashraf et al. 2020). Il suo coinvolgimento come retinolo/retinale è fondamentale nella funzione visiva e come acido retinoico nella trascrizione genica.

Generalmente, negli alimenti il retinolo si trova esterificato soprattutto con l'acido palmitico (fegato bovino, tuorlo d'uovo, derivati del latte) (Mannina et al., 2019). Gli apporti di vitamina A e beta-carotene ammessi negli integratori alimentari, in Italia, sono rispettivamente 1200 microgrammi e 7.5 mg⁶.

L'EFSA ha autorizzato 6 diversi *'Health Claims'*⁵, ma è importante sottolineare come la supplementazione vada fatta con cautela e sotto attento controllo medico, in quanto è possibile avere tossicità acuta e cronica in caso di superamento della dose di 3000 microgrammi RE (retinolo equivalenti) pro die, considerato l'upper safe level di tale vitamina (https://ec.europa.eu/info/departments/health-and-food-safety_it).

- **Vitamina D:** con questo termine si indica la famiglia di composti liposolubili che hanno l'attività biologica del colecalciferolo, noto come vitamina D3, ed estratto dall'olio di pesce.

⁵ Stabiliti dal Regolamento [CE] n. 1924/2006

⁶ Valori stabiliti da: "Apporti giornalieri di vitamine e minerali ammessi negli integratori alimentari", Revisione aprile 2019 (DIREZIONE GENERALE PER L'IGIENE E LA SICUREZZA DEGLI ALIMENTI E LA NUTRIZIONE, UFFICIO 4). URL: <http://www.salute.gov.it/portale/home.html>

Carenze di tale vitamina, nell'uomo, possono portare a rachitismo nei bambini, osteomalacia, bassa densità minerale (BMD) nelle ossa e, quindi, insorgenza di osteoporosi in caso di soggetti adulti: ha infatti una funzione essenziale nel mantenimento della mineralizzazione ossea, oltre che nella contrazione muscolare e conduzione nervosa, regolando l'omeostasi di calcio e fosforo (Ashraf et al., 2020).

Ridotti livelli di vitamina D, inoltre, sono stati associati a diabete, maggiore aggressività di alcuni forme tumorali e una potenziale incidenza maggiore di malattie cardiovascolari (Ashraf et al., 2020).

La sua supplementazione si è rivelata potenzialmente utile nel trattamento della dermatite atopica, nella colite ulcerosa e nel morbo di Crohn ed è, in generale, preventivamente consigliata in tutti i casi in cui sia necessario prevenirne una carenza (es. neonati prematuri, donne in allattamento e in menopausa, anziani, in caso di scarsa o nulla esposizione solare, soggetti in terapia a lungo termine con anticonvulsivanti o corticosteroidi, soggetti con particolari patologie digestive ed epatiche) (Mannina et al., 2019).

Le fonti alimentari di vitamina D3 più importanti sono proprio alcuni pesci grassi (aringa, tonno, sardine, salmone, etc.), mentre in altri alimenti di origine animale (come fegato di bovini e suini, tuorlo d'uovo, etc.) è contenuta in percentuali minori.

Per quanto riguarda gli integratori alimentari, l'apporto giornaliero massimo di vitamina D è pari a circa 25 microgrammi⁷.

❖ **CHITINA E CHITOSANO**

Dopo la cellulosa, la chitina (poli β 1-4 N-acetil-D-glucosamina), è il secondo polimero naturale più abbondante sulla terra e può essere estratta da sottoprodotti della lavorazione del pesce, specialmente dei crostacei.

⁷ Valori stabiliti da: "Apporti giornalieri di vitamine e minerali ammessi negli integratori alimentari", Revisione aprile 2019 (DIREZIONE GENERALE PER L'IGIENE E LA SICUREZZA DEGLI ALIMENTI E LA NUTRIZIONE, UFFICIO 4). URL: <http://www.salute.gov.it/portale/home.html>

Circa 10^{12} - 10^{14} tonnellate di chitina vengono prodotte ogni anno da organismi viventi oceanici (Dhillon et al., 2013).

Dal punto di vista chimico, la chitina, è un polisaccaride costituito da più unità di glucosammina e di N-acetilglucosammina (N-acetil-D-glucoso-2-ammina), legate tra di loro con un legame di tipo β -1,4.

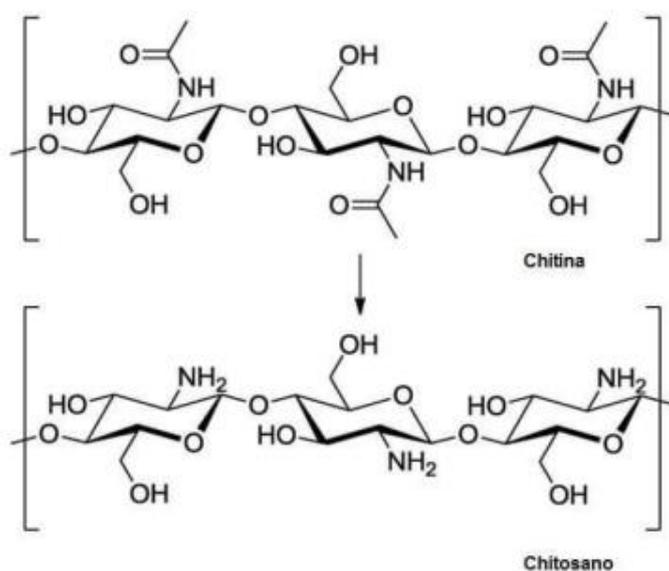


Figura 5 Strutture chimiche di chitina e chitosano
(Estrapolata da <https://www.chimica-online.it/organica/chitina.htm>)

Un derivato della chitina è il chitosano (β 1-4 2-amino-2-desossi-D-glucano), ricavato dalla deacetilazione parziale della chitina con metodi chimici o biologici.

Le biomolecole di chitina e i suoi derivati hanno un'eccellente biodegradabilità e biocompatibilità con l'organismo umano e, oltre a ciò, hanno dimostrato avere numerose proprietà biologiche (antimicrobiche, antitumorali, anticoagulanti, antiossidanti, antimutagene, ipocolesterolemizzanti...) (Kim e Mendis, 2006).

Chitina e chitosano hanno entrambi un enorme valore economico in virtù delle loro numerose e variegata proprietà biologiche, ma la cristallinità e l'insolubilità in acqua e in numerosi solventi organici della chitina ne inficiano, spesso, le applicazioni commerciali. Quindi, la conversione della chitina in derivati quali il chitosano, i chitooligosaccaridi e la glucosammina, ne aumentano le possibilità di applicazioni

industriali nel settore agro-alimentare, tessile, farmaceutico e cosmetico.

In particolar modo il chitosano è un biopolimero naturale dalle applicazioni infinite: anche se in realtà la variabilità del peso molecolare e del grado di acetilazione non permettono la produzione di un composto sempre riproducibile, negli ultimi anni, la sua applicazione, soprattutto come biomateriale, è aumentata (Mannina et al., 2019). A solo titolo di esempio, nel settore agro-alimentare, le possibili applicazioni della chitina e dei suoi derivati spaziano dall'utilizzo in prodotti alimentari a valore aggiunto (es. ingrediente di integratori alimentari), alla conservazione degli alimenti, alla formazione di pellicole biodegradabili, al recupero di materiale di scarto da reflui, fino alla purificazione dell'acqua e alla chiarifica e deacidificazione dei succhi di frutta (Muzzarelli C. et al., 2003; Shahidi F. et al., 1999).

La chitina, in natura, è presente in tre diversi tipi di forme cristalline (tre forme allomorfe) α , β e γ , con grado diverso di deacetilazione (Khoushab e Yamabhai, 2010). Nell' α -chitina le catene polimeriche adiacenti hanno direzioni diverse e sono anti-parallele; nella β -chitina, le catene adiacenti sono parallele e hanno la stessa direzione, mentre nella γ chitina, la terza catena ha una direzione opposta rispetto alle due precedenti (Azuma et al., 2015). Ad oggi, l' α -chitina è ritenuta essere l'allomorfo più abbondante e si trova in strutture dure, mentre β - e γ -chitina si trovano in strutture più flessibili (Jang et al., 2004).

La chitina è solitamente isolata dagli esoscheletri di crostacei e, più in particolare, da gamberetti e granchi, nei quali la forma α è la più abbondante (Yadav et al., 2019).

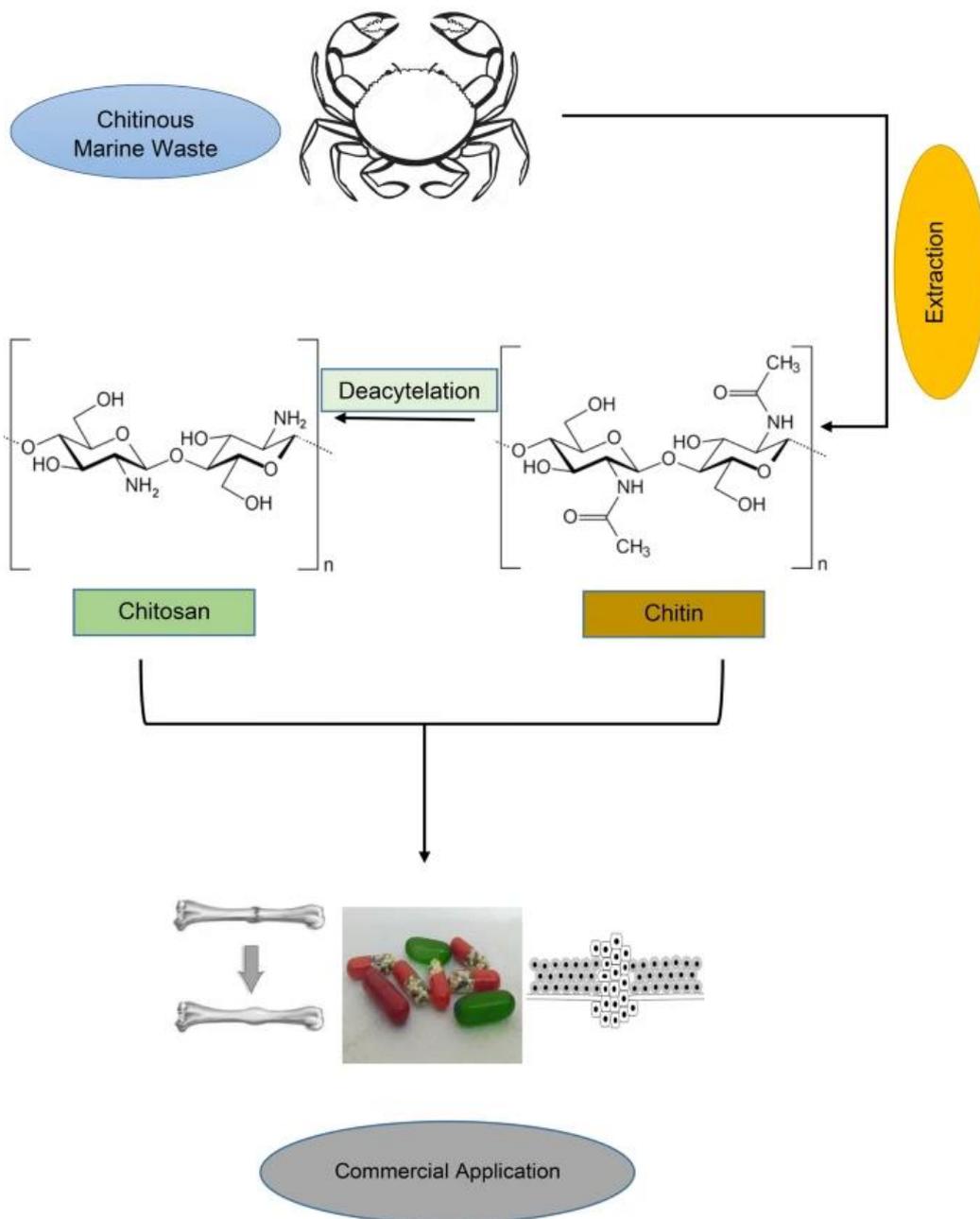


Figura 6 Estrazione di chitina e chitosano dai crostacei
 (Estrapolata dal lavoro di Yadav, M., Goswami, P., Paritosh, K. et al. *Seafood waste: a source for preparation of commercially employable chitin/chitosan materials*. *Bioresour. Bioprocess.* **6,8** (2019).
<https://doi.org/10.1186/s40643-019-0243-y>)

L'esoscheletro, organizzato come un tessuto multistrato elastico altamente resistente, che stabilizza l'intero corpo dell'animale e lo preserva dai predatori, è formato da una struttura biomineralizzata composta da una matrice zuccherina (normalmente α -

chitina) assemblata con un minerale inorganico quale il carbonato di calcio o di magnesio. La struttura cristallina della forma α è strettamente compatta grazie alla posizione antiparallela delle catene che favorisce la formazione di forti legami idrogeno inter-catena (Morganti et al., 2014).

Un'altra importante fonte di chitina sono i calamari, nei quali, invece, si trova prevalentemente la forma isomorfa β che presenta una migliore solubilità, reattività e affinità con i solventi oltre ad una maggiore capacità di rigonfiamento rispetto alla α -chitina. Queste caratteristiche sono dovute ai più deboli legami idrogeno intermolecolari attribuibili alla disposizione parallela delle catene principali (Yadav et al., 2019). Meno descritta in letteratura, ad oggi, è la terza forma, la γ .

- α -CHITINA** si trova negli artropodi e in alcuni funghi ed è sicuramente la forma più diffusa in natura; le catene adiacenti, unite tra loro da legami a idrogeno, sono tutte antiparallele;
- β -CHITINA** è presente solo in alcune specie particolari; le catene adiacenti sono tutte parallele;
- γ -CHITINA** anch'essa è presente solo in alcune specie particolari; la disposizione delle catene adiacenti è alternativamente di tipo parallelo e antiparallelo, schematizzabile con il simbolo $\uparrow\uparrow\downarrow$.

Figura 7 Caratteristiche dei diversi tipi di chitina
(Estrapolata dal lavoro di Alloisio, M. 2013. Biopolimeri. AIM testi. Nuova Cultura. <https://books.google.it/books?id=4-VWAgAAQBAJ>)

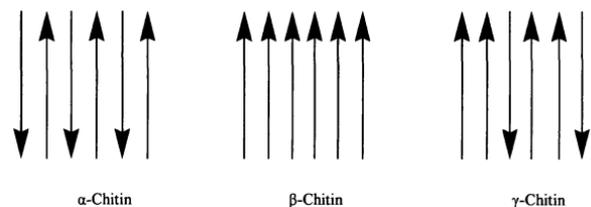


Figura 8 Struttura dei diversi tipi di chitina
(Estrapolata dal lavoro di Watson, Helen R. (2008) *The isolation of useful bioproducts remaining from the large-scale fermentation of penicillium chrysogenum*, Durham theses, Durham University. Available at Durham E-Theses Online: <http://etheses.dur.ac.uk/2078/>)

In accordo con il lavoro del 2014 di Morganti et al., per via delle loro varie proprietà tecnologiche e funzionali, la chitina e i suoi derivati hanno svariati campi di applicazione, oltre a quello alimentare/dietetico già citato in precedenza, quali:

- Nell'applicazione biomedica vengono utilizzati per la ricostituzione artificiale di alcuni tessuti come pelle, ossa e cartilagine.
- Nel campo farmaceutico sono sfruttati come eccipienti per i farmaci.

❖ *PIGMENTI NATURALI*

Citando, a titolo di esempio, il lavoro del 2020 di Ashraf et al., nel pesce sono contenuti carotenoidi (come gli altri organismi superiori non sono in grado di sintetizzarli e li debbono assumere con la dieta.), i quali sono pigmenti liposolubili; quelli più comunemente trovati sono:

1. Luteina
2. Beta-carotene
3. Alfa- e Beta-doradexantine
4. Zeaxantina
5. Cantaxantina
6. Astaxantina

I carotenoidi hanno importanti proprietà antiossidanti in quanto potenzialmente riducono lo stress ossidativo associato a diverse malattie (tumori, patologie cardiovascolari e neurologiche). Oltre a ciò, presentano potenziali proprietà antiaterogeniche (prevenendo l'ossidazione delle LDL) e sono utili coadiuvanti nel trattamento di pazienti affetti da psoriasi e malattie infiammatorie della cute. Nell'industria cosmetica sono impiegati come additivi in creme e lozioni solari. (Ashraf et al. 2020)

L'astaxantina (3,3-diidrossi- β , β -carotene-4,4-dione), è il principale carotenoide dei pesci (es. salmone, orata) marini e di acqua dolce e rappresenta il 74–98% del totale dei pigmenti nei gusci dei crostacei (es. aragosta, gamberetti, granchi e krill); la sua struttura contiene gruppi funzionali sia chetonici che idrossilici e una catena di doppi legami coniugati, responsabili delle sue eccellenti proprietà antiossidanti. A titolo di esempio, si riportano le rese (espresse come mg/100g) in astaxantina estratta da scarti di alcuni crostacei ottenute da alcuni autori (Nguyen et al., 2017).

È comunque importante ricordare che il contenuto di astaxantina nei crostacei varia a seconda della specie, della stagione e delle condizioni ambientali di coltivazione. I sottoprodotti dell'aragosta contengono, a parità di condizioni, una quantità di

astaxantina che è circa il doppio di quella contenuta nei gamberetti, come riportato nella Figura 9 estrapolata dal lavoro del 2017 di Nguyen et al.

Source	Total astaxanthin (mg/100 g)
Shrimp (<i>P. borealis</i>)	4.97
Crawfish (<i>P. clarkii</i>)	15.30
Backs snow crab (<i>Ch. opilio</i>)	11.96
Lobster (<i>Homarus americanus</i>)	9.80

Figura 9. Resa in mg/100 g di Astaxantina dai crostacei
(Estrapolata dal lavoro di Nguyen, T.T., Barber, A.R., Corbin, K. et al. *Lobster processing by-products as valuable bioresource of marine functional ingredients, nutraceuticals, and pharmaceuticals. Bioresour. Bioprocess.* **4**, 27 (2017) <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0157-5>)

L'astaxantina è ampiamente utilizzata nell'industria alimentare e farmaceutica come precursore di coloranti, antiossidanti e della vitamina A e alcuni studi ne evidenziano potenziali attività antitumorali e immunostimolanti (Ashraf et al. 2020).

❖ **ELEMENTI MINERALI**

I minerali inorganici, generalmente, costituiscono circa il 60% delle ossa di pesce (lische); questa abbondanza è dovuta alla capacità dei pesci di ottenere composti inorganici dall'acqua. Le lische, infatti, sono un'importante fonte di idrossiapatite, $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$, con un rapporto molare Ca / P = 1,67), calcio, fosforo, zinco e ferro, utilizzabili come integratori alimentari.

L'idrossiapatite estratta da fonti naturali presenta un'eccellente bioattività, osteoconduttività e osteoinduttività e, in generale, ha caratteristiche migliori come biomateriale rispetto a quella sintetica (Boutinguiza et al., 2012), trovando largo impiego in applicazioni mediche o odontoiatriche (Ghaly et al., 2013).

Dalla carne del pesce si possono ottenere, inoltre, sodio, potassio, calcio, magnesio, zolfo, rame e iodio, che risultano essere elementi essenziali di molte reazioni biochimiche che avvengono a livello dell'organismo umano (Ashraf et al. 2020).

Sebbene i composti sopra menzionati siano i più importanti tra quelli estraibili dagli scarti ittici, essi non ne rappresentano una lista esaustiva. Alcune molecole bioattive estraibili, ma non citate in questa tesi, sono menzionate in Figura 10 e per un loro approfondimento si rimanda alla letteratura citata nella didascalia della figura stessa.

Nutraceutical/Bioactive Components	Fish Species Rich in Specific Bioactive Components	Therapeutic Efficacy and Clinical Implications
Fatty Acids		
Omega 3	Mackerel, Spiny dogfish, Black halibut, Salmon, Sardines	Anti-inflammatory, cardio-protective effects, visual and neurodevelopment, different cancers (breast, colorectal, prostate, etc.), asthma, inflammatory bowel disease, rheumatoid arthritis and osteoporosis, improve insulin sensitivity
Omega 6	Arctic Char, Sardine, Fried Calamari, Anchovies	Reduce risk of cardiovascular problems, ameliorate diseases such as arthritis and hypertension, increases vascular adhesion molecule-1 expression, oxidation, platelet aggregation, vasoconstriction, eicosanoid synthesis
Amino Acids		
Arginine	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Required for the detoxification of ammonia, nutritionally essential for spermatogenesis, embryonic survival, fetal and neonatal growth, as well as maintenance of vascular tone and hemodynamics
Histidine	<i>Rastrelliger kanagurta</i> , <i>Catla catla</i>	Precursor for several hormones (thyrotropin-release hormone), critical metabolite for renal functions, neurotransmission, gastric secretion and immune system, antioxidant and anti-inflammatory properties, important for the regulation and metabolism of trace elements as well as precursor of histamine
Isoleucine	<i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Labeo rohita</i>	Help in muscle formation and proper growth
Lysine	<i>Stolephorus waitei</i> , <i>Rastrelliger kanagurta</i> , <i>S. commersonii</i>	Needed for optimal growth and to act as an immunomodulator, prevention and treatment of cold sores
Methionine	<i>Stolephorus waitei</i> , <i>Tor putitora</i>	Used at multiple levels in cellular metabolism, as a protein constituent, in the initiation of mRNA translation, and as a regulatory molecule in the form of S-adenosylmethionine
Phenylalanine	<i>Cirrhinus mrigala</i> , <i>Catla catla</i>	Precursor for tyrosine
Threonine	<i>Thunnus albacores</i> , <i>Nemipterus japonicus</i>	Plays a critical role in the maintenance of intestinal mucosal integrity and barrier function
Tyrosine	<i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Tor putitora</i>	Precursor of dopamine and norepinephrine
Valine	<i>Nemipterus japonicus</i> , <i>Cirrhinus mrigala</i>	Protein synthesis, glucose homeostasis, anti-obesity, and nutrient-sensitive signaling pathways
Glutamine	<i>Cirrhinus mrigala</i> , <i>Catla catla</i> , <i>Labeo rohita</i>	Act as substrate for nucleotide synthesis (purines, pyrimidines, and amino sugars), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), antioxidants, and many other biosynthetic pathways involved in the maintenance of cellular integrity and function
Glycine	<i>Cirrhinus mrigala</i> , <i>Catla catla</i> , <i>Labeo rohita</i>	Help in regulation of gene expression, protein configuration and activity, and several biological functions, such as glutathione synthesis. Low plasma glycine concentrations have been consistently reported in association with obesity and type 2 diabetes
Proline	<i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Tor putitora</i>	Important role in differentiation of cells as well as fetus and associated with extra-embryonic membrane and development
Alanine	<i>Polypedates maculatus</i>	Helps in biosynthesis of proteins, serves as an important carbon source for hepatic gluconeogenesis
Aspartic acid	<i>Labeo niloticus</i>	Treatment for chronic fatigue due to the role it plays in generating cellular energy
Glutamic acid	<i>Labeo niloticus</i>	Surfactants, buffer, chelating agents, flavor enhancer, agriculture, acts as fuel, immune function
Leucine	<i>Lethrinus harak</i>	Leucine promotes energy metabolism (glucose uptake, mitochondrial biogenesis, and fatty acid oxidation) to provide energy for protein synthesis, while inhibiting protein degradation
Serine	<i>Mugil cephalus</i>	Cellular homeostasis, proliferation, and differentiation
Vitamins		
Vitamin A	<i>Amblypharyngodon mola</i>	Growth promoter, helps in poor eyesight, helps in bone growth
Vitamin D	<i>Amblypharyngodon mola</i> , <i>Sardinella longiceps</i>	Rickets, osteomalacia, improve bone density
Vitamin B Complex	Black sea fish, Shellfish	Responsible for converting food to energy in the cells of the body and helps with the function of nerve tissue
Minerals		
Iron	<i>Sperata seenghala</i> , <i>Rita rita</i>	Help in synthesis of hemoglobin in red blood cells
Zinc	<i>Sperata seenghala</i> , <i>Rita rita</i>	Important role in growth and development as well in the proper functioning of the immune system and for healthy skin. Helps in cell division, cell growth, wound healing, and breakdown of carbohydrates. Essential for senses of smell and taste
Calcium	<i>Xenentodon cancila</i> , <i>Gudusia chapra</i>	Essential for strong bones (formation and mineralization) and for the normal functioning of muscles and the nervous system
Iodine	-	Important for hormones that regulate body metabolism, and in children it is required for growth and normal mental development
Carotenoids		
Astaxanthine, Beta carotene, Zeaxanthin and lutein	Freshwater fish, red fishes, and other fishes	Antioxidant, cancer, neurological disorder, cardiovascular, anti-atherogenic, ophthalmology, psoriasis, preservative, cosmetics
Other Bioactive Components		
Bioactive Peptides	Fish protein, fish by-products, and muscle	Antihypertensive, antioxidant, antimicrobials, and anti-proliferative effects
Chitin and Chitosan	Fish waste product (fish scale)	Wound healing accelerator, reduces blood cholesterol levels, anti-ulcer agent, anti-ageing, cosmetics, ophthalmology
Chondroitin	Fish waste product	Osteoarthritis, dietary supplement
Glucosamine	Fish waste product	Anti-inflammatory, osteoarthritis, dietary supplement
Gelatin	Fish waste product	Pharmaceutical industries, food industries, microencapsulation of vitamin, stabilizer in dairy products, cosmetics
Collagen	Fish waste product	In osteoarthritis, hypertension, tissue engineering, antioxidant, anti-hypertensive, and anti-skin ageing
Squalene	<i>Scardinius erthrophthalmus</i> , <i>Tinca tinca</i>	Cardio-protective, antioxidant, anti-bacterial, antifungal, and anticancer

Figura 10 Lista dei componenti bioattivi ottenibili dal pesce e dai suoi prodotti di scarto

(estrapolata dal lavoro di Ashraf, Syed Amir, Mohd Adnan, Mitesh Patel, Arif Jamal Siddiqui, Manojkumar Sachidanandan, Mejd Snoussi, e Sibte Hadi. 2020. «Fish-Based Bioactives as Potent Nutraceuticals: Exploring the Therapeutic Perspective of Sustainable Food from the Sea». *Marine Drugs* 18 (5): 265. <https://doi.org/10.3390/md18050265>.)

3 CAPITOLO 3

Per riuscire ad utilizzare le risorse ittiche in modo responsabile ed efficiente è indispensabile stabilire metodi funzionali e sicuri per l'estrazione dei nutrienti e di altri composti bioattivi.

Ad oggi, la lavorazione di tale biomassa comprende tecniche convenzionali (ad esempio estrazioni con solventi organici, con soluzioni acide e basiche, etc..) già ampiamente consolidate per la produzione di farine e oli di pesce o derivati quali acidi grassi della serie omega-3.

Questi metodi, sebbene efficienti, presentano alcuni svantaggi importanti, come l'elevato consumo di energia, la possibile degradazione termica dei prodotti finali (a causa delle elevate temperature di lavorazione), l'utilizzo di solventi organici di estrazione (i cui eventuali residui possono comportare rischi per la salute umana e dell'ambiente) e i lunghi tempi di lavorazione (Al Khawli et al., 2019).

Dunque, negli ultimi anni, sono stati introdotti metodi innovativi 'Green' per l'estrazione dei composti naturali citati nel capitolo precedente, al fine di aumentare l'efficienza produttiva, ma anche ridurre i consumi e l'impatto ambientale.

Indipendentemente dalle metodiche estrattive utilizzate, la preparazione degli UWC o dei residui di pesce, in accordo con il lavoro del 2013 di Ghaly et al., comporta alcuni step procedurali comuni quali:

- la pulizia
- la separazione delle diverse parti animali
- la riduzione delle dimensioni mediante taglio o macinazione dei campioni ed un eventuale pretrattamento chimico per rimuovere alcune frazioni proteiche, minerali o lipidiche a seconda del target finale desiderato.

Nelle meduse, ad esempio, è pratica comune separare i tentacoli dall'ombrello e, quest'ultimo separarlo a sua volta in mesoglea, esombrella e subombrella (Ghaly et al., 2013). Nel caso dei pesci, si suddividono le pelli, le squame, le pinne e lisce di pesce, poiché la loro composizione chimica è diversa (ad es. per estrarre il collagene dalle lisce e dalle squame di pesce sarà necessario procedere preventivamente ad un processo di

demineralizzazione).

In qualsiasi caso, la macinazione per ridurre le dimensioni del materiale da trattare è un passo fondamentale.

3.1 Metodi di estrazione tradizionali

3.1.1 Estrazione mediante solvente

È il metodo più comune impiegato sia per l'estrazione della frazione proteica sia di quella lipidica dagli scarti del pesce. Secondo quanto riportato dal lavoro del 2013 di Ghaly et al., sono descritte numerose procedure estrattive solido-liquido con l'ausilio di solventi organici. A titolo di esempio, per quanto riguarda l'estrazione della frazione proteica, si fa riferimento ad una e si rimanda, per le altre, alla lettura del lavoro citato. Una procedura "tipo" prevede che il campione venga trattato come segue:

1. Gli scarti di pesce sono sottoposti a macinazione e sottoposti a tre estrazioni (solido-liquido) secondo il seguente schema:
 - a. La prima estrazione viene effettuata a 20-30 °C per 50 minuti in isopropanolo.
 - b. La seconda estrazione (eseguita sul surnatante della prima) è effettuata a 75 °C per 90 minuti sempre con isopropanolo.
 - c. La terza estrazione (eseguita sul surnatante della seconda) a 75°C gradi per 70 minuti con isopropanolo azeotropico.
2. La frazione surnatante finale viene raccolta, seccata, macinata e vi si rimuovono eventuali componenti ossee mediante ispezione visiva.

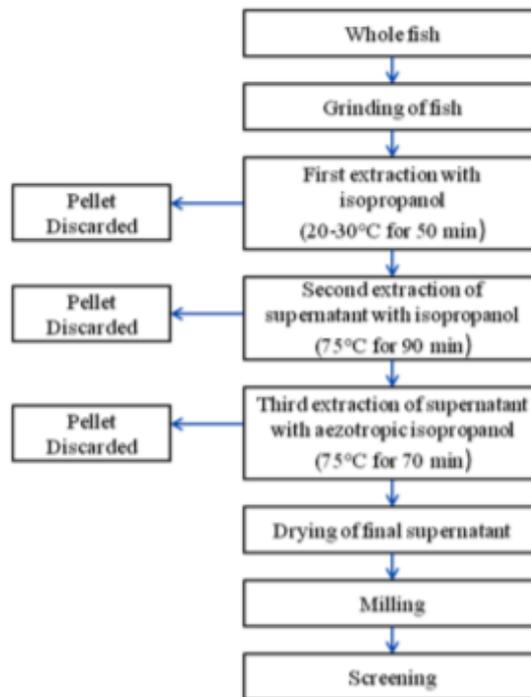


Figura 11 Meccanismo di estrazione mediante solvente

(Estrapolata dal lavoro di Brooks MS, Ramakrishnan VV. 2013. «Fish Processing Wastes as a Potential Source of Proteins, Amino Acids and Oils: A Critical Review». *Journal of Microbial & Biochemical Technology* 05 (04). <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000110>)

Questo metodo presenta numerosi svantaggi tra cui la scarsa funzionalità, gli elevati costi di produzione, la presenza di tracce di solvente nel prodotto estratto e odori sgradevoli.

Per quanto riguarda la frazione lipidica, invece, l'olio può essere estratto dagli scarti di pesce utilizzando numerosi metodi descritti in letteratura ed è altresì importante lavorare a basse temperature al fine di evitare degradazioni ossidative.

Il metodo estrattivo a freddo più comune e datato è quello sviluppato da Folch et al. nel 1957 e si basa sul partizionamento di metaboliti polari e idrofobici mediante l'uso di cloroformio e metanolo (Salem et al. 2017). Seguendo il lavoro di Folch et al., 1.5 g di materiale proveniente dal pesce viene addizionato a 30 ml di una soluzione costituita da cloroformio e metanolo in un rapporto di 2:1. La miscela estratta viene lavata più volte utilizzando nuovamente la soluzione di cloroformio e metanolo (sempre in un rapporto 2:1) e addizionando una debole soluzione salina contenente NaCl al 0.88%. Si avrà, dunque, una soluzione bifasica: una fase superiore contenente acqua e metanolo, e una inferiore costituita da cloroformio e porzione lipidica del campione. Il tutto viene

centrifugato e lo strato inferiore sarà poi raccolto in un recipiente preventivamente tarato: a questo punto, il cloroformio viene fatto evaporare e il contenuto lipidico sarà infine valutato per via gravimetrica (Folch et al., 1957; Ghaly et al., 2013).

3.1.2 Estrazione mediante idrolisi enzimatica

La tecnica di idrolisi enzimatica è largamente impiegata per il recupero di olio e proteine (e derivati) dai prodotti di scarto del settore ittico. Numerosi studi, infatti, riportano come l'estrazione mediante idrolisi enzimatica garantisca rese di estrazione migliori soprattutto per quanto riguarda le sostanze lipidiche (olio dagli scarti del pesce) e che possa, dunque, competere con la tradizionale estrazione mediante solvente (Ivanovs e Blumberga, 2017). In questa metodica, vengono impiegati enzimi esogeni al pesce in grado di attuare un processo di digestione del campione in maniera controllata e riproducibile: quelli principalmente utilizzati sono proteasi alcaline o neutre, usualmente favorite rispetto alle proteasi acide in quanto garantiscono rese migliori.

In particolar modo il recupero di olio dipende molto dalla tipologia di proteasi impiegata, dalla concentrazione, dalla temperatura e dal pH.

A titolo di esempio si può citare il lavoro del 2004 di Linder et al., in cui sono state studiate le capacità di estrarre l'olio contenuto nelle teste di salmoni utilizzando tre differenti tipologie di enzimi:

1. Proteasi neutre
2. Proteasi alcaline
3. Flavorzima

Il processo è stato condotto in un reattore termostato dotato di un agitatore e al di sotto di un flusso di azoto (per minimizzare la degradazione ossidativa dei lipidi). I campioni, preventivamente macinati, sono stati sottoposti all'azione enzimatica nelle seguenti condizioni di temperatura e pH per circa 2 ore:

1. Proteasi neutre a 45°C, pH 7
2. Proteasi alcaline (alcalasi) a 55°C, pH 7.5
3. Flavorzima a 50°C, pH 7.5

La resa in olio utilizzando le preparazioni enzimatiche sopracitate dalla prima alla terza è risultata rispettivamente del 17.2, 17.0 e 17.4 % (Ghaly et al., 2013).

La lavorazione enzimatica di diversi biopolimeri contenuti negli alimenti è un processo importante usato per migliorare le proprietà fisiche, chimiche e organolettiche dell'alimento, in relazione al valore nutrizionale e alle caratteristiche di assorbimento intestinale.

L'estrazione enzimatica delle proteine è condotta a pH controllato, prevenendo la degradazione delle qualità nutritive (possibile degradazione dovuta ad esempio alla reazione di Maillard). Molte proteine, infatti, sono sottoposte a processi enzimatici al fine di essere impiegate, in forma idrolizzata, per diete speciali per lattanti, per persone in stati fisiologici particolari (come per esempio anziani, sportivi agonisti, etc.) o per soggetti affetti da determinate patologie, rispettando parametri specifici (poco amare, osmoticamente equilibrate, ipoallergeniche, etc.) (Ghaly et al., 2013).

Nonostante il largo impiego dell'idrolisi enzimatica in numerosi settori (a partire da diverse fonti alimentari), c'erano, fino a poco tempo fa, ancora pochi studi sull'estrazione enzimatica e successiva idrolisi di proteine a partire da scarti di pesce, ma, negli ultimi anni, si sta assistendo a una controtendenza e i lavori pubblicati in letteratura sono in continuo aumento (Ghaly et al., 2013). Risulta complicato, tuttavia, applicare il processo a produzioni su larga scala: l'estrazione mediante idrolisi enzimatica ha, purtroppo, numerosi svantaggi, come per esempio le basse rese, gli elevati costi delle preparazioni enzimatiche impiegate e la loro possibile inattivazione per via dell'idrolisi, del calore o del pH.

Gli enzimi principalmente impiegati nell'industria alimentare per la preparazione di proteine idrolizzate da scarti ittici sono proteasi, ma a causa dell'impossibilità di star dietro alla domanda di mercato nel reperire proteasi sia animali sia vegetali, si sta assistendo ad un aumento della domanda di proteasi di origine batterica, per le quali, tuttavia, è necessario assicurare la totale mancanza di tossicità (Ghaly et al., 2013).

In accordo con il lavoro del 2013 di Ghaly et al., usualmente, nel processo di estrazione enzimatica, il materiale di origine marina da sottoporre ad estrazione viene finemente macinato; dopodiché i campioni vengono scaldati a circa 90°C per pochi minuti al fine di disattivare eventuali enzimi endogeni. Vengono poi modificate sia la temperatura sia il

pH dei campioni secondo questo schema generale in funzione della tipologia di preparazione enzimatica utilizzata:

- 55°C e pH 8 se vengono impiegate proteasi alcaline.
- 45°C e pH 6.5 per proteasi neutre.

Le percentuali di enzimi utilizzati, i tempi di contattato e le operazioni successive sono ottimizzate a seconda della tipologia di scarto in esame.

3.2 Metodi di estrazione 'Green'

In accordo con quanto riportato dal lavoro del 2012 di Chemat et al., di seguito vengono indicati quelli che sono i 'Sei principi dell'Estrazione Green di Prodotti Naturali':

- Principio 1 = Utilizzo di risorse rinnovabili
- Principio 2 = Utilizzo di solventi alternativi, biodegradabili, non tossici e non infiammabili
- Principio 3 = Riutilizzo dell'energia liberata nei processi di estrazione al fine di ridurre i consumi e introdurre eventuali processi innovativi.
- Principio 4 = Produrre co-prodotti (o sottoprodotti), non rifiuti
- Principio 5 = Ridurre il numero di operazioni al fine di attuare processi sicuri e controllati, riducendo i costi e aumentando efficienza energetica
- Principio 6 = Il prodotto estratto dovrà risultare inalterato, biodegradabile e non contaminato

Lo scopo è perciò minimizzare l'impatto ambientale ed economico della fase di estrazione in un impianto, scegliendo solventi non dannosi e facilmente smaltibili ed incrementando il grado di esaurimento della matrice da estrarre. Di fondamentale importanza è anche evitare processi che richiedano alte pressioni o temperature aumentando così l'efficienza energetica.

I principali metodi ‘Green’ utilizzati per l'estrazione di composti bioattivi da sottoprodotti della pesca sono sostanzialmente tre:

- Estrazione con fluidi supercritici (SFE)
- Estrazione assistita con microonde (MAE)
- Estrazione assistita con ultrasuoni (UAE)

Sebbene queste tecnologie, nel corso degli ultimi 20 anni, siano state riconosciute come un'importante alternativa ai metodi di estrazione tradizionali, ad oggi necessitano di ulteriori ricerche (Ivanovs e Blumberga, 2017) per valutarne al meglio l'impatto ambientale ed economico.

3.2.1 Supercritical Fluid Extraction (SFE)

Un fluido supercritico è un qualsiasi elemento, o una qualsiasi sostanza, che viene riscaldato e pressurizzato rispettivamente al di sopra della sua temperatura critica (T_c) e della sua pressione critica (P_c) (Moret et al., 2014).

Di conseguenza, l'utilizzo di un fluido supercritico, come per esempio il biossido di carbonio (o anidride carbonica, CO_2), consente di evitare l'impiego di solventi organici che potrebbero risultare tossici, garantendo una lavorazione più sostenibile e un minore impatto ambientale con un ridotto consumo energetico.

Utilizzato nelle sue condizioni supercritiche, il biossido di carbonio risulterà avere una densità comparabile a quella dei solventi organici utilizzati nelle tecniche estrattive tradizionali, ma avrà una viscosità nettamente inferiore che gli consentirà di penetrare più facilmente nella matrice del campione: pertanto, le tempistiche di estrazione saranno notevolmente ridotte (Moret et al., 2014). Oltre a ciò, il biossido di carbonio risulta essere il solvente più utilizzato in SFE (acronimo di ‘Supercritical Fluid Extraction’) in ambito alimentare, in quanto non solo è economico e facilmente reperibile, ma soprattutto risulta privo di tossicità e non infiammabile (Al Khawli et al., 2019).

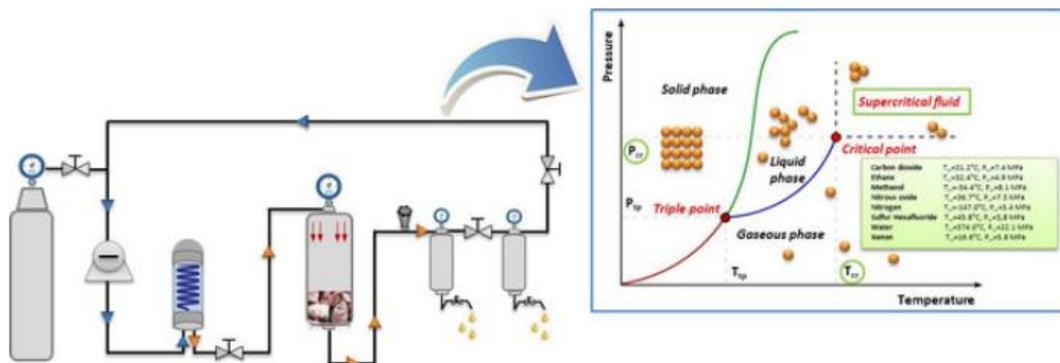


Figura 12 Rappresentazione schematica meccanismo di estrazione mediante fluido supercritico (Figura estrapolata dal lavoro di Al Khawli, Fadila, Mirian Pateiro, Rubén Domínguez, José M. Lorenzo, Patricia Gullón, Katerina Kousoulaki, Emilia Ferrer, Houda Berrada, e Francisco J. Barba. 2019. «Innovative Green Technologies of Intensification for Valorization of Seafood and Their By-Products». *Marine Drugs* 17 (12): 689. <https://doi.org/10.3390/md17120689>)

SFE è una tecnica ampiamente utilizzata in ambito alimentare per l'estrazione di composti quali vitamine liposolubili, pigmenti naturali e oli essenziali poiché evita l'impiego di solventi organici e lavorazioni ad alte temperature che potrebbero degradare le molecole target di estrazione. Ad oggi, è molto impiegata soprattutto nel settore ittico per l'estrazione di olio e di molecole ad azione antiossidante.

Secondo quanto riportato dal lavoro di (Al Khawli et al., 2019), questa metodica comporta numerosi vantaggi, tra cui:

- Non vengono utilizzati solventi organici
- Preserva la qualità della sostanza estratta
- Ha tempistiche veloci con alte rese di estrazione
- Il materiale estratto risulta privo di metalli pesanti e sali inorganici

D'altra parte, pur essendo una tecnica innovativa 'green', ha come svantaggi l'impossibilità di estrarre sostanze polari e l'attrezzatura necessaria è ancora costosa e complessa da utilizzare.

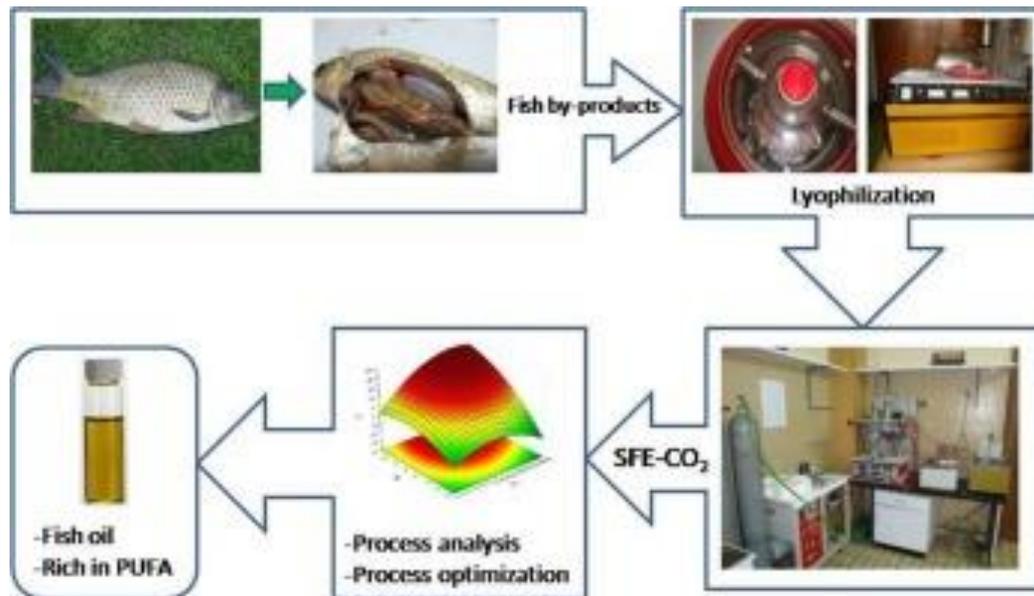


Figura 13 Estrazione olio di pesce mediante tecnica SFE-CO₂

(Figura estrapolata dl lavoro di: Stefan Kuvendziev, Kiril Lisichkov, Zoran Zeković, Mirko Marinkovski, Zehra H. Musliu, *Supercritical fluid extraction of fish oil from common carp (Cyprinus carpio L.) tissues*, *The Journal of Supercritical Fluids*, Volume 133, Part 1, 2018, Pages 528-534, ISSN 0896-8446, <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.11.027>)

In particolare, i costi elevati per l'estrazione della frazione oleosa da scarti ittici (es. oli di pesce: uno dei principali prodotti ricavati dai processi di lavorazione del pesce) sono anche spesso imputabili alla necessità di lavorare su materiale preventivamente liofilizzato al fine di ridurre l'umidità iniziale a valori inferiori al 20% e mantenere inalterati gli acidi grassi polinsaturi della serie omega-3, componenti preziosi degli oli di pesce (Rubio-Rodríguez et al. 2012)

La figura 14, estrapolata dall'articolo di Rubio-Rodriguez e collaboratori, schematizza il confronto da loro effettuato tra la SFE (in condizioni moderate: 25 MPa e 313 K) e tre tecniche convenzionali, quali:

- 1) la centrifugazione a freddo (o estrazione a freddo)
- 2) la "wet reduction" che prevede una cottura preliminare seguita da una pressatura ed una centrifugazione
- 3) l'estrazione enzimatica, impiegata nell'estrazione di oli di pesce da ritagli di filettatura di salmone, di nasello, di pesce specchio e da fegato di totani giganti del Pacifico.

Riportando per ciascuna metodica le condizioni sperimentali utilizzate, gli autori hanno dimostrato la superiorità della SFE rispetto alle tre tecniche convenzionali, soprattutto nella qualità degli estratti ottenuti, con particolare riferimento ad una riduzione della frazione ossidata, in particolare nell'olio di salmone, e una contemporanea riduzione delle impurità co-estratte (Rubio-Rodríguez et al. 2012)

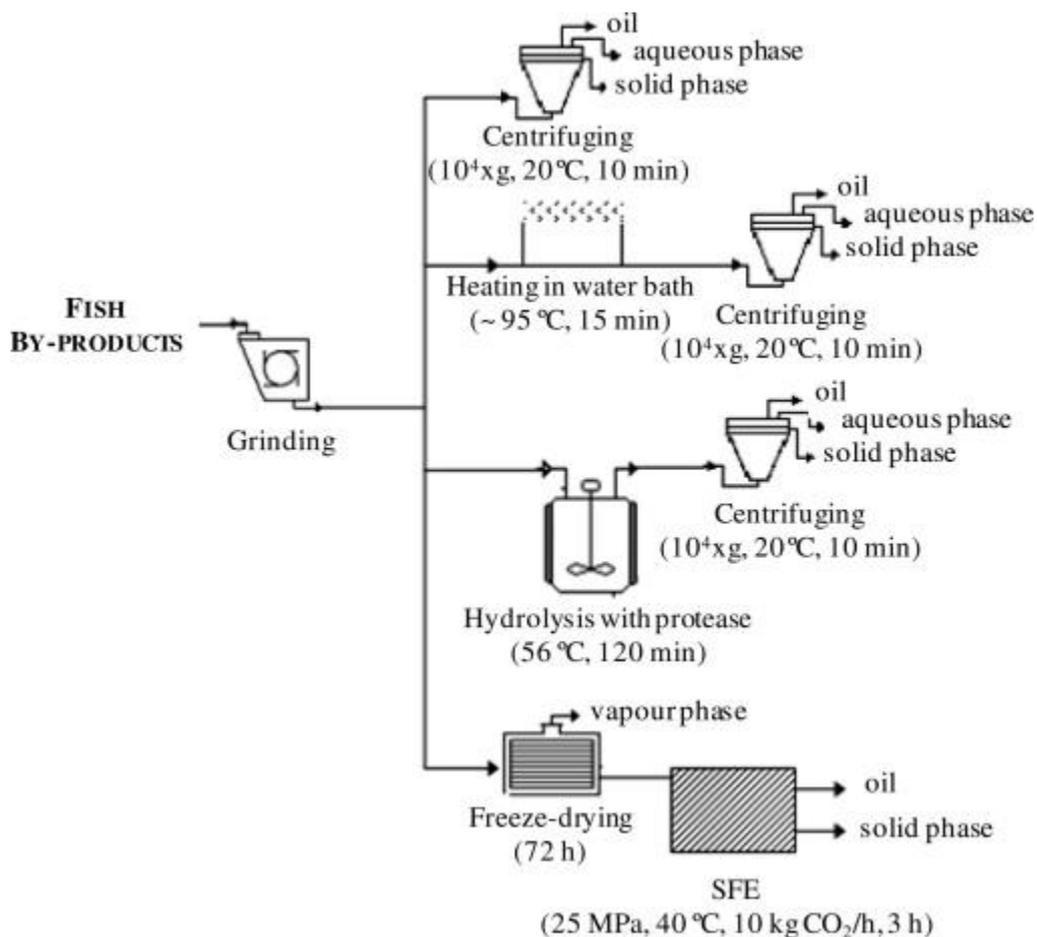


Figura 14 Schema dei diversi processi di estrazione dell'olio di pesce
 (Estrapolata dal lavoro di Rubio-Rodríguez, Nuria, Sara M. de Diego, Sagrario Beltrán, Isabel Jaime, María Teresa Sanz, e Jordi Rovira. 2012. «Supercritical Fluid Extraction of Fish Oil from Fish By-Products: A Comparison with Other Extraction Methods». *Journal of Food Engineering* 109 (2): 238–48.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.10.011>.)

È stato dimostrato, nel lavoro del 2019 di Al Khawli et al., come l'applicazione della metodica SFE nella filiera produttiva della farina di pesce (uno dei principali prodotti

ricavati dai processi di lavorazione del pesce) fornisca una valida alternativa per l'estrazione e la separazione degli oli (in generale della frazione lipidica) dalla farina stessa, consentendo così la produzione di farine di pesce ricche in proteine, con un profilo amminoacidico bilanciato e una bassa frazione lipidica (Al Khawli et al., 2019). L'estrazione mediante fluidi supercritici (SFE), dunque, consente di ridurre il contenuto di grassi nella farina di pesce senza avere alcun impatto sulla qualità delle proteine in essa contenute.

Studi dimostrano che l'estrazione mediante SFE conferisca all'olio, derivato da material ittici, una maggiore stabilità all'ossidazione rispetto alle metodiche tradizionali, che tendono, invece, a favorirne il processo di ossidazione (Al Khawli et al., 2019).

Secondo quanto riportato nel 2019 da Al Khawli et al., la tecnica SFE viene impiegata anche per l'estrazione di PUFA dalle teste del tonno. L'olio proveniente dalle teste di tonno, infatti, oltre ad essere ricco di acidi grassi poliinsaturi, contiene anche numerosi acidi grassi saturi e impurezze che possono essere estratte e, dunque, separate mediante l'impiego della tecnica SFE associata ad etanolo come co-solvente. In questo processo, l'olio di pesce viene estratto e raccolto in sei frazioni, divise sulla base del peso molecolare: gli acidi grassi a catena corta vengono estratti subito, mentre acidi grassi a catena lunga (soprattutto MUFA e PUFA) vengono estratti nelle fasi terminali del processo. È stato, infine, dimostrato come l'associazione SFE-etanolo consenta di ottenere una maggiore concentrazione di PUFA garantendo benefici nutrizionali ed economici, riducendo anche l'impatto ambientale (Al Khawli et al., 2019).

Recentemente, si sta valutando la possibilità di eventuali effetti combinati tra SFE e SWH (sub-critical water hydrolysis), come esempio di tecniche estrattive utilizzate in serie, al fine di ottenere materiali preziosi dalle viscere di calamaro. SWH è considerata come una 'green technology' emergente che, anziché impiegare solventi organici consente di utilizzare acqua alle sue condizioni subcritiche, ossia viene impiegata in un range di T tra i 100-374°C e la pressione applicata varia in un range da 0.10-22MPa (Rahman et al., 2019). Questo metodo, dunque, permette l'estrazione di componenti bioattivi ionici (polari e non polari) e presenta numerosi campi di applicazione per l'estrazione di peptidi e amminoacidi dagli scarti animali. Infatti, l'applicazione del processo sulle viscere di calamaro, liberate preventivamente dalla propria frazione lipidica (mediante precedente

estrazione con fluidi supercritici), conferma che applicare SFE prima di SWH consenta un incremento nel recupero degli amminoacidi del 50% (Rahman et al., 2019).

SFE, inoltre, è un metodo selettivo e preciso che consente anche l'isolamento di un'altra importante molecola bioattiva: l'astaxantina dai crostacei. L'uso di questa tecnica porta ad una resa che può arrivare fino al 98%, al contrario della resa media dell'84 % delle metodiche tradizionali (Al Khawli et al., 2019).

3.2.2 Microwave Assisted Extraction (MAE)

Le microonde (MW) sono una forma di energia elettromagnetica non ionizzante a frequenze comprese tra 300 MHz e 300 GHz. Questa energia viene trasmessa sottoforma di onde che possono penetrare nei biomateriali e interagire con le molecole polari, come l'acqua, generando calore. L'energia generata dalle microonde agisce direttamente sulle molecole per conduzione ionica e rotazione dipolare e, quindi, solo i materiali polari possono essere riscaldati in base alla loro costante dielettrica (Leonelli C. et al., 2010; Leonelli C. et al., 2013).

Nello spettro della radiazione elettromagnetica, la regione delle microonde si trova tra quella degli infrarossi e le onde radio. Al fine di prevenire qualsiasi interferenza con le frequenze dei telefoni cellulari e le telecomunicazioni, la frequenza di 2,45 GHz, che corrisponde a una lunghezza d'onda di 12,25 cm, viene utilizzata per tutti i forni a microonde domestici e per le sintesi chimiche (i forni a microonde utilizzano un generatore a magnetron per produrre microonde alla frequenza di circa 2,45 GHz) (G. Cravotto et al., 2017).

In particolare, l'estrazione assistita dalle microonde è una tecnica di estrazione 'Green' che si basa sull'utilizzo delle microonde per riscaldare la miscela campione-solvente in modo da rendere più semplice e rapida l'estrazione della/e sostanza/e bioattiva/e target (G.Cravotto et al., 2017) .

Nelle estrazioni convenzionali il trasferimento di massa avviene dall'interno verso l'esterno, sebbene il trasferimento di calore avvenga dall'esterno verso l'interno del substrato. Tuttavia, a differenza dell'estrazione convenzionale, in cui il calore viene

trasferito dal mezzo di riscaldamento all'interno del campione, nella MAE (acronimo di 'Microwave Assisted Extraction') il calore viene dissipato volumetricamente all'interno del mezzo irradiato. Mediante l'uso della MAE, infatti, il calore anziché agire su una superficie per poi penetrare e diffondere negli strati interni del campione, viene dissipato sull'intero volume del mezzo oppure agisce a livello delle molecole polari presenti nel campione (Moret et al., 2014). Le molecole polari, infatti, sono in grado di assorbire fortemente le microonde poiché dotate di un momento dipolare; al contrario, solventi apolari non vengono riscaldati dalle microonde.

Le microonde sono dotate di campi elettrici e magnetici tra loro perpendicolari: di particolare importanza è il campo elettrico che, mediante la conduzione ionica e la rotazione dipolare, è responsabile del riscaldamento del mezzo.

Il fenomeno del riscaldamento dato dalle microonde è molto rapido e maggiore sarà la costante dielettrica del mezzo, più il processo risulterà efficace. Si suppone che il meccanismo di estrazione dell'estrazione assistita da microonde coinvolga tre fasi sequenziali e schematizzate in Figura 11, estrapolata dal lavoro di Sadeghi et al. del 2017:

- 1) separazione dei soluti dai siti attivi della matrice costituente il campione a temperatura e pressione aumentate;
- 2) diffusione del solvente attraverso la matrice costituente il campione;
- 3) rilascio dei soluti dalla matrice del campione al solvente.

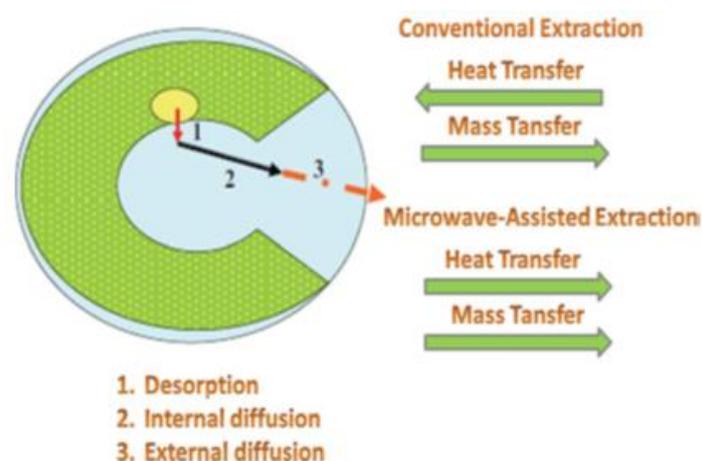


Figura 15 Le fasi dell'estrazione assistita da microonde
(Estrapolata dal lavoro di Aghdase Sadeghi, Vahid Hakimzadeh, Behnam Karimifar, Microwave Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Food: A Review, International Journal of Food Science and Nutrition Engineering, Vol. 7 No. 1, 2017, pp. 19-27. doi: 10.5923/j.food.20170701.03)

Le microonde, a differenza dei metodi tradizionali, vanno a riscaldare direttamente la soluzione e determinano una dispersione di calore nell'ambiente circostante minima, mantenendo il gradiente di temperatura al minimo (Ivanovs e Blumberga, 2017). Tuttavia sono molti i fattori che influenzano l'efficienza dell'estrazione: tra questi, la geometria del campione e le proprietà dielettriche del mezzo vanno a condizionare la distribuzione del campo elettrico generato dalle microonde (Chemat et al., 2012).

A differenza di UAE e SFE, la metodica MAE, ad oggi, ha un impiego più limitato nel recupero di molecole bioattive dagli scarti di pesce. Infatti, il processo per questo campo di applicazione è ancora in fase di sviluppo, ma è comunque considerato (in prospettiva) un metodo migliore rispetto alle tecniche tradizionali, in quanto potrebbe consentire rese simili (o in alcuni casi migliori) ed essere una risorsa per lavorare contemporaneamente su più campioni; tuttavia la problematica principale associata alla MAE è la generazione di calore nel campione che, ad esempio per quanto riguarda l'estrazione della frazione lipidica del pesce, può causare ossidazione di acidi grassi insaturi (Al Khawli et al. 2019).

Secondo quanto riportato nel lavoro del 2017 di Rahimi et al., l'estrazione assistita dalle microonde della frazione lipidica presente negli scarti di pesce può essere condotta utilizzando come solvente l'acqua distillata oppure una miscela di esano-isopropanolo in un rapporto di 3:2 e procedendo schematicamente come segue:

1. Si uniscono a 2 grammi di campione di scarto di pesce 1 grammo di solfato di sodio
2. Il tutto viene immerso in 42 ml di solvente che, a seconda dei casi, può essere acqua distillata oppure una miscela esano-isopropanolo.
3. Preparato il campione, lo si sottopone all'azione delle microonde con una potenza di 800 Watt per una durata di 10 minuti nel caso in cui si impieghi acqua distillata come solvente, oppure per un massimo di 4 minuti nel caso in cui si utilizzi la miscela di solvente organico sopraccitata.
4. Il tutto poi viene filtrato e vengono aggiunti 6 ml di esano per separare la miscela filtrata
5. Lo strato superiore quindi viene separato e sottoposto a processi di essiccamento e dopodiché viene pesata la resa lipidica.

I risultati dell'esperimento dimostrano che, quando viene utilizzata acqua distillata come solvente di estrazione, la quantità di lipidi ricavati dal campione di scarto (resa) aumenta con l'aumentare della durata del trattamento raggiungendo il massimo al decimo minuto. Questo fenomeno è probabilmente dovuto dalle caratteristiche polari del solvente impiegato: infatti, l'acqua ha un'elevata costante dielettrica che determina un aumento del calore interno al campione facilitando l'estrazione lipidica e, aumentando il tempo di trattamento, aumenta anche la generazione di calore all'interno del campione.

Quando, invece, viene impiegato la miscela organica come solvente, la resa di estrazione aumenta drasticamente al quarto minuto di trattamento oltre al quale si ha l'evaporazione del solvente stesso.

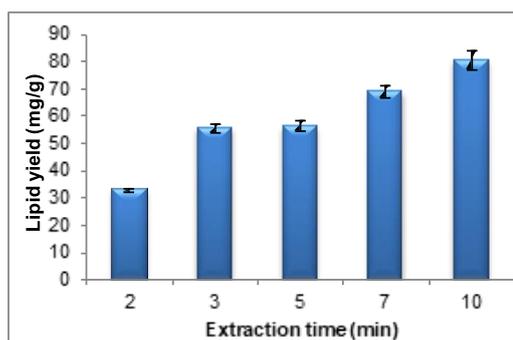


Figura 16 Resa di estrazione lipidica mediante MAE utilizzando acqua distillata

(Estrapolato dal lavoro di Rahimi, M A, R Omar, S Ethaib, M K Siti Mazlina, D R Awang Biak, e R Nor Aisyah. 2017. «Microwave-Assisted Extraction of Lipid from Fish Waste». IOP Conference Series: Materials Science and Engineering 206 (giugno): 012096. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/206/1/012096>.)

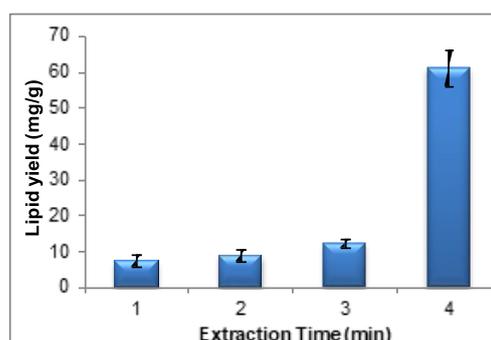


Figura 17 Resa di estrazione lipidica mediante MAE usando la miscela esano-isopropanolo.

(Estrapolato dal lavoro di Rahimi, M A, R Omar, S Ethaib, M K Siti Mazlina, D R Awang Biak, e R Nor Aisyah. 2017. «Microwave-Assisted Extraction of Lipid from Fish Waste». IOP Conference Series: Materials Science and Engineering 206 (giugno): 012096. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/206/1/012096>.)

Nonostante le tempistiche siano leggermente più lunghe nella MAE con acqua distillata, la resa è maggiore di circa il 24% e il suo impiego come solvente per l'estrazione di lipidi dagli scarti di pesce la rende una promettente risorsa 'green' (Rahimi et al., 2017).

3.2.3 *Ultrasound Assisted Extraction (UAE)*

Si tratta di una tecnica emergente che ha consentito l'estrazione di numerose sostanze (come per esempio antiossidanti, vitamine, elementi minerali, pigmenti, ...) non solo da substrati animali, ma soprattutto vegetali.

Gli ultrasuoni sono onde meccaniche che diffondono in un mezzo elastico con una frequenza che va dai 20 kHz ai 10MHz, quindi al di sopra delle normali frequenze percepite dall'orecchio umano (Ivanovs e Blumberga, 2017) e sono caratterizzate da tre parametri fondamentali:

1. Potenza sonora
2. Intensità del suono
3. Densità della potenza sonora

Per questo, dunque, si possono distinguere ultrasuoni a bassa intensità (caratterizzati da alta frequenza, ma scarsa potenza) usati soprattutto come metodo analitico per valutare proprietà chimico-fisiche degli alimenti, e ultrasuoni ad alta intensità (con bassa frequenza, ma elevata potenza) in grado di modificare proprietà chimico-fisiche degli alimenti (Ivanovs e Blumberga, 2017).

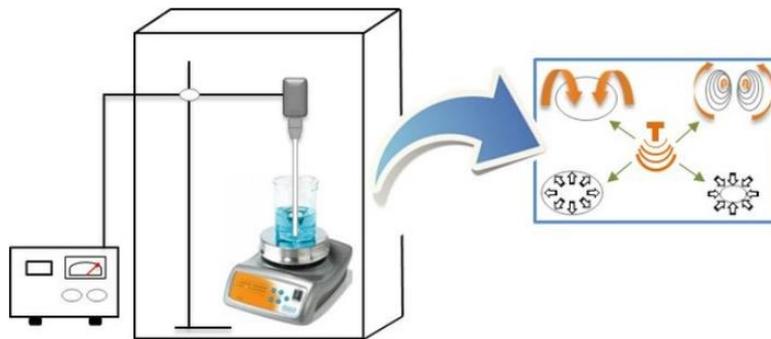


Figura 18 Rappresentazione del processo UAE

(Estrapolata dal lavoro di Al Khawli, Fadila, Mirian Pateiro, Rubén Domínguez, José M. Lorenzo, Patricia Gullón, Katerina Kousoulaki, Emilia Ferrer, Houda Berrada, e Francisco J. Barba. 2019. «Innovative Green Technologies of Intensification for Valorization of Seafood and Their By-Products». *Marine Drugs* 17 (12): 689.

<https://doi.org/10.3390/md17120689>)

Quando un'onda ultrasonica attraversa un mezzo liquido (es. solvente di estrazione), induce uno spostamento longitudinale delle particelle del mezzo generando una successione di fasi di compressione e rarefazione nel mezzo stesso. Ogni mezzo (es. solvente di estrazione) ha una distanza molecolare critica: al di sotto di questo valore critico il liquido rimane intatto, ma al di sopra di questa distanza il liquido si rompe e si possono generare dei vuoti. Nel caso degli ultrasuoni, se il ciclo di rarefazione è abbastanza forte, la distanza tra le molecole contigue può raggiungere o addirittura superare la distanza molecolare critica del liquido e possono crearsi nel mezzo le bolle di cavitazione, che sono in grado di crescere durante le fasi di rarefazione e di diminuire di dimensioni durante i cicli di compressione (le bolle oscillano in base alla frequenza applicata). Quando le dimensioni di tali bolle raggiungono un punto critico, esse collassano durante un ciclo di compressione rilasciando una grande quantità di energia. La temperatura e la pressione al momento del collasso sono state rispettivamente stimate fino a 5000 K e 2000 atm in un bagno ad ultrasuoni a temperatura ambiente (Sana et al., 2012).

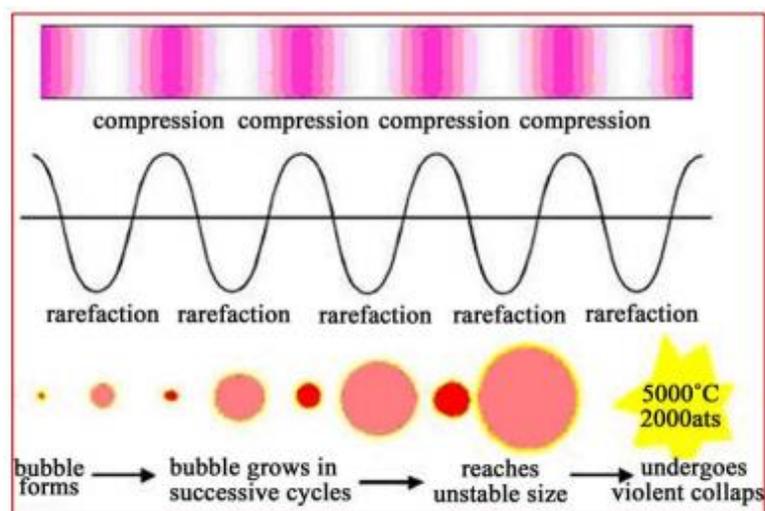


Figura 19 Formazione delle bolle di cavitazione.

(Immagine estrapolata dal lavoro di Sana, S., Rajanna, K. C., Reddy, K. R., Bhooshan, M., Vekateswarlu, M., Kumar, M. S., & Uppalaiah, K. (2012). Ultrasonically Assisted Regioselective Nitration of Bibliografia – Melograno 141 Aromatic Compounds in Presence of Certain Group V and VI Metal Salts. *Green and Sustainable Chemistry*, 2(3), 97–111. <https://doi.org/10.4236/gsc.2012.23015>.)

In altre parole, gli ultrasuoni determinano un impatto meccanico con il mezzo tale da superare la distanza molecolare critica: questo causa un aumento della superficie di contatto tra solvente e composti di estrazione, favorendo una maggiore penetrazione del solvente nella matrice (es. matrice alimentare da estrarre) in modo tale da facilitare l'estrazione delle molecole target. Questo, usualmente, comporta un considerevole aumento della resa estrattiva, un'estrazione più rapida ed efficace con un minor utilizzo di solvente e dunque un minor impatto ambientale. Secondo quanto riportato da Chemat et al., 2012 la UAE (acronimo di 'Ultrasound Assisted Extraction'), risulta in grado anche, nel contempo, di inattivare un gran numero di enzimi garantendo l'estrazione di molecole bioattive più stabili.

Le apparecchiature ad ultrasuoni più utilizzate in laboratorio sono i bagni e le sonde ultrasoniche.

I primi hanno il vantaggio di essere più semplici da utilizzare, ma hanno una riproducibilità ridotta; le seconde, invece, sono in grado di generare una potenza maggiore rispetto ai bagni ultrasonici e sono largamente impiegate per la sonicazione di campioni con un volume ridotto, ma hanno lo svantaggio di causare un riscaldamento rapido del campione stesso.

Sebbene si tratti di un metodo 'Green' gli ultrasuoni hanno come principale svantaggio quello di causare possibili modifiche qualitative di alcuni prodotti alimentari (come sapore, colore, consistenza) soprattutto in quelli ricchi di sostanze lipidiche.

UAE è largamente impiegata per il recupero di sostanze dai prodotti marini di scarto, in particolar modo per l'estrazione di collagene da pelli e lische di pesce. Il processo ad ultrasuoni, in linea generale, comporta numerosi vantaggi rispetto alle tecniche tradizionali, determinando una riduzione dei tempi di produzione, un aumento della resa e una maggiore velocità di estrazione (Chemat et al., 2012). Secondo quanto riportato nel lavoro del 2019 da Al Khawli et al., per l'estrazione di collagene è stato dimostrato come la resa di estrazione sia fortemente influenzata dalla durata del trattamento, dalla quantità di acido impiegato (per quanto concerne la frazione di collagene solubile in soluzioni estrattive acide) e dall'ampiezza delle onde ultrasoniche: infatti, quando il processo è protratto oltre le 24 ore si ottengono dei composti sconosciuti probabilmente derivanti dalla degradazione del collagene.

Di grande attualità sono le eventuali combinazioni tra l'estrazione assistita con ultrasuoni e altre metodiche. Per esempio, l'impiego dell'UAE in associazione con l'estrazione enzimatica di molecole bioattive facilita e aumenta l'interazione enzima-substrato comportando, ad esempio, un aumento della resa di estrazione di sostanze lipidiche da scarti ittici.

Oltre all'associazione con l'estrazione enzimatica, gli ultrasuoni sono stati impiegati insieme all'innovativa tecnica di estrazione ISP ('Isoelectric Solubilization Precipitation'), una metodica che sfrutta variazioni di pH per l'estrazione di materiale proteico da scarti ittici (Al Khawli et al. 2019). Conducendo un esperimento con acqua distillata come solvente, ultrasuoni con un ampiezza d'onda del 20% e del 60% e con pH mantenuto costante a 6, gli autori hanno dimostrato un significativo incremento del recupero di proteine attuando la metodica ISP associata all'estrazione assistita da ultrasuoni (Álvarez et al. 2018). In questo processo, l'energia che viene applicata al campione è decisamente maggiore rispetto all'applicazione del solo metodo ISP e il processo di cavitazione ultrasonica comporta una maggiore interazione tra campione e solvente: di conseguenza, il solvente di estrazione sarà maggiormente a contatto con le proteine target, determinando un aumento della resa di estrazione.

Dai risultati del lavoro del 2018 di Álvarez et al., è risultato che l'impiego di UAE, associata alla tecnica ISP, porti ad un significativo aumento nella resa di estrazione:

- Nell'estrazione acida la quantità di proteine recuperate va dal 60% al 75% quando sono impiegati ultrasuoni con un'ampiezza rispettivamente del 20% e del 60%.
- Nell'estrazione alcalina, invece, la resa varia tra l'87.6% (sfruttando ultrasuoni al 20% di ampiezza) e il 95% (con ultrasuoni al 60% di ampiezza).

CONCLUSIONI

L'industria ittica vede incrementare, di anno in anno, le proprie produzioni e questo porta, parallelamente, ad un aumento degli sprechi e delle tonnellate di scarti che non vengono sufficientemente riutilizzati. Le conseguenze finali si traducono in un notevole impatto ambientale, rappresentando dunque una importante problematica a livello nazionale ed internazionale. Questi scarti sono una fonte preziosa di molecole bioattive utilizzabili in numerosi settori, anche diversi da quello alimentare, come per esempio in ambito farmaceutico, cosmetico e nutraceutico. Pertanto, la valorizzazione degli scarti provenienti dai processi di lavorazione delle specie ittiche rappresenta una soluzione che non solo promuoverebbe una gestione più sostenibile della filiera ittica, ma porterebbe vantaggi sia all'ambiente, riducendo inquinamento e rischi ambientali, sia alle industrie stesse, fornendo loro delle prospettive di rivendicazione in etichetta.

La necessità di sfruttare questi scarti ha portato, nel corso degli anni, allo sviluppo di tecnologie innovative e funzionali per l'estrazione di molecole bioattive. Infatti, parallelamente ai tradizionali metodi estrattivi, sono stati sviluppati i cosiddetti metodi 'green', tra i quali i più impiegati sono: l'estrazione mediante fluidi supercritici (SFE), l'estrazione assistita con microonde (MAE) e l'estrazione assistita con ultrasuoni (UAE). Questi, pur rappresentando una via alternativa che in molti casi consente rese simili o addirittura migliori impattando meno sull'ambiente, in relazione alle metodiche classiche, necessitano di ulteriori studi e ricerche per monitorare attentamente l'aspetto tossicologico (es. l'eventuale estrazione di sostanze xenobiotiche indesiderate oppure le eventuali modificazioni indotte sulle sostanze bioattive target dovute alle tecniche estrattive stesse) e per un'ottimizzazione del loro impiego su scala industriale e, quindi, di un loro scale-up economicamente sostenibile.

Ad oggi, hanno un grande potenziale nell'economia circolare verso un futuro a rifiuti zero. Tuttavia, anche se in specifiche aree industriali, come l'agroalimentare, queste tecnologie stanno diventando abbastanza usuali, nel sottosectore della pesca sono ancora poco adottate. Uno dei principali svantaggi nella gestione degli scarti ittici è, infatti, legato alla loro grande variabilità ed eterogeneità associato ad un elevatissimo grado di deperibilità del prodotto di partenza.

Sviluppare processi in grado di garantire una sostenibilità anche economica è una delle sfide più importanti che le industrie e i ricercatori sono tenuti ad affrontare al fine di valorizzare al massimo l'utilizzo di queste risorse. A dimostrazione di tale esigenza si può sottolineare come l'UE, recentemente, abbia finanziato numerosi progetti, tra cui i sopracitati BYTHOS e PRISMAMED, in quanto la gestione dei rifiuti ittici è una problematica che coinvolge tutti e necessita del coordinamento dei vari stati Europei (e non solo). Scartare il pesce, quindi, rappresenta un evidente spreco di risorse marine che potrebbero essere utilizzate in modo produttivo, quando economicamente fattibile, tenendo in debito conto l'obiettivo ecologico complessivo per ridurre al minimo gli scarti nella pesca europea secondo quanto prescritto dall'art. 15 del Reg. 1380/2013 e dalla gerarchia europea delle possibili opzioni di gestione degli scarti agro-alimentari.

BIBLIOGRAFIA

Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA). URL: <https://www.aifa.gov.it/>

Aghdase Sadeghi, Vahid Hakimzadeh, Behnam Karimifar, *Microwave Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Food: A Review*, International Journal of Food Science and Nutrition Engineering, Vol. 7 No. 1, 2017, pp. 19-27. doi: 10.5923/j.food.20170701.03.

Al Khawli, Fadila, Mirian Pateiro, Rubén Domínguez, José M. Lorenzo, Patricia Gullón, Katerina Kousoulaki, Emilia Ferrer, Houda Berrada, e Francisco J. Barba. 2019. «*Innovative Green Technologies of Intensification for Valorization of Seafood and Their By-Products*». Marine Drugs 17 (12): 689. <https://doi.org/10.3390/md17120689>.

Álvarez, Carlos, Pauline Lélou, Sarah A. Lynch, e Brijesh K. Tiwari. 2018. «*Optimised Protein Recovery from Mackerel Whole Fish by Using Sequential Acid/Alkaline Isoelectric Solubilization Precipitation (ISP) Extraction Assisted by Ultrasound*». LWT 88 (febbraio): 210–16. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.045>.

Arason, S. et al. (2009). *Maximum Resource Utilisation – Value Added Fish By-products*. Nordic innovation Centre, Oslo, Norway <http://www.divaportal.org/smash/record.jsf?pid=diva2%3A707165&dswid=868>

Ashraf, Syed Amir, Mohd Adnan, Mitesh Patel, Arif Jamal Siddiqui, Manojkumar Sachidanandan, Mejdí Snoussi, e Sibte Hadi. 2020. «*Fish-Based Bioactives as Potent Nutraceuticals: Exploring the Therapeutic Perspective of Sustainable Food from the Sea*». Marine Drugs 18 (5): 265. <https://doi.org/10.3390/md18050265>.

Aspevik, T.; Oterhals, Å.; Rønning, S.B.; Altintzoglou, T.; Wubshet, S.G.; Gildberg, A.; Afseth, N.K.; Whitaker, R.D.; Diana Lindberg, D. *Valorization of proteins from co- and by-products from the fish and meat industry. In Chemistry and Chemical Technologies in Waste Valorization*; Springer: Cham, Switzerland, 2017; pp. 123–150

Azuma, K., Izumi, R., Osaki, T., Ifuku, S., Morimoto, M., Saimoto, H., Minami, S., & Okamoto, Y. (2015). *Chitin, chitosan, and its derivatives for wound healing: old and new materials*. *Journal of functional biomaterials*, 6(1), 104–142.

<https://doi.org/10.3390/jfb6010104>

(Retraction published J Funct Biomater. 2018 Jun 07;9(2):)

Brooks MS, Ramakrishnan VV. 2013. «*Fish Processing Wastes as a Potential Source of Proteins, Amino Acids and Oils: A Critical Review*». *Journal of Microbial & Biochemical Technology* 05 (04). <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000110>.

Bruno, S. F.; Ekorong, F. J. A. A.; Karkal, S. S.; Cathrine, M. S. B.; Kudre, T. G. *Green and Innovative Techniques for Recovery of Valuable Compounds from Seafood By Products and Discards: A Review*. *Trends in Food Science & Technology* 2019, 85, 1022. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.12.004>.

Cauchie, Henry-Michel. 2002. «*Chitin production by arthropods in the hydrosphere*». *Hydrobiologia* 470 (febbraio): 63–95. <https://doi.org/10.1023/A:1015615819301>.

Chemat, Farid, Maryline Abert Vian, e Giancarlo Cravotto. 2012. «*Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles*». *International Journal of Molecular Sciences* 13 (7): 8615–27. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>.

Cooperazione Interreg V-A Italia-Malta (BYTHOS). URL: <http://www.bythos.eu/>

Dhillon, Gurpreet Singh, Surinder Kaur, Satinder Kaur Brar, e Mausam Verma. 2013. «*Green synthesis approach: extraction of chitosan from fungus mycelia*». *Critical Reviews in Biotechnology* 33 (4): 379–403. <https://doi.org/10.3109/07388551.2012.717217>.

Direzione generale della Salute e della Sicurezza alimentare della Commissione Europea. URL: https://ec.europa.eu/info/departments/health-and-food-safety_it

FAO. 2018. *The state of world fisheries and aquaculture. Meeting the sustainable development goals*. Rome. License : CC BY-NC-SA 3.0 IGO

Folch J, Less M, Stanley HS (1957) *A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues*. *J Biol Chem* 226: 497-509.

G. Cravotto, D. Carnaroglio (Eds.), “*Microwave Chemistry*”, casa editrice De Gruyter (2017)

Gbogouri, G.A., M. Linder, J. Fanni, e M. Parmentier. 2004. «*Influence of Hydrolysis Degree on the Functional Properties of Salmon Byproducts Hydrolysates*». *Journal of Food Science* 69 (8): C615–22.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb09909.x>.

Harnedy, Pádraigín A., e Richard J. FitzGerald. 2012. «*Bioactive Peptides from Marine Processing Waste and Shellfish: A Review*». *Journal of Functional Foods* 4 (1): 6–24. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.09.001>.

Ivanovs, Kaspars, e Dagnija Blumberga. 2017. «*Extraction of Fish Oil Using Green Extraction Methods: A Short Review*». *Energy Procedia* 128 (settembre): 477–83.
<https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.09.033>.

Jang, M.-K., Kong, B.-G., Jeong, Y.-I., Lee, C.H. and Nah, J.-W. (2004), *Physicochemical characterization of α -chitin, β -chitin, and γ -chitin separated from natural resources*. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.*, 42: 3423-3432.
doi:[10.1002/pola.20176](https://doi.org/10.1002/pola.20176)

Khoushab, Feisal, e Montarop Yamabhai. 2010. «*Chitin Research Revisited*». *Marine Drugs* 8 (7): 1988–2012. <https://doi.org/10.3390/md8071988>.

Kim, Se-Kwon, e Eresha Mendis. 2006. «*Bioactive Compounds from Marine Processing Byproducts – A Review*». *Food Research International* 39 (4): 383–93.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.10.010>.

L.Mannina, M. Daglia, A.Ritieni. *La chimica e gli alimenti*, 2019, Casa Editrice Ambrosiana.

Leonelli C, Mason TJ (2010) *Microwave and ultrasonic processing: now a realistic option for industry*. *Chem Eng Proces* 49:885–900

Leonelli C, Veronesi P, Cravotto G (2013) In: Chemat F, G. C (eds) *Microwave-assisted extraction: an introduction to dielectric heating, in microwave-assisted extraction for bioactive compounds, theory and practice*. Springer, New York (Chapter. 1). ISBN 978-1-4614-4829-7

Linder, M., Fanni, J., & Parmentier, M. (2005). *Proteolytic extraction of salmon oil and PUFA concentration by lipases*. *Marine biotechnology (New York, N.Y.)*, 7(1), 70–76. <https://doi.org/10.1007/s10126-004-0149-2>

Lisbeth Truelstrup Hansen, John W. Austin, Tom A. Gill. *Antibacterial effect of protamine in combination with EDTA and refrigeration*, *International Journal of Food Microbiology*, Volume 66, Issue 3, 2001, Pages 149-161, ISSN 0168-1605, [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00428-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00428-7)

M. Boutinguiza, J. Pou, R. Comesaña, F. Lusquiños, A. de Carlos, B. León, *Biological hydroxyapatite obtained from fish bones*, *Materials Science and Engineering: C*, Volume 32, Issue 3, 2012, Pages 478-486, ISSN 0928-4931, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.11.021>.

Ministero della Salute. URL: <http://www.salute.gov.it/portale/home.html>

Moret, Sabrina, Giorgia Purcaro, e Lanfranco Conte. 2014. *Il campione per l'analisi chimica*. EDS: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-88-470-5738-8>.

Morganti, P.; Palombo, M.; Tishchenko, G.; Yudin, V.; Guarneri, F.; Cardillo, M.; Del Ciotto, P.; Carezzi, F.; Morganti, G.; Fabrizi, G. *Chitin-Hyaluronan Nanoparticles: A Multifunctional Carrier to Deliver Anti-Aging Active Ingredients through the Skin*. *Cosmetics* **2014**, *1* (3), 140–158. <https://doi.org/10.3390/cosmetics1030140>.

Muzzarelli, C., Tosi, G., Francescangeli, O., & Muzzarelli, R. A. (2003). *Alkaline chitosan solutions*. *Carbohydrate research*, 338(21), 2247–2255. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(03\)00373-2](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(03)00373-2)

Nguyen, T.T., Barber, A.R., Corbin, K. et al. *Lobster processing by-products as valuable bioresource of marine functional ingredients, nutraceuticals, and pharmaceuticals*. *Bioresour. Bioprocess.* **4**, 27 (2017).
<https://doi.org/10.1186/s40643-017-0157-5>

Pal, G. K.; Suresh, P. V. *Sustainable Valorisation of Seafood By-Products: Recovery of Collagen and Development of Collagen-Based Novel Functional Food Ingredients*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2016, **37**, 201–215.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.03.015>.

Piano Rifiuti e Scarti in Mare di pesca, acquacoltura e diporto nel Mediterraneo (PRISMAMED). URL : <http://interreg-maritime.eu/web/prismamed>

Rahimi, M A, R Omar, S Ethaib, M K Siti Mazlina, D R Awang Biak, e R Nor Aisyah. 2017. «*Microwave-Assisted Extraction of Lipid from Fish Waste*». *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 206 (giugno): 012096.
<https://doi.org/10.1088/1757-899X/206/1/012096>.

Regenstein, J. M., & Zhou, P. (2007). *Collagen and gelatin from marine by-products*. In F.Shahidi (Ed.), *Maximising the value of marine by-products*(pp. 279–303). WoodheadPublishing Limited: Cambridge England: CRC Press.

Rubio-Rodríguez, Nuria, Sara M. de Diego, Sagrario Beltrán, Isabel Jaime, María Teresa Sanz, e Jordi Rovira. 2012. «*Supercritical Fluid Extraction of Fish Oil from Fish By-Products: A Comparison with Other Extraction Methods*». *Journal of Food Engineering* 109 (2): 238–48. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.10.011>.

Salem, Mohamed, Michal Bernach, Krzysztof Bajdzienko, e Patrick Giavalisco. 2017. «*A Simple Fractionated Extraction Method for the Comprehensive Analysis of Metabolites, Lipids, and Proteins from a Single Sample*». *Journal of Visualized Experiments*, n. 124 (giugno): 55802. <https://doi.org/10.3791/55802>

Sana, S., Rajanna, K. C., Reddy, K. R., Bhooshan, M., Vekateswarlu, M., Kumar, M. S., & Uppalaiah, K. (2012). *Ultrasonically Assisted Regioselective Nitration of Bibliografia – Melograno 141 Aromatic Compounds in Presence of Certain Group V and VI Metal Salts*. *Green and Sustainable Chemistry*, **2**(3), 97–111.
<https://doi.org/10.4236/gsc.2012.23015>.

Scientific, Technical and Economic Committee for Fisheries (STECF) - *The EU Fish Processing Sector: Economic Report (STECF 19 15)*. 2020. LU: Publications Office. <https://data.europa.eu/doi/10.2760/30373>.

Shahidi, Fereidoon, Janak Kamil Vidana Arachchi, e You-Jin Jeon. 1999. «*Food Applications of Chitin and Chitosans*». *Trends in Food Science & Technology* 10 (2): 37–51. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(99\)00017-5](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(99)00017-5).

Silva, T.; Moreira-Silva, J.; Marques, A.; Domingues, A.; Bayon, Y.; Reis, R. *Marine Origin Collagens and Its Potential Applications*. *Marine Drugs* 2014, 12 (12), 5881–5901. <https://doi.org/10.3390/md12125881>.

Società Italiana di Nutrizione Umana (SINU). URL: <https://sinu.it>

Torres-León, Cristian, Nathiely Ramírez-Guzman, Liliana Londoño-Hernandez, Gloria A. Martínez-Medina, Rene Díaz-Herrera, Víctor Navarro-Macias, Olga B. Álvarez-Pérez, et al. 2018. «*Food Waste and Byproducts: An Opportunity to Minimize Malnutrition and Hunger in Developing Countries*». *Frontiers in Sustainable Food Systems* 2 (settembre): 52. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2018.00052>.

Vázquez, J. A., Durán, A. I., Mendiña, A., & Nogueira, M. (2020). *Biotechnological Valorization of Food Marine Wastes: Microbial Productions on Peptones Obtained from Aquaculture By-Products*. *Biomolecules*, 10(8), 1184. <https://doi.org/10.3390/biom10081184>

Venkatesan, J.; Anil, S.; Kim, S.-K.; Shim, M. *Marine Fish Proteins and Peptides for Cosmeceuticals: A Review*. *Marine Drugs* 2017, 15 (5), 143. <https://doi.org/10.3390/md15050143>.

Wan Nur Syahira Ab Rahman, Mariam Firdhaus Mad Nordin, Amir Husni Mohd Syariff. 2019. *Extraction of local fish waste by subcritical water*. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences* Vol. 15, No. 5 (2019) 716-719

Yadav, M., Goswami, P., Paritosh, K. et al. *Seafood waste: a source for preparation of commercially employable chitin/chitosan materials*. *Bioresour. Bioprocess.* 6, 8 (2019). <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0243-y>

RINGRAZIAMENTI

Ritengo doveroso, arrivato al termine di questo percorso, esprimere i miei più sentiti ringraziamenti a tutte le persone che mi hanno accompagnato in questi cinque anni universitari.

Vorrei, in primis, ringraziare la Prof.ssa Boggia Raffaella, relatrice di questo elaborato, per il grande aiuto e supporto nella stesura di questa tesi. Un sincero grazie per la disponibilità, la pazienza e i numerosi consigli.

Un ringraziamento va anche ai correlatori Tiso Micaela e Romanò Michele.

Un ringraziamento speciale va a mia madre, colei che forse più di tutti ha creduto in me, nonostante le difficoltà iniziali, e che mi ha sempre aiutato a risollevarmi nei momenti di sconforto. Grazie a mio padre, sempre orgoglioso di ogni mio risultato, a mia sorella Gloria e ai miei nonni. Spero di avervi reso orgogliosi di me.

Grazie a Ilaria, che mi ha accompagnato nell'ultimo anno e mezzo di questa esperienza. Grazie per avermi aiutato e sopportato, per aver sempre creduto in me e per essermi sempre stata accanto in ogni momento.

Grazie a Giacomo, Edoardo e Federico, gli amici di una vita da sempre al mio fianco. Nonostante le distanze siete sempre stati un mio punto di riferimento.

Grazie ad Alessia e Francesco, amici veri che l'Università mi ha permesso di conoscere. Il loro supporto e aiuto è stato fondamentale in tutti questi anni.

È stato un percorso lungo, non senza difficoltà, ma che mi ha insegnato molto e mi ha permesso di crescere come persona, dandomi l'opportunità di vivere e amare per ogni sua sfaccettatura una città fantastica, Genova, che porterò sempre nel mio cuore.