



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE

CICLO XXXVII

Coordinatore del corso di Dottorato: Chiar.mo Prof. Francesco Fazio

Curriculum: Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare

STUDIO E VALORIZZAZIONE DI PRODOTTI E SOTTOPRODOTTI DI

ORIGINE ANIMALE ATTRAVERSO PROCESSI A BASSO IMPATTO

AMBIENTALE

Tesi di Dottorato della

Dott.ssa Laura De Maria

Tutor: **Chiar. mo Prof. Nicola Cicero**

CoTutor: Chiar.ma Prof.ssa Rossella Vadalà

Settore Scientifico Disciplinare:

CHEM-07/B- CHEM-07/C

Esame finale 2024

Indice

1. Economia circolare	pag. 3
2. Scarti ittici	pag. 4
2.1 Composizione dagli scarti ittici e utilizzi	
2.1.1. Collagene	
2.1.2. Peptidi	
2.1.3. Enzimi	
2.1.4. Chitina	
2.2 Composti bioattivi dagli scarti dei gamberi	
3. Packaging alimentari	pag. 21
3.1 Proprietà chimico-fisiche dei packaging alimentari	
3.2 Pellicole alimentari	
3.3 Biopolimeri per imballaggi alimentari	
3.3.1 Lipidi	
3.3.2 Proteine	
3.3.3 Polisaccaridi	
3.3.4 Chitosano	
3.4 Quadro normativo	
3.4.1. Definizioni	
4. Scopo della tesi	pag. 55

5. Materiali e metodi	pag. 58
5.1. Materia prima	
5.2. Fermentazione	
5.3. Deacetilazione	
5.4. Preparazione del biofilm	
5.5. Prove meccaniche	
5.6. Analisi dei formaggi confezionati	
5.6.1 Campioni di formaggio	
5.6.2 Estrazione di sostanze volatili	
5.6.3 Gascromatografia	
5.6.4 Test microbiologici	
5.6.5 Analisi sensoriale	
5.6.6 Analisi statistica	
6. Risultati e discussioni	pag. 71
6.1 Proprietà meccaniche	
6.2 Analisi del formaggio confezionato	
6.2.1 Composti organici volatili	
6.2.2 Microbiologia	
6.2.3 Analisi sensoriale	
7. Conclusioni	pag. 90
8. Bibliografia	pag. 93

1. Economia circolare

L'enorme crescita demografica avvenuta negli ultimi due decenni, e il conseguente aumento dell'utilizzo delle risorse non rinnovabili, ha influito negativamente sulla qualità dell'ambiente e ha sollecitato l'adozione di strategie sostenibili. L'impiego di risorse alternative e lo sviluppo di processi rinnovabili basati sulla sostenibilità sono di conseguenza divenuti essenziali per le generazioni future. Il passaggio da un'economia lineare a un'economia circolare è oggi un aspetto indispensabile per gestire le risorse in modo eco efficiente, poiché il concetto di sostenibilità si basa totalmente sulla circolarità di tutti i materiali necessari. L'UE, infatti, sta aggiornando la legislazione in materia di gestione dei rifiuti per accelerare la transizione in ottica di un'economia circolare, i cui principi fondamentali includono una progettazione orientata alla durabilità, al riciclo, al riutilizzo, alla riparazione e alla condivisione delle risorse. Questi principi sono volti a stabilire un sistema in cui i prodotti mantengono il loro valore il più a lungo possibile, contribuendo a ridurre l'impatto ambientale complessivo. Nel contesto alimentare, questo sistema economico mira all'ottimizzazione di ogni fase della catena a partire dalla produzione fino al recupero degli scarti. L'obiettivo, attraverso l'adozione di pratiche come il riciclo dei rifiuti organici, il compostaggio, il recupero energetico e la condivisione degli alimenti in eccedenza, è minimizzare lo spreco e massimizzare il valore delle risorse alimentari, favorendo una distribuzione più efficiente.

È importante distinguere il concetto di "perdita" e "spreco" alimentare, che sebbene equivalenti perché fanno riferimento a "cibo non consumato", si riferiscono a problematiche che si manifestano in fasi diverse della catena alimentare. Secondo la definizione della FAO (Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura), la perdita alimentare si riferisce alla riduzione nella quantità o nella qualità del cibo causata dalle decisioni e dalle

azioni dei fornitori lungo la catena alimentare, escludendo rivenditori, servizi di ristorazione e consumatori; lo spreco alimentare, invece, si verifica a causa delle decisioni e delle azioni dei rivenditori, dei servizi di ristorazione e dei consumatori stessi. Questi fenomeni si manifestano in varie fasi della filiera agroalimentare, causati da sovrapproduzione, accumulo eccessivo di scorte nella distribuzione al dettaglio, adozione di standard estetici troppo rigidi (come il rifiuto di frutta imperfetta) e scarsa pianificazione domestica degli acquisti e del consumo finale. A livello mondiale, si stima che circa il 14% del cibo viene perso nella catena di approvvigionamento alimentare, dal post-raccolta fino alla vendita all'ingrosso inclusa [1], mentre il 17% viene sprecato tra vendita al dettaglio e consumo [2]. La perdita/spreco si origina per il 12,7% dalla produzione, per il 12% dalla lavorazione, per il 6,8% da retail e distribuzione e per ben il 68,6% dal consumo domestico [3]. Ogni giorno un italiano getta circa 75 grammi di cibo per un totale di circa 27 chili all'anno [4].

2. Scarti ittici

Negli ultimi anni il consumo di prodotti ittici ha visto un enorme aumento in seguito al loro riconoscimento come componente fondamentale di una dieta equilibrata e di uno stile di vita sano. Una dieta a base di pesce ha un impatto nutrizionale positivo, svolgendo anche un ruolo importante nel correggere diete squilibrate e contrastare l'obesità; infatti, tali prodotti, oltre ad essere una ricca fonte di proteine di alta qualità, forniscono grassi essenziali, come gli acidi grassi omega-3 a catena lunga, vitamine, come D, A e B e minerali, tra cui calcio, iodio, zinco, ferro e selenio. Queste preziose

proprietà nutritive apportano benefici alla salute nella protezione dalle malattie cardiovascolari e aiutano lo sviluppo del cervello e del sistema nervoso del feto e del neonato [5]. Aumentando il consumo di prodotti ittici, di conseguenza, anche la quantità di rifiuti ittici ha subito un drammatico aumento in tutto il mondo. Attualmente, le perdite di pesce post-cattura rappresentano un'enorme preoccupazione economica e ambientale che si verifica nella maggior parte delle catene di distribuzione del pesce, con grandi quantità di pesce sbarcato perso o scartato tra lo sbarco e il consumo.

Oltre il 70% del pesce totale pescato viene sottoposto a ulteriore lavorazione prima di essere immesso sul mercato, con conseguente produzione di grandi quantità (circa il 20-80%) di scarti di pesce, a seconda del livello di lavorazione (ad esempio, eviscerazione, squamatura, filettatura) e della specie, poiché ognuna di esse ha una specifica composizione e dimensione. Queste operazioni generano scarti che includono principalmente rifilature muscolari (15-20%), pelle e pinne (1-3%), lisce (9-15%), teste (9-12%), viscere (12-18%) e squame (5%). La lavorazione del pesce è un'esigenza importante per le grandi aziende ittiche sia per ridurre i costi legati al trasporto delle parti non commestibili del pesce sia per aumentare la stabilità e la qualità dei prodotti, rimuovendo parti, come i visceri, che potrebbero contenere batteri ed enzimi, i quali rappresentano un rischio per la lavorazione e lo stoccaggio del pesce [6].

I gamberi e prodotti a base di gamberi sono ampiamente consumati in tutto il mondo e la loro domanda aumenta ogni anno per la delicatezza e il valore nutrizionale delle carni. La produzione globale di gamberi ha raggiunto i 5,03 milioni di tonnellate nel 2020 e se ne prevede la crescita fino a 7,28 milioni di tonnellate entro il 2025 con un tasso di crescita annuale composto (CAGR) del 6,1% dal 2020 al 2025 [7]; inoltre, si stima che il fatturato del mercato dei gamberetti raggiungerà i 67,6 miliardi di dollari entro la fine del 2025 (Rapporto di studio di mercato, 2019, p. 102). Il continente che ne detiene il primato per il numero di allevamenti è l'Asia con oltre l'80% della produzione mondiale.

Generalmente, i gamberi vengono immagazzinati ed esportati congelati con o senza guscio, a seconda della domanda del mercato. Pertanto, durante la loro lavorazione circa il 50-60% dei rifiuti solidi viene generato come sottoprodotti contenenti la testa, le viscere e il guscio, ecc. [7].

Per questo motivo, si rende necessaria una migliore gestione degli scarti ittici al fine di ridurre gli impatti ambientali e, allo stesso tempo, favorire il recupero di sostanze della biomassa scartata.

2.1 Composizione degli scarti ittici e utilizzi

I sottoprodotti del pesce sono una fonte nutrizionalmente importante di proteine, acidi grassi e minerali, inoltre il loro utilizzo sta guadagnando sempre più attenzione, in quanto offrono una fonte significativa e sostenibile di biocomposti di alto valore, grazie al loro elevato contenuto di collagene, peptidi, chitina, acidi grassi polinsaturi (PUFA), adatti ad applicazioni biotecnologiche o farmaceutiche con notevole valore di mercato [4, 5, 9].

2.1.1 Collagene

I collagene sono proteine strutturali abbondantemente presenti nei tessuti connettivi come ossa, vescica natatoria, pelle, vasi sanguigni, intestino e cartilagine. Si stima che il mercato del collagene marino raggiungerà i 983,84 milioni di dollari entro il 2025, procedendo con un tasso annuo di crescita annuale composto (CAGR) del 7,4% [6, 8]. L'espansione del mercato del collagene marino è dovuta al suo impiego nell'industria biomedica, cosmetica e alimentare, grazie alle sue ottime capacità di adesione cellulare, bassa tossicità e antigenicità, biocompatibilità e sicurezza [8, 10, 11].

Il collagene marino è il biomateriale naturale più promettente impiegato per la costruzione di scaffold nell'ingegneria dei tessuti; quest'ultimi svolgono un ruolo

chiave nel promuovere la rigenerazione cellulare, poiché sono coinvolti nei processi di adesione e differenziazione cellulare [12].

Un altro aspetto interessante è l'uso del collagene marino come biomateriale nella medicazione umida delle ferite; infatti, vi sono evidenze scientifiche nella guarigione di ustioni profonde di secondo grado sulla pelle di ratto [13], e nella prevenzione da infezioni batteriche, durante i processi di guarigione delle ferite, fornendo la polimixina B che mostra attività antibatterica contro i batteri Gram-negativi [14, 15]. Infine, il collagene proveniente dagli scarti di pesce trova applicazione all'interno dell'industria alimentare come additivo, per esempio nello yogurt, o nella produzione di imballaggi [16].

2.1.2 Peptidi

Con il termine peptidi si indicano molecole organiche composte da una catena più o meno lunga formata da aminoacidi. Nel 2019, il mercato globale degli idrolizzati di proteine del pesce ha raggiunto un valore di circa 420 milioni di dollari, con una previsione di crescita del 4,5% (CAGR) tra il 2020 e il 2026 [6]. Ricerche recenti hanno evidenziato che gli organismi marini costituiscono una promettente risorsa di proteine e peptidi bioattivi. Per ottenere queste molecole ed impiegarle in modo efficace, vengono utilizzati diversi metodi di estrazione, tra cui l'idrolisi acido-alcalina (utilizzando reagenti acidi o

alcalini), l'idrolisi enzimatica (mediante l'utilizzo di enzimi per idrolizzare gli scarti di pesce) e la fermentazione (sfruttando microrganismi come fonte di enzimi). Successivamente alla fase di estrazione, potrebbero essere necessari diversi step di purificazione, per i quali vengono adottate diverse metodologie come l'ultrafiltrazione (UF), la nanofiltrazione (NF) e la filtrazione su gel (GF) finalizzate a separare e purificare i peptidi in base al loro peso molecolare [13].

Gli FPH (idrolizzati di proteine di pesce) hanno attirato molta attenzione come composti, in applicazioni farmaceutiche e industriali grazie alle loro caratteristiche antiossidanti, antipertensive, immunomodulatorie, antimicrobiche, neuroattive [14, 17]. Inoltre, possiedono proprietà emulsionanti, schiumogene e gelificanti, che li rendono ingredienti funzionali multiuso [15, 17, 19].

2.1.3 Enzimi

Gli enzimi sono sostanze di natura proteica prodotte dalle cellule con funzione di catalizzatori. Nel 2017, il mercato degli enzimi dei prodotti ittici ammontava a circa 6,3 miliardi di dollari e si prevede che progredirà ad un tasso annuo composto del 6,8% fino al 2024 [6].

Gli organi interni come lo stomaco, il pancreas e l'intestino sono tra i principali sottoprodotti del pesce, ricchi di enzimi; molti di questi sono attivi a basse temperature e mostrano elevate attività catalitiche anche a concentrazioni ridotte, mantenendo la stabilità in un ampio intervallo di pH. I gruppi di enzimi più abbondanti, naturalmente

presenti nei pesci, sono le proteasi e le lipasi [6, 18]. L'impiego di enzimi registra una crescita notevole grazie alle vaste applicazioni sia nell'industria dei detersivi, migliorando l'efficacia dei detergenti nella rimozione delle macchie, ma anche nell'industria alimentare come ingrediente. Infatti, in uno studio è stato utilizzato l'enzima proteasi ottenuto da pesci e mammiferi acquatici come sostituto del caglio nella produzione di formaggio [20].

Tra i vantaggi potenziali nell'utilizzo degli enzimi vi è la possibilità di sviluppare processi industriali alternativi ai trattamenti meccanici o chimici, che possono spesso danneggiare il prodotto e ridurre il rendimento. Ciò permette un miglior controllo del processo, una riduzione dei consumi energetici nonché un abbattimento dei costi [21, 22].

2.1.4 Chitina

La chitina è il secondo polisaccaride in natura dopo la cellulosa e il più abbondante nell'ecosistema marino; trovata, in particolar modo, nei gusci dei crostacei, nelle cuticole degli insetti e nelle pareti cellulari dei funghi (figura 1)[23].

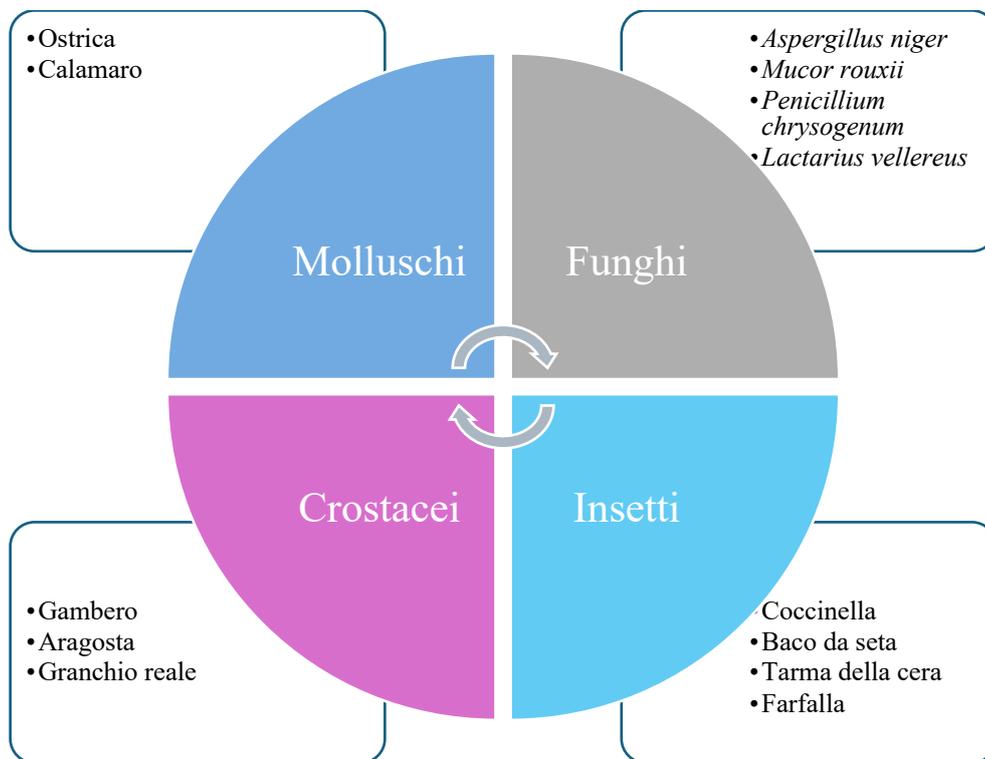


Figura 1: Esseri viventi in cui la chitina è maggiormente presente.

È presente in tre diverse forme cristalline α , β e γ e varia nel grado di deacetilazione [24]. L' α -chitina è composta da catene antiparallele, la β -chitina da catene parallele e la γ -chitina da catene parallele e antiparallele (figura 2) [25, 26].

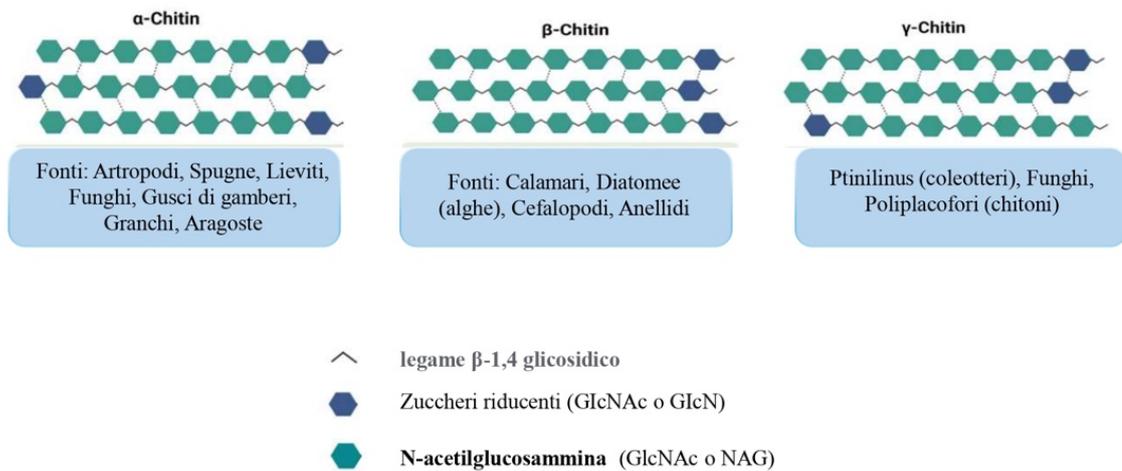


Figura 2: Le tre diverse forme cristalline della chitina (α , β e γ).

La forma deacetilata della chitina è chiamata chitosano. Il chitosano ($C_6H_{11}O_4N$) è un biopolimero cationico e la sua struttura è costituita da β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-D-glucosio e β -(1 \rightarrow 4)-2-ammino-D-unità di glucosio [27] (Figura 3). La chitina e il suo prodotto derivato, il chitosano, manifestano diverse attività biologiche e presentano un'eccellente biocompatibilità e biodegradabilità, rendendoli estremamente versatili e utili in svariati settori come l'agricoltura, la medicina, la farmaceutica, la trasformazione alimentare, la protezione ambientale e la biotecnologia [28].

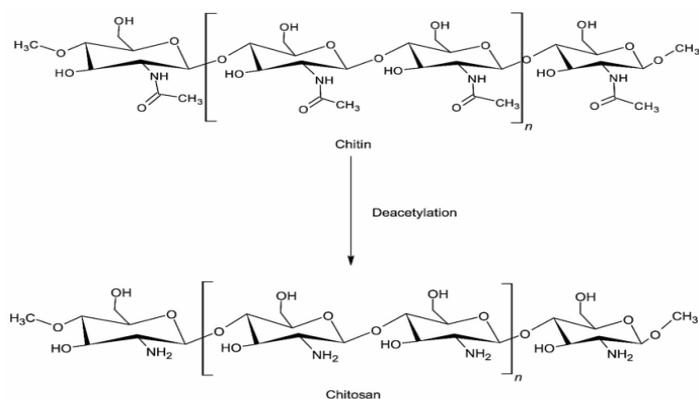


Figura 3: Struttura della chitina (in alto); struttura del chitosano (in basso).

L'estrazione della chitina dai rifiuti del guscio comporta principalmente processi di demineralizzazione (DM) e deproteinizzazione (DP), essendo la chitina fortemente legata a proteine, carbonato di calcio e lipidi [29].

Ad oggi tali trattamenti vengono fatti mediante metodi chimici, fisici ed enzimatici. Sebbene i metodi chimici abbiano buone rese, possono anche danneggiare la qualità del prodotto finale poiché questi metodi utilizzano acidi e basi corrosivi e pericolosi (come HCl e NaOH), con alte temperature, per lunghi periodi (diverse ore o giorni) [30]. Queste condizioni influiscono negativamente sul peso molecolare (MW) e sul grado di acetilazione (DA) a causa della percentuale di rapporto solido/liquido (da 1:50 a 1:10 o 1:5) coinvolta nella conversione meccanico-chimica della chitina in chitosano [31]; inoltre, potrebbe essere alterata anche la viscosità e la resa totale del chitosano perché l'aumento del tempo di reazione (0–15 h) e della temperatura (da 40 a 80 °C) dell'idrolisi acida ha effetti negativi. Infine, i metodi chimici generano residui e

richiedono una grande quantità di acqua in ogni fase del processo per la neutralizzazione e il lavaggio e ciò a livello ambientale rappresenta un problema [32]. Per quanto riguarda i metodi fisici, vengono utilizzati il metodo di irradiazione a microonde, il vapore (“steam explosion” SE) e gli ultrasuoni.

Il metodo di irradiazione a microonde (a 400 W per 3 minuti), come alternativa alle tecniche di riscaldamento convenzionali, si è dimostrato il più rapido ed efficiente [33]. Utilizzato in un primo momento, alla fine del processo di estrazione del chitosano, in particolare nella fase di deacetilazione della chitina, oggi la tecnologia di irradiazione a microonde viene utilizzata in tutte le fasi di estrazione del chitosano [34].

L'esplosione con vapore (SE) è una delle tecnologie di pretrattamento più economiche ed efficienti; i campioni vengono sottoposti ad alte temperature (100–200 °C) per diversi minuti, facendo seguire da una decompressione esplosiva così che i campioni diventino più porosi e accessibili per la successiva idrolisi enzimatica [35].

La deacetilazione assistita da ultrasuoni (USAD) è stata recentemente segnalata come un processo efficiente per produrre chitosano poiché ne migliora la rimozione delle proteine; infatti, in uno studio, in cui sono stati confrontati campioni sonicati e no, emerge come i campioni non trattati abbiano un contenuto proteico più alto [36]. Inoltre, aumentando i tempi di sonicazione è maggiore la cristallinità dei prodotti biopolimerici e la deproteinizzazione è più efficiente [37].

I metodi biotecnologici, per l'estrazione della chitina e del chitosano, stanno riscuotendo notevole attenzione poiché sono più ecologici ed economici e si ottiene un

prodotto finale con le proprietà desiderate. I due metodi biologici più utilizzati sono: la deproteinizzazione enzimatica e la fermentazione mediante microrganismi.

Per la deproteinizzazione enzimatica dagli scarti ittici sono necessari gli enzimi proteolitici. Possono essere impiegate varie proteasi come papaina, tripsina, pepsina, devolvasi, alcalasi e pancreatina; queste riducono al minimo la depolimerizzazione e la deacetilazione durante l'isolamento della chitina e rimuovono le proteine dai gusci. Il metodo enzimatico è un processo “pulito” ma l'efficienza è inferiore rispetto ai processi chimici poiché circa il 5% –10% delle proteine rimanenti rimane associato alla chitina isolata. Un ulteriore trattamento con NaOH potrebbe essere utilizzato per trattare la chitina isolata finale e aumentarne la purezza [38-40]. Invece, con il metodo della fermentazione, l'uso degli enzimi può essere ridotto aggiungendo ceppi microbici selezionati e microrganismi endogeni. La fermentazione può essere a stadio singolo, a due stadi, fermentazione successiva o co-fermentazione [37]. Gli approcci alla fermentazione possono essere classificati in due classi principali: fermentazione dell'acido lattico e fermentazione dell'acido non lattico.

I batteri lattici, durante la fermentazione, trasformano fonti di carbonio come il glucosio e la melassa in acido lattico, creando una condizione di pH basso durante la fermentazione anaerobica. Il carbonato di calcio presente nel guscio del crostaceo reagisce con l'acido lattico, formando lattato di calcio precipitabile e separabile dalla frazione contenente chitina. Quest'ultima, ottenuta da processi biologici mediante batteri privi di chitinasi, ha il vantaggio di conservare la sua struttura originaria e di essere

omogenea, risultando un prodotto finale di alta qualità. Inoltre, i residui di fermentazione contengono idrolizzati proteici e lattato di calcio, che possono essere utilizzati come integratori alimentari per ridurre i costi di trattamento delle acque reflue e migliorare l'utilizzo degli scarti dei crostacei [39, 42, 45]. Poiché i LAB (lactic acid bacteria) hanno una capacità relativamente limitata di produrre proteasi, vengono spesso impiegati insieme a batteri produttori di proteasi, come *Bacterium HP1*, *Bacillus cereus* e *Serratia marcescens*, per migliorare l'efficienza della deproteinizzazione. Tuttavia, poiché i batteri lattici e i produttori di proteasi hanno esigenze di crescita ottimali diverse, è necessario un tempo di fermentazione più lungo e operazioni di fermentazione più complesse per soddisfare le esigenze di entrambi i batteri nella fermentazione in due fasi. L'idrolisi enzimatica e la fermentazione simultanee rappresentano un'alternativa che evita tali complicazioni. Data l'influenza di vari fattori sull'efficienza della deproteinizzazione e della demineralizzazione, tra cui la concentrazione di glucosio, la dimensione delle particelle, il pH iniziale, la temperatura e il tempo di fermentazione, è cruciale ottimizzare le condizioni di fermentazione per garantire un'elevata resa di entrambi i processi [39, 42].

Tuttavia, i livelli elevati di proteine residue e i tempi di reazione prolungati nel processo biologico, insieme ai costi più alti rispetto al metodo chimico, ne limitano l'applicabilità su larga scala industriale. Quindi, è necessario migliorare i processi biologici per la produzione di chitina e dei suoi derivati. Nonostante il suo potenziale promettente, la letteratura scientifica pubblicata fornisce informazioni limitate su un

metodo di estrazione biologica, specialmente su come renderlo un'alternativa concorrente al metodo chimico nel processo di produzione del chitosano[41,42].

2.2 Composti bioattivi dagli scarti dei gamberi

La lavorazione dei gamberi produce un'enorme quantità di scarti, tra cui testa, coda, viscere, cefalotorace ed esoscheletro, che solitamente vengono scartati senza ulteriore lavorazione. Data l'importanza di questi scarti, l'industria di lavorazione può sfruttarli ulteriormente per lo sviluppo di diversi prodotti a valore aggiunto; infatti, i benefici per la salute di queste sostanze sono stati stabiliti da numerosi studi condotti in tutto il mondo [42, 43].

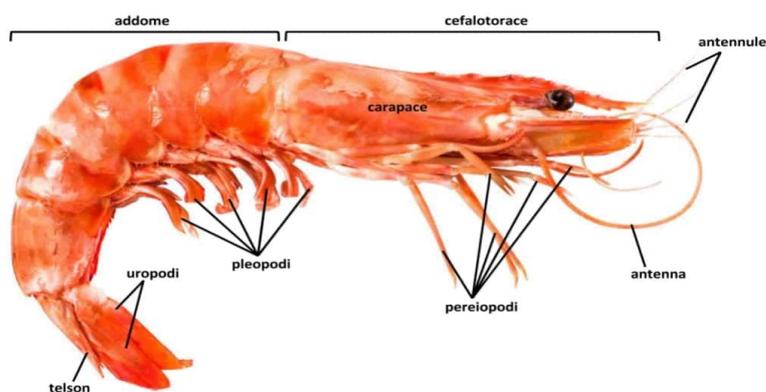


Figura 4: Descrizione anatomica del gambero.

Il prezzo, riportato nel 2006, della polvere di gusci di gamberi essiccati è di 100-120 dollari USA (USD) a tonnellata, il che è paragonabile ai rifiuti di biomassa lignocellulosica agricola [43]. Esiste quindi un enorme potenziale nel recupero e nell'utilizzo di questi scarti invece di trattarli come rifiuti.

Il contenuto biochimico degli scarti di gamberi ha rivelato la presenza del 10-40% di proteine, del 15-46% di chitina, del 30-60% di minerali e del 10-40% di lipidi [7, 44]. Sono stati studiati vari composti bioattivi, provenienti dagli scarti di gamberi, quali chitina/chitosano, pigmenti (astaxantina), idrolizzati proteici (peptidi), acidi grassi polinsaturi e α -tocoferolo (figura 5).

La chitina e il suo derivato chitosano, già discussi nel paragrafo 2.1.4, possiedono una notevole versatilità e sostenibilità, che li rendono particolarmente adatti per applicazioni biomediche, farmaceutiche e alimentari.

L'astaxantina, il principale carotenoide (75-95% del pigmento totale) presente nei gusci dei crostacei e responsabile del caratteristico colore rosa-arancio dei gamberetti, è un pigmento liposolubile e può essere estratto dalla testa, dall'epatopancreas e dal guscio dei gamberi [45]; è un antiossidante molto potente con proprietà dieci volte superiori a molti altri carotenoidi: 100 volte più potente dell' α -tocoferolo e 1000 volte più efficace del coenzima Q10 [46]. L'astaxantina agisce come agente antinfiammatorio, per il trattamento di disturbi della pelle indotti dai raggi UV, mantenendo così la pelle sana [47], ed è anche usata nell'acquacoltura per migliorare

la pigmentazione dei frutti di mare d'allevamento, rendendoli visivamente più attraenti per i consumatori [48]. Grazie a queste eccezionali proprietà, l'astaxantina è diventata il carotenoide più prezioso utilizzato nell'industria alimentare [49].

L'idrolisi enzimatica dei gusci di gamberi rilascia peptidi bioattivi e aminoacidi liberi. I peptidi sono brevi sequenze di aminoacidi, frammenti di proteine che vengono resi disponibili grazie all'azione di opportuni enzimi durante il processo di digestione degli alimenti. All'interno della famiglia dei peptidi, sono definiti bioattivi quelli in grado di esercitare un effetto benefico sulle funzioni corporee e sul mantenimento della salute generale, al di là del mero valore nutrizionale: finché restano incorporati all'interno della proteina nativa, questi peptidi non mostrano alcuna attività biologica, ma una volta liberati grazie all'idrolisi enzimatica, possono agire su importanti funzioni fisiologiche, tra cui la regolazione del metabolismo, la trasmissione dei segnali tra le cellule, il sostegno delle difese immunitarie, l'azione antiipertensiva, antinfiammatoria e antiossidante [50]. Gli idrolizzati dei gusci di gamberi hanno mostrato negli alimenti, funzionali e no, e nelle formulazioni nutraceutiche con effetti antipertensive, significative attività antiossidanti, il che rivela la loro potenziale applicabilità [51].

I gusci di gamberi presentano una buona fonte di minerali, in particolare calcio e fosforo. I minerali estratti da tale matrice possono essere utilizzati come integratori nell'alimentazione animale, in particolare per il pollame e il bestiame. Questi minerali

contribuiscono a una migliore salute delle ossa e alla crescita complessiva degli animali [52].

Un altro composto bioattivo molto importante è l' α -tocoferolo o vitamina E, liposolubile con proprietà antiossidanti e funzionalità espressa nei sistemi muscolare e riproduttivo. Il contenuto di tocoferolo nei rifiuti di gamberi varia a seconda dei diversi tipi o specie, età, genere, parte dello scarto e tipo di processo di estrazione [53].

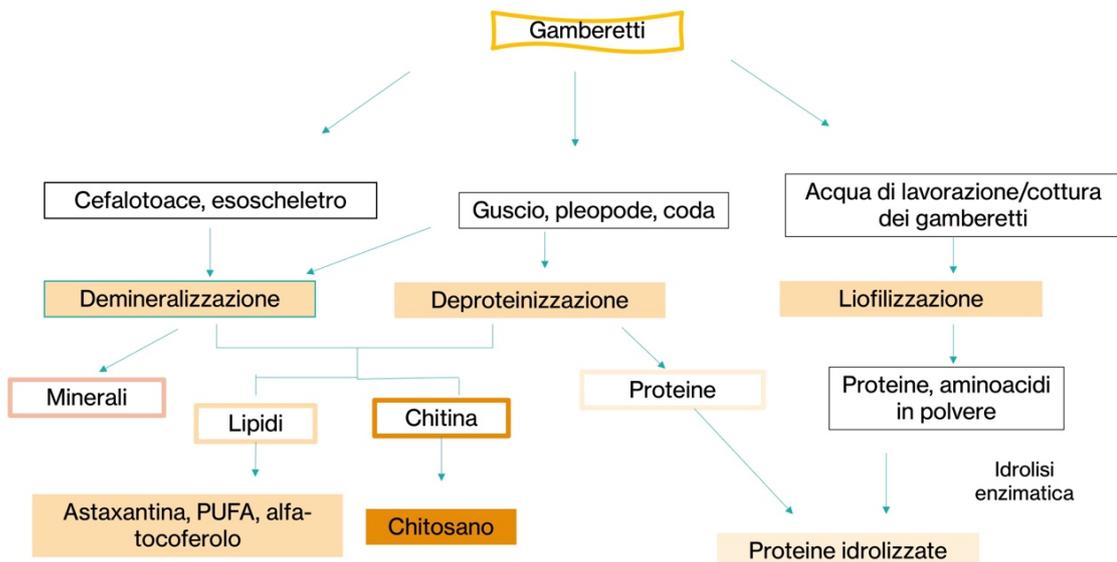


Figura 5: Prodotti ottenibili dagli scarti dei gamberi.

I composti bioattivi isolati dagli scarti di gambero sono stati analizzati per varie bioattività come attività antiossidanti, antimicrobiche, antinfiammatorie, ACE inibitorie, antiproliferative, cicatrizzanti, antidiabetiche, ecc. [7].

3. Packaging alimentari

Il packaging alimentare ha attraversato un'evoluzione sostanziale nel corso della storia umana, passando da soluzioni primitive a sistemi sofisticati e innovativi. Sebbene l'obiettivo primario rimanga la preservazione della freschezza, della qualità e della sicurezza degli alimenti, c'è da evidenziare quanto le tecniche impiegate siano drasticamente mutate nel corso del tempo. Fin dall'inizio, l'uomo ha cercato di salvaguardare gli alimenti da contaminazioni e deterioramento. In epoche remote, venivano impiegati materiali naturali come foglie, gusci di frutta, pelli di animali e fibre vegetali per avvolgere e proteggere alimenti come frutta, carne e verdura. Questi imballaggi primordiali, sebbene biodegradabili e facilmente accessibili, mostravano limitate capacità di conservazione.

Con l'avvento di pratiche agricole più sofisticate, l'uomo è stato in grado di sviluppare metodi più avanzati per conservare gli alimenti, consentendo loro di affrontare periodi di carestia e di conservare cibi deperibili per periodi più lunghi. Fra le pratiche più antiche e tuttora in uso si ricordano la salatura, la fermentazione, l'affumicazione e l'essiccazione. Queste tecniche non solo prolungano la durata di conservazione degli alimenti ma spesso conferiscono loro anche sapori distinti e desiderabili.

Con l'avvento della rivoluzione industriale, l'industria alimentare ha conosciuto un'enorme crescita. Nel corso del XIX secolo si è assistito a significativi progressi nel packaging alimentare grazie all'invenzione delle lattine di conserva. La necessità di

conservare gli alimenti per le truppe in guerra ha portato Napoleone Bonaparte a offrire una ricompensa per lo sviluppo di un metodo efficace di conservazione. Questo ha dato vita alle lattine sigillate, rivoluzionando il modo in cui gli alimenti venivano preservati e trasportati. Inoltre, nello stesso periodo, sono state sviluppate le prime bottiglie di vetro, che hanno consentito la conservazione di bevande come il vino e le bevande gassate. Il vetro ha fornito un'ottima barriera contro l'ossigeno e gli agenti contaminanti, garantendo la qualità degli alimenti e delle bevande conservate al loro interno [54].

Verso la metà del XX secolo, la plastica ha assunto un ruolo predominante nel packaging alimentare. La sua versatilità, leggerezza e resistenza l'hanno resa un'opzione ideale per confezionare una vasta gamma di prodotti alimentari. Dall'introduzione delle buste e dei sacchetti in plastica alle vaschette termoformate e alle bottiglie di plastica, il packaging alimentare ha subito una trasformazione radicale [55]. Tuttavia, l'aumento dell'uso sconsiderato della plastica ha comportato anche problemi ambientali significativi, come l'inquinamento marino e l'accumulo di rifiuti plastici. Di conseguenza, negli ultimi decenni, c'è stata una crescente consapevolezza sulla necessità di ridurre l'uso della plastica monouso e di sviluppare soluzioni di packaging più sostenibili. Questo ha portato a un'intensa ricerca e sviluppo di alternative alla plastica tradizionale, come materiali biodegradabili, compostabili e riciclabili. Ad esempio, si stanno sempre più sviluppando imballaggi a base di

materiali naturali come il mais, il bambù, la canna da zucchero e il cartone riciclato che riducono l'impatto ambientale [56,58,59].

La tecnologia ha svolto un ruolo cruciale nell'innovazione del packaging alimentare: sistemi di confezionamento sottovuoto, film protettivi avanzati, etichettature intelligenti e sensori di freschezza consentono di prolungare la durata di conservazione degli alimenti e migliorare la sicurezza alimentare [57-60.]

3.1 Proprietà chimico-fisiche dei packaging alimentari

Proteggere un prodotto alimentare significa ridurre gli effetti dell'ambiente esterno dalla perdita di qualità e garantire una shelf life adeguata in base al tipo di prodotto e al suo canale distributivo. Pertanto, quando si valutano materiali di confezionamento alternativi, è necessario testare l'idoneità funzionale attraverso studi comparativi di shelf life. Infatti, una nuova soluzione di packaging potrebbe essere presa in considerazione come alternativa solo se garantirà il raggiungimento degli standard di conservazione.

Le proprietà dell'imballaggio che influenzano la durabilità dell'alimento sono varie; le principali sono la resistenza alle sollecitazioni meccaniche, la trasparenza alla luce e le proprietà di barriera a gas e vapori.

Le proprietà meccaniche comprendono quelle proprietà fisiche che descrivono il comportamento di un solido sottoposto all'applicazione di una forza che può essere rappresentata dal suo stesso peso o da una sollecitazione esterna: quindi, la massa volumica, le proprietà di resistenza meccanica e il coefficiente di frizione.

La massa volumica, sinonimo di densità, rappresenta il peso dell'unità di volume, le cui unità di misura più frequentemente impiegate per definirla sono: g cm^{-3} e kg m^{-3} .

La massa volumica può essere considerata una stima della concentrazione della materia e permette di differenziare agevolmente i diversi materiali (tabella 1).

MATERIALE	Massa volumica (g cm^{-3})
Acciaio	8
Banda stagnata	8
Alluminio	2.7 - 3.2
Vetro	2.4 - 2.8
Cellophane	1.5
Polistirene	1.04 - 1.08
Polipropilene	0.88 - 0.91
Legno (quercia)	0.60 - 0.90
Carta	0.75 - 1.15

Tabella 1: Massa volumica dei principali materiali

Le proprietà di resistenza meccanica rappresentano l'abilità di una confezione di rimanere integra durante le fasi di distribuzione e vendita. Esse dipendono sia dalle proprietà meccaniche del materiale di imballaggio ma anche dall'efficacia della chiusura dell'imballaggio.

Le proprietà di resistenza meccanica dipendono anche da forze statiche, cioè quelle applicate in modo costante e per tempi discreti che si esercitano durante l'impilamento sugli scaffali o sui pianali di carico o in seguito ad un avvolgimento in termoretraibile o con altri mezzi di contenimento o, ancora, per effetto della pressione interna come nel caso delle bevande carbonate; le forze dinamiche, invece, sono quelle che si esauriscono in breve tempo come in conseguenza di un urto, di una caduta, di una vibrazione.

In relazione alla direzione di applicazione, le forze che interessano i materiali di imballaggio possono essere di tensione, compressione, scoppio, strappo o impatto (vedi figura 6).

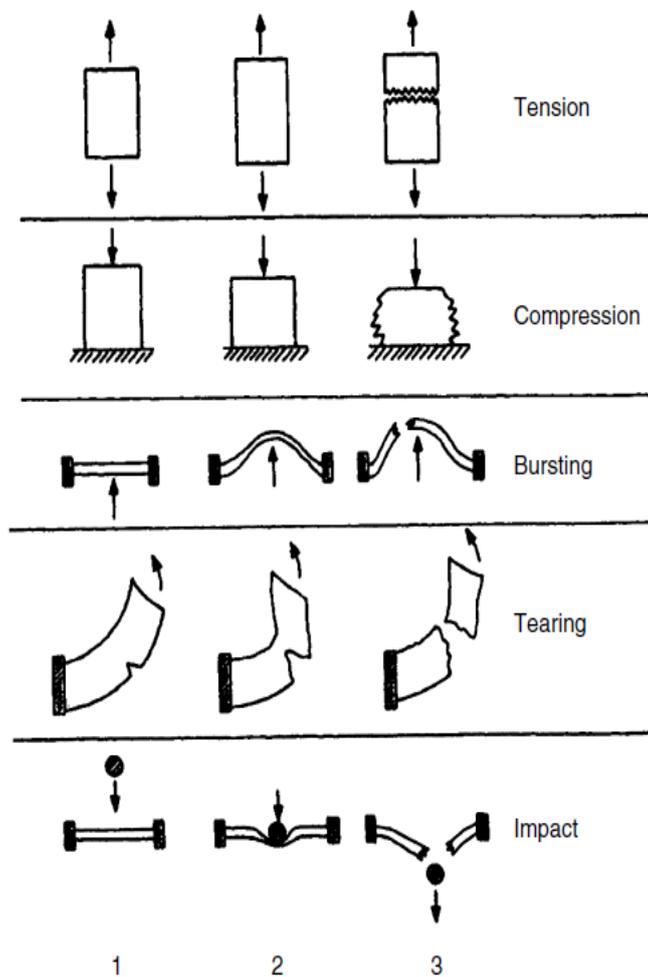


Figura 6: Test che valutano la resistenza del materiale di imballaggio sotto forze di tensione, compressione, scoppio, strappo o impatto.

Il test di resistenza alla trazione consiste nel sottoporre un provino, di forma e dimensioni rispondenti a precise specifiche, a una forza di trazione lungo il suo asse, con una velocità di deformazione controllata, sino alla rottura (figure 7-8)

La prova viene solitamente realizzata con uno strumento chiamato dinamometro.

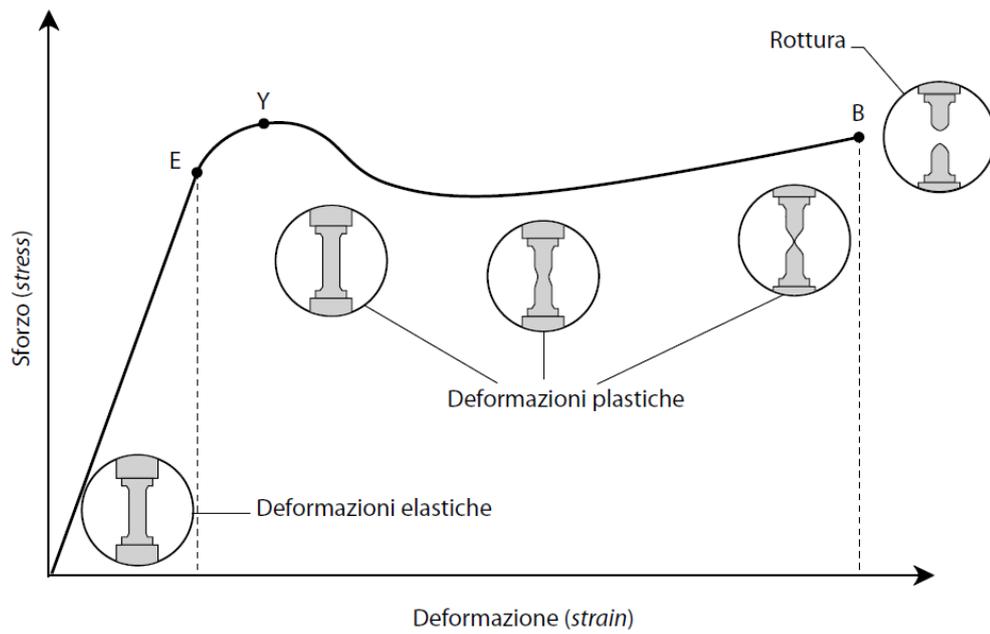


Figura 7: Comportamento di un provino sottoposto a trazione (curva sforzo/deformazione)

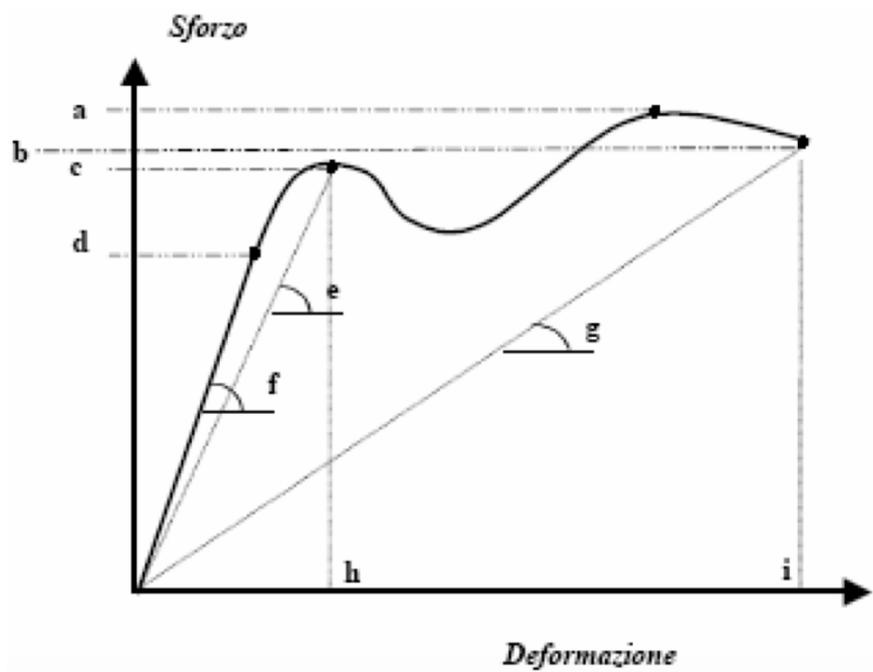


Figura 8: Comportamento di un provino sottoposto a trazione (curva sforzo/deformazione)

Legenda:

a: resistenza alla trazione (Nmm^{-2})

b: limite di rottura (Nmm^{-2})

c: limite di snervamento (Nmm^{-2})

d: limite di elasticità (Nmm^{-2})

e: modulo di snervamento

f: modulo di elasticità

g: modulo di rottura

h: allungamento allo snervamento (%)

i: allungamento alla rottura (%)

I parametri quantitativi sono:

- Modulo di elasticità, (modulo di Young, N mm^{-2}): più alto è il modulo, maggiore è la rigidità del materiale. Corrisponde al rapporto tra lo sforzo e la corrispondente deformazione, rapporto che è costante nel tratto lineare della curva;
- Limite di elasticità (limite di proporzionalità, N mm^{-2}): rappresenta la massima sollecitazione che il materiale è capace di sostenere senza che si verifichi una deviazione dalla proporzionalità diretta tra sforzo e deformazione;
- Limite di snervamento (N mm^{-2}): rappresenta la sollecitazione che corrisponde alla prima significativa inflessione della curva, quando ad un aumento della deformazione non corrisponde un aumento della sollecitazione e la pendenza si annulla;
- Modulo di snervamento (N mm^{-2}): è la pendenza del segmento lineare che unisce l'origine del diagramma al limite di snervamento.
- Allungamento alla rottura: incremento percentuale di allungamento della dimensione originale (la deformazione) al momento della rottura del provino; a volte viene registrato anche l'allungamento allo snervamento o al massimo sforzo;
- Resistenza alla trazione (sollecitazione massima, N mm^{-2}): rappresenta la massima sollecitazione registrata che non corrisponde necessariamente a quella di rottura;

- Limite di rottura (sollecitazione di rottura, $N\text{ mm}^{-2}$): è lo sforzo registrato al momento della rottura del provino;

- Modulo di rottura: è la pendenza del segmento lineare che unisce l'origine del diagramma al limite di rottura ed è espresso generalmente in $N\text{ mm}^{-2}$ [61].

Le altre proprietà che influenzano la durabilità dell'alimento sono la permeabilità ai gas e al vapore acqueo, e la capacità di bloccare la luce e i raggi UV.

La permeabilità a O_2 , CO_2 e vapore acqueo è una delle caratteristiche indicate nelle schede tecniche dei film plastici per il confezionamento alimentare e costituisce un parametro cruciale nella scelta del materiale. La propensione di un materiale a essere attraversato da gas e vapori dipende dalla natura del polimero e dalla sua struttura.

Nell'imballaggio alimentare sono importanti quattro gas: il vapore acqueo, l'ossigeno, l'azoto e l'anidride carbonica.

Il vapore acqueo è di grande importanza nell'imballaggio alimentare perché bisogna far sì che l'alimento con il tempo non perda umidità (si secchi), e non ne acquisisca (diventi molliccio, gommoso).

Azoto ed ossigeno sono i due componenti fondamentali dell'atmosfera; mentre l'azoto è inerte, l'ossigeno è fortemente reattivo sia perché può ossidare alcuni componenti

degli alimenti (ad esempio i grassi), sia perché la proliferazione batterica e lo sviluppo di muffe spesso avvengono solo in presenza di ossigeno.

Tuttavia, la struttura può essere modificata per migliorare le prestazioni di barriera, ad esempio aumentando il grado di cristallinità del polimero.

- Spessore: misurare lo spessore di ogni tipo di materiale è estremamente importante, non solo al fine di determinare il costo di un prodotto ma anche perché lo spessore influenza svariate caratteristiche quali la resistenza, la permeabilità, ecc.
- Tenuta: è importante garantire la totale tenuta dell'imballaggio per assicurare che microorganismi indesiderati e aria (ossigeno) possano danneggiare il prodotto. A sua volta occorre che il prodotto imballato non produca perdite verso l'esterno.
- Resistenza delle saldature: è possibile misurare la resistenza di una saldatura per determinare la forza che la saldatura è in grado di sopportare [61].

3.2 Pellicole alimentari

La pellicola alimentare, conosciuta anche come carta velina o pellicola estensibile per il confezionamento alimentare, è uno strato sottilissimo di materiale plastico utilizzato per avvolgere porzioni di cibo; aiuta a conservare il sapore, il profumo e la consistenza

degli alimenti mantenendoli isolati dal contatto con l'aria. Le prime pellicole per alimenti furono realizzate in cellophane, un materiale cellulosico trasparente, la cui sintesi venne scoperta all'inizio del XX secolo. Con il passare dei decenni, la produzione di pellicole alimentari si estese anche a vari polimeri organici, tra cui il polietilene. A partire dagli anni Trenta del Novecento, iniziò la produzione di pellicole in PVC, che dominarono il mercato per buona parte del XX secolo grazie alla loro economicità e facilità d'uso. Il polivinilcloruro, noto anche come cloruro di polivinile o semplicemente PVC, è il polimero del cloruro di vinile, con formula C_2H_3Cl e un peso molecolare che varia tra 60.000 e 150.000 unità di massa atomica. È il più importante tra i polimeri derivati da monomeri vinilici ed è una delle materie plastiche più utilizzate al mondo. Nella sua forma pura, il PVC è un materiale rigido. La sua versatilità deriva dalla possibilità di essere miscelato, anche in grandi proporzioni, con composti inorganici e prodotti plastificanti, come gli esteri dell'acido ftalico, che lo rendono flessibile e modellabile. Il PVC è considerato stabile e sicuro per le applicazioni tecnologiche a temperatura ambiente. Tuttavia, diventa estremamente pericoloso se bruciato o riscaldato a elevate temperature in impianti non adeguati, a causa del cloro presente nella molecola. In queste condizioni, il cloro può liberarsi come acido cloridrico, secondo la seguente reazione: $2C_2H_3Cl + 5 O_2 \rightarrow 4CO_2 + 2 H_2O + 2HCl$.

A causa dei riconosciuti rischi legati agli additivi impiegati nella produzione del film in PVC, negli ultimi anni, si è registrato un significativo aumento nella produzione di

pellicole alimentari realizzate con altre materie plastiche, in particolare il polietilene e l'EVA (etilene vinil acetato). È noto da tempo che l'uso di alcune pellicole plastiche può causare la contaminazione degli alimenti con sostanze nocive per la salute. Gli ftalati, addizionati al PVC per migliorarne flessibilità e modellabilità, sono particolarmente problematici. Il rischio di contaminazione è maggiore per gli alimenti ad alto contenuto lipidico, nei quali gli ftalati sono più facilmente solubili. Attualmente, la legislazione limita fortemente la quantità di ftalati nelle pellicole, e molte aziende offrono pellicole a base di polietilene che non contengono PVC; già dal 2007 la legislazione europea ha vietato l'uso degli ftalati nelle pellicole destinate agli alimenti e ha stabilito che nei contenitori plastici possano essere presenti in concentrazioni non superiori allo 0,05%. Nelle pellicole per alimenti al posto degli ftalati si usano dei plastificanti adipati che sono considerati non nocivi dall'Oms. Infatti, le eventuali migrazioni di adipati avvengono solo se la pellicola resta a contatto con olio puro a 40°C di temperatura per oltre 10 giorni: una situazione limite non certo comune in cucina.

Le crescenti preoccupazioni ambientali, politiche ed economiche legate all'uso della plastica convenzionale hanno spinto sempre di più la produzione di biopolimeri da risorse rinnovabili [62].

Per lungo tempo, i film e i rivestimenti commestibili sono stati utilizzati prevalentemente con formulazioni monocomponenti. Tuttavia, recentemente, sono stati condotti numerosi studi su materiali commestibili bicomponenti e

multicomponenti che offrono migliori proprietà funzionali. In questi casi, i film o rivestimenti compositi vengono preparati combinando due o più leganti per ottenere strutture con proprietà fisiche, meccaniche e barriera migliorate, superiori rispetto a quelle di un materiale monocomponente. Perciò, nei preparati filmogeni vengono impiegate diverse sostanze, come plastificanti (glicerolo, glicole poliossietilenico, glicole propilenico, sorbitolo), reticolanti, emulsionanti e potenziatori (acidi grassi vegetali), per migliorare o modificare la funzionalità di base del materiale. Tuttavia, se introdotti in eccesso, possono deteriorare le proprietà meccaniche e aumentare la permeabilità al vapore acqueo (glicole polipropilenico, sorbitolo) [63-65]. La creazione di nuove pellicole commestibili antimicrobiche per la conservazione degli alimenti rappresenta una delle principali sfide tecnologiche che l'industria alimentare dovrà affrontare nei prossimi anni.

Al fine di progettare la pellicola più adatta è importante conoscere l'influenza di diversi fattori sulle sue proprietà. Una delle tecnologie più promettenti per preservare la qualità e la sicurezza degli alimenti durante la conservazione è lo sviluppo di pellicole commestibili bioattive. Queste pellicole, realizzate con polimeri biodegradabili come il chitosano o i derivati della cellulosa, sono combinate con antimicrobici e/o composti antiossidanti: i composti naturali stanno attirando sempre più attenzione come alternative agli agenti chimici, in risposta ai cambiamenti legislativi e alle tendenze dei consumatori [64]. Tra i composti naturali maggiormente studiati figurano gli oli essenziali, noti per la loro documentata attività antimicrobica

contro microrganismi patogeni, batteri, muffe e lieviti; gli oli essenziali risultano fondamentali per la formulazione di pellicole alimentari, sia per il proprio potere antimicrobico ma anche perché vengono incorporati, come composti idrofobi, per aumentare la proprietà di barriera all'acqua [66-67]. È stato riscontrato che l'intensità di queste interazioni dipende dal tipo di olio essenziale usato; ad esempio, è stato dimostrato che l'incorporazione di olio essenziale di cannella nelle pellicole di chitosano provoca una riduzione della compattezza della pellicola il che non è accettabile perché le pellicole devono avere buone proprietà meccaniche, un aspetto adeguato in termini di lucentezza e trasparenza e buone proprietà di barriera all'ossigeno, all'anidride carbonica e all'acqua. Al fine di mettere a punto pellicole commestibili con proprietà adeguate, sono state studiate pellicole commestibili a base di chitosano contenenti olio essenziale di bergamotto. L'olio di bergamotto (BO) è estratto dal *Citrus bergamia* e può essere utilizzato per evitare la crescita microbica senza alcun impatto sul sapore del prodotto alimentare [68].

Si può infatti affermare che le pellicole e i rivestimenti commestibili offrono numerosi vantaggi rispetto a quelli sintetici:

- Aiutano a ridurre i rifiuti di imballaggio grazie alla loro natura biodegradabile.
- Funzionano come una barriera ai gas e all'umidità, creando un'atmosfera modificata attorno a frutta e verdura fresca, prolungandone così la durata di conservazione e preservandone la qualità.

- Agiscono come barriera contro i microrganismi, contribuendo così a mantenere una corretta igiene.
- Possono incorporare diversi principi attivi, come agenti anti-imbrunimento, coloranti, aromi, nutrienti e spezie, che possono essere consumati insieme al frutto, aumentando la sicurezza e migliorando le proprietà nutrizionali e sensoriali [69-70].

3.3 Biopolimeri per imballaggi alimentari

La crescente preoccupazione per l'inquinamento marino ed ecologico causato dai rifiuti di plastica ha spinto lo sviluppo rapido di materiali biodegradabili per l'imballaggio alimentare. Questi nuovi materiali, noti come biopolimeri, rappresentano la quarta generazione di imballaggi e offrono vantaggi significativi in termini di biodegradabilità, lavorabilità, possibilità di combinazione e sicurezza alimentare. Essi sono ottenuti da fonti economiche e facilmente disponibili, come biomasse o monomeri bioderivati, e possono persino provenire da rifiuti industriali o agricoli. I biopolimeri vengono impiegati per la produzione di pellicole e rivestimenti per l'imballaggio alimentare, garantendo al contempo la sicurezza alimentare, le proprietà meccaniche, termiche e di barriera necessarie, oltre alla durabilità.

La figura 9 illustra come i biopolimeri, una volta terminato il ciclo di vita, possono entrare nella fase di riciclaggio, formando un ciclo chiuso.



Figura 9: Diagramma rappresentativo del ciclo chiuso dei biopolimeri.

I biopolimeri si dividono principalmente in tre categorie (fig.10): quelli estratti direttamente dalla biomassa, quelli sintetizzati da monomeri bioderivati come il polilattide (PLA) e altri poliesteri, e infine quelli prodotti direttamente da microrganismi, come il poliidrossialcanoato (PHA) e il poliidrossibutirrato (PHB). Questi materiali sono abbondanti e rinnovabili, consentendo un ciclo completo dal loro utilizzo fino al loro ritorno alla natura [71].

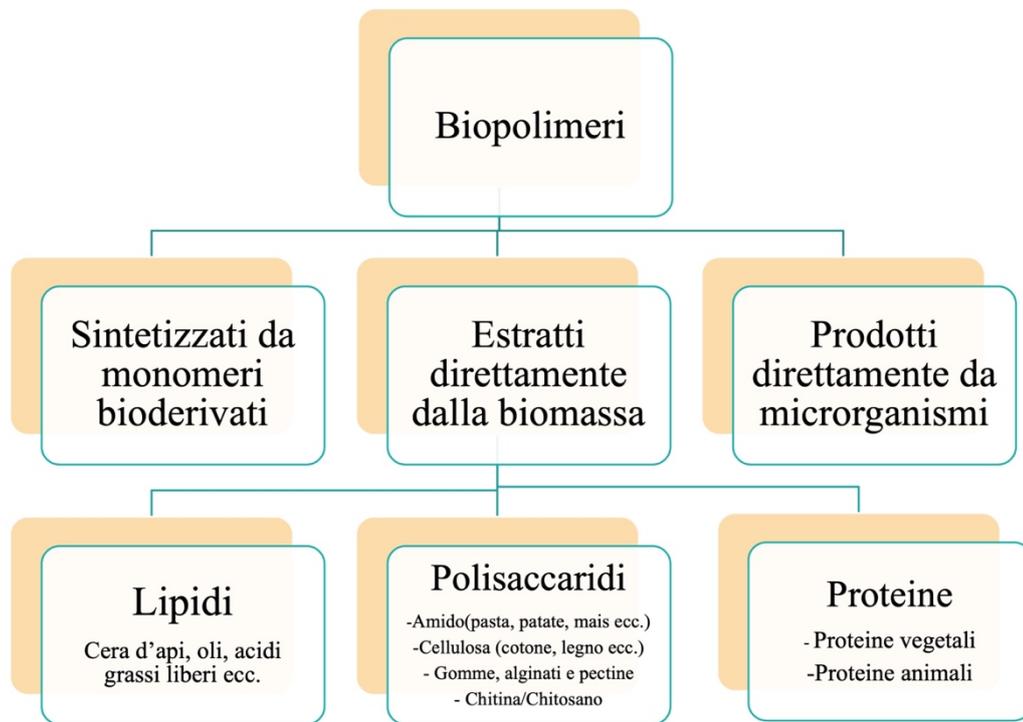


Figura 10: Origine dei biopolimeri.

Tra i biopolimeri che vengono sintetizzati da monomeri bioderivati, il più importante è il polilattide (PLA), un poliestere alifatico a base biologica derivato dall'acido lattico (acido 2-idrossipropionico), ottenuto principalmente da fonti animali o vegetali come cellulosa, amido, mais, scarti di pesce e scarti di cucina. È anche chiamato “polimero del XXI secolo” ed è l'unico sintetizzato su larga scala, che è contemporaneamente biocompatibile e biodegradabile [72].

Recentemente, è stato dato risalto all'utilizzo di materie prime di terza generazione, come i microbi che non competono per cibo, terreno e acqua né con umani né con

animali. Le bioplastiche microbiche sono polimeri sintetizzati all'interno del citoplasma di alcune cellule come "corpi di inclusione" insolubili in acqua e sono descritti come "interamente naturali e biodegradabili". È stato dimostrato, infatti, che i polimeri microbici hanno proprietà dei materiali adatte a molte applicazioni industriali grazie alla loro somiglianza con le plastiche convenzionali [73].

I materiali utilizzati nella preparazione dei biopolimeri, estratti direttamente dalla biomassa, sono basati, attraverso la valorizzazione di scarti agroalimentari, sul recupero di polisaccaridi, proteine o lipidi (vedi figura sopra). In questo contesto, ha suscitato un notevole interesse la valorizzazione degli scarti agroalimentari e l'estrazione di biopolimeri direttamente da biomasse come polisaccaridi, proteine e lipidi, ma anche da biomasse di lievito, alghe o fermentazione batterica. Questo interesse è particolarmente rilevante per applicazioni in dispositivi medici, imballaggi alimentari, pellicole agricole, processi a membrana e abbigliamento sostenibile. Nonostante i recenti sviluppi di successo dei polimeri di origine biologica su scala industriale, l'attenzione continua a concentrarsi sulla loro ottimizzazione per un migliore sfruttamento industriale [73-74].

3.3.1 Lipidi

I rivestimenti lipidici sono stati utilizzati per secoli per proteggere gli alimenti e prevenire la perdita di umidità. Nel XVI secolo, negli Stati Uniti, i prodotti alimentari

venivano rivestiti con rivestimenti lipidici proprio per controllarne l'umidità. Successivamente, cera di paraffina e carnauba e rivestimenti a base di emulsioni olio in acqua furono impiegati per frutta e verdura fresca. Nel XXI secolo i rivestimenti furono usati anche per apportare lucentezza e per prevenire la perdita d'acqua in verdura e frutta. Il prolungamento della shelf-life degli agrumi freschi mediante l'applicazione di lipidi è noto da secoli. Al giorno d'oggi, la crescente domanda dei consumatori di prodotti pronti con una durata di conservazione più lunga ha stimolato la ricerca su nuove tecniche [75,76].

Diversi lipidi, tra cui grassi e oli, vengono incorporati in soluzioni filmogene per formare strutture a base di emulsione. I più utilizzati sono le cere animali e vegetali, gli oli vegetali e gli acidi grassi. Gli oli vegetali, come olio di mais, olio di oliva, olio di colza e olio di girasole, sono facilmente reperibili, economici, non tossici, sostenibili e non volatili. Inoltre, essi sono una fonte di acidi grassi monoinsaturi, e la loro incorporazione come rivestimento commestibile per i prodotti alimentari offre vari benefici per la salute [77].

Le cere, esteri di acidi alifatici a catena lunga, sono più resistenti alla diffusione dell'acqua rispetto alla maggior parte delle altre pellicole commestibili a causa del loro bassissimo contenuto di gruppi polari e dell'alto contenuto di alcoli grassi e alcani a catena lunga. Si distinguono quelle naturali, derivate da vegetali (ad esempio, carnauba, candelilla e cere di canna da zucchero), minerali (ad esempio paraffina e cere microcristalline) o animali, inclusi insetti (ad esempio cera d'api, lanolina e

grasso di lana), e quelle sintetiche come carbowax e cera di polietilene. Tra i lipidi, le cere producono le migliori proprietà di barriera al vapore acqueo, ma producono pellicole fragili [77-78].

3.3.2 Proteine

Le proteine si distinguono tra i materiali biodegradabili per la loro elevata capacità di formare legami intermolecolari, che sono essenziali per la formazione di pellicole. La capacità di formare pellicole a base di proteine può essere influenzata dalla composizione degli amminoacidi, così come dalla loro distribuzione e polarità che determinano legami crociati tra amminoacidi, legami a idrogeno e ponti disolfuro [80]. Dopo quanto detto, per la realizzazione di una pellicola alimentare proteica si tiene conto della natura delle proteine (idrofile o idrofobe): è necessario valutare le differenze delle proprietà di solubilità delle materie prime perché vanno a influenzare la quantità di energia necessaria per asciugare la pellicola l'applicabilità negli alimenti [79].

I film proteici hanno una buona resistenza al passaggio di gas e ossigeno a bassa umidità e buone proprietà meccaniche; tuttavia, queste pellicole sono sensibili all'umidità e non resistono al vapore acqueo.

Le proteine maggiormente utilizzate per la produzione di packaging alimentare sono quelle del siero del latte. Esse sono proteine del latte, solitamente utilizzate nelle

formule per neonati e sportivi e mostrano un'elevata capacità filmogena. I film di proteine del siero di latte offrono un'ottima resistenza meccanica e proprietà di barriera ai gas a bassa umidità relativa ma anche eccellenti proprietà di barriera all'aroma e ai lipidi [80, 81].

Tra le proteine vegetali le più utilizzate sono quelle del mais come la zeina o quelle della soia; la prima è una sostanza insolubile, termoplastica e possiede eccellenti proprietà filmogene, conferendo ai film a base di zeina un aspetto liscio, un'elevata stabilità termica, la desiderata permeabilità selettiva ed eccellenti proprietà antibatteriche e di barriera. Tuttavia, le pellicole a base di zeina possiedono scarse proprietà meccaniche [82].

Le pellicole proteiche di soia, grazie alla loro natura idrofila e alla sensibilità alle condizioni ambientali, possiedono proprietà meccaniche e di barriera inferiori rispetto alle pellicole sintetiche, anche se un miglioramento viene osservato miscelando diversi polimeri. Pertanto, viene raccomandato l'uso di queste pellicole in alimenti a bassa umidità e nelle industrie farmaceutiche [83-84].

3.3.3 Polisaccaridi

I polisaccaridi sono componenti biodegradabili molto presenti in natura; ne esistono diversi tipi provenienti da varie fonti naturali. I più utilizzati nelle industrie e in particolar modo nell'industria alimentare sono cellulosa, amido, chitina e chitosano e

gomme. Questi polisaccaridi hanno funzioni e strutture diverse e infatti differiscono per dimensioni molecolari, composizione degli zuccheri, conformazione molecolare, legami glicosidici e presenza di diversi gruppi funzionali [85].

I polisaccaridi sono materiali adatti per l'imballaggio alimentare perché hanno delle caratteristiche funzionali e specifiche come per esempio l'efficienza della barriera all'acqua, adatte per la produzione di packaging alimentari; infatti, gli imballaggi prodotti a base di polisaccaridi sono molto usati per ritardare la disidratazione dei prodotti freschi o, al contrario, per l'assorbimento di umidità nei prodotti secchi; un'altra caratteristica è la permeabilità ai gas come l'ossigeno che consente di controllare la maturazione della frutta o di ridurre l'ossidazione di alcuni componenti alimentari come i grassi polinsaturi. Le proprietà di barriera ai gas delle pellicole a base di polisaccaridi sono cruciali per ritardare la perdita di vapori organici (composti aromatici) durante la conservazione o per prevenire la penetrazione di solventi negli alimenti, evitando così tossicità o perdita di qualità [86].

Tra i polisaccaridi più utilizzati nell'industria alimentare troviamo l'amido; l'amido si accumula principalmente nelle radici delle piante nei semi e nei tuberi. È caratterizzato da un gran numero di unità di glucosio polimerizzate unite tra loro da legame α -glicosidico e costituito per 80% da amilopectina e per il 20% da amilosio. Il contenuto di questi componenti nell'amido determina le proprietà della pellicola, poiché le pellicole commestibili con un contenuto di amilosio più elevato hanno migliori

proprietà filmogene, ovvero migliore resistenza meccanica, allungamento e proprietà di barriera ai gas. L'amido, in base alla sua fonte, presenta variabilità significative nel contenuto di amilosio e amilopectina, così come nella dimensione e nella forma dei granuli. Queste differenze influenzano la funzionalità, le proprietà di barriera, le proprietà meccaniche e di assorbimento dell'amido stesso. Le proprietà di assorbimento dell'amido, a loro volta, influenzano la composizione delle pellicole, il processo di produzione e la loro effettiva applicabilità. L'amido è usato come componente nei rivestimenti commestibili grazie alla sua buona barriera contro i gas, come anidride carbonica e ossigeno, alla sua adeguata durabilità e alla forza coesiva. Inoltre, le pellicole di amido sono inodore, insapore, incolore e non tossiche. Tuttavia, una delle principali limitazioni dell'amido è la sua elevata permeabilità al vapore acqueo, che compromette negativamente anche le proprietà meccaniche del rivestimento.

Un altro polimero ampiamente utilizzato è la cellulosa che è insolubile in acqua a causa del gran numero di legami a idrogeno intramolecolari. Tuttavia, la solubilità della cellulosa in acqua può essere aumentata trattandola con alcali, in modo da fare rigonfiare la sua struttura: infatti, i film e i rivestimenti a base di cellulosa sono in grado di trattenere la maggior parte dell'acqua nel prodotto, conferendo così un effetto anti-irrancidimento. Le pellicole di metilcellulosa, idrossipropilmetilcellulosa e idrossipropilcellulosa hanno buone proprietà filmogene e sono anche biodegradabili, insapori, inodori, flessibili, di moderata resistenza, trasparenti, resistenti a grassi e oli

nonché solubili in acqua e moderatamente permeabili all'umidità e ai gas (ossigeno e anidride carbonica) [87].

3.3.3.1 Chitosano

La chitina, materiale strutturale di crostacei, insetti e funghi, è il secondo biopolimero più abbondante sulla Terra, dopo la cellulosa. Il chitosano, un derivato deacetilato della chitina, è un biopolimero funzionalmente versatile grazie alla presenza di gruppi amminici responsabili delle varie proprietà del polimero. Numerosi studi su imballaggi flessibili per alimenti, anche di natura edibile, sono stati concentrati sull'uso di chitosano quale materiale competitivo e alternativo rispetto ai packaging convenzionali a base di plastiche non biodegradabili: la solubilità, il potere filmogeno, la viscosità, il legame ionico, le proprietà antimicrobiche, ecc. rendono il chitosano un polimero versatile, adatto ad applicazioni in diversi ambiti di ricerca, tra cui il confezionamento alimentare [88]. Le proprietà sono principalmente attribuite alla presenza di gruppi amminici nella catena del chitosano che si formano come risultato della deacetilazione della struttura della chitina. Pertanto, il grado di deacetilazione è un aspetto importante nella determinazione delle caratteristiche del packaging a base di chitosano.

Grazie alle sue varie proprietà come l'attività antimicrobica, la proprietà di chelazione, l'attitudine a formare pellicole e una discreta resistenza meccanica, il chitosano, si

distingue rispetto ad altre controparti biopolimeriche per mostrare un enorme potenziale come materiale per l'imballaggio alimentare; inoltre, l'aggiunta di vari additivi non solo migliora ulteriormente le proprietà delle pellicole a base di tale polisaccaride ma conferisce loro diverse funzionalità. Da una valutazione dei dati di letteratura emerge come le pellicole di chitosano abbiano dimostrato ampiamente la loro capacità di estendere la durata di conservazione degli alimenti mantenendone la qualità.

3.4 Quadro normativo

La direttiva 94/62/CE sugli imballaggi e i rifiuti da imballaggio è la legge di riferimento a livello europeo per il settore del packaging. Questa, insieme alle sue successive modifiche, definisce le disposizioni dell'Unione Europea sulla gestione degli imballaggi e i rifiuti da imballaggio. Ad oggi l'ultimo aggiornamento della direttiva 94/62/CE è contenuto nella direttiva (UE) 2018/852, che introduce misure per la prevenzione della produzione dei rifiuti da imballaggio e allo stesso tempo ne promuove il riutilizzo, il riciclaggio e altre forme di recupero. Si applica a tutti gli imballaggi immessi sul mercato nella Comunità e a tutti i rifiuti di imballaggio, utilizzati o prodotti da industrie, esercizi commerciali, uffici, negozi, servizi, nuclei domestici e a qualsiasi altro livello, qualunque siano i materiali che li compongono.

L'impiego delle bioplastiche è cresciuto in modo esponenziale e per riconoscere una bioplastica occorre valutare, classificare ed etichettare secondo EN 13432 e EN 14995. Le bioplastiche sono polimeri provenienti da risorse biologiche e rinnovabili come mais, canna da zucchero, frumento, cellulosa o amido di patate. Il materiale utilizzato deve essere conforme alle norme EN13432 / EN 14995 sulla degradabilità dei componenti.

Il concetto è quello che per essere biodegradabile e compostabile, il materiale utilizzato debba tornare nel ciclo naturale degli elementi in tempi ragionevolmente brevi.

La norma EN 13432 | 2002, intitolata “*Requisiti per imballaggi recuperabili mediante compostaggio e biodegradazione – Schema di prova e criteri di valutazione per l'accettazione finale degli imballaggi*”, richiede che vengano testate le seguenti quattro caratteristiche in un laboratorio:

-Disintegrazione, ovvero frammentazione e perdita di visibilità nel compost finale.

Questo viene misurato in un test pilota di compostaggio (EN 14045) secondo il quale a contatto con materiali organici per un periodo di 3 mesi, la massa del materiale deve essere costituita almeno per il 90% da frammenti di dimensioni inferiori a 2 mm.

-Biodegradabilità, ovvero la capacità del materiale compostabile di essere convertito in CO₂ sotto l'azione di microrganismi. Lo standard contiene una soglia obbligatoria

di almeno il 90% di biodegradazione che deve essere raggiunto in meno di 6 mesi (metodo di prova di laboratorio EN 14046).

- **Bassi livelli di metalli pesanti** (al di sotto di valori massimi predefiniti) e **assenza di effetti negativi sulla qualità del compost** (esempio: riduzione del valore agronomico e presenza di effetti eco tossicologici sulla crescita delle piante).

Le materie plastiche certificate secondo la norma EN 13432 possono (volontariamente) essere riconosciute dai loghi specifici (figure 11-12-13). Insieme a una comunicazione adeguata, queste etichette aiutano i consumatori a identificare correttamente il materiale compostabile. Le materie plastiche compostabili vengono inviate agli impianti di compostaggio industriale mediante smaltimento rifiuti organici, mentre le materie plastiche non compostabili possono essere trattate come al solito nei flussi di rifiuti appropriati (ad es. riciclaggio meccanico).



Figura 11: Etichetta imballaggi compostabili certificati EN 13432 (Logo DIN-CERTCO (D, UK, P, CH) EN 13432, ASTM D6200 Compostable: Compostabilità con test di laboratorio. Certifica l'idoneità al Compostaggio Industriale)

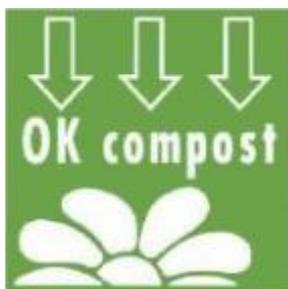


Figura 12: Etichetta imballaggi compostabili certificati EN 13432 (VINCOTTE (Belgio) EN 13432 – OK Compost Compostabilità con test di laboratorio. Certifica l'idoneità al Compostaggio Industriale.



Figura 13: Etichetta imballaggi compostabili certificati EN 13432 (CIC - CertiQuality (Italia) UNI EN 13432, UNI EN 14045 – Compostabile CIC Certifica l'idoneità alla Compostabilità con test su scala reale al Compostaggio Industriale.

Inoltre, tra gli obiettivi della norma EN13432 del 2002 vi è quella di dare chiarezza a concetti sempre più diffusi ma di non immediata comprensibilità quali: biodegradazione, compostabilità, materiali biodegradabili e compostabili.

La EN13432 del 2002 specifica i requisiti e i procedimenti per determinare le possibilità di compostaggio e di trattamento anaerobico degli imballaggi e dei materiali di imballaggio considerando quattro caratteristiche:

- biodegradabilità;
- disintegrazione durante il trattamento biologico;
- effetto sul processo di trattamento biologico;
- effetto sulla qualità del compost risultante.

Nel caso di un imballaggio formato da differenti componenti, alcuni dei quali possono essere sottoposti a compostaggio e altri no, l'imballaggio nella sua interezza non è compostabile. Tuttavia, se i componenti possono facilmente essere separati manualmente prima dello smaltimento, i componenti compostabili possono essere efficacemente considerati e trattati come tali, una volta separati dai componenti non compostabili.

La presente norma europea definisce disposizioni per l'ottenimento di informazioni sulla lavorazione degli imballaggi in impianti di trattamento dei rifiuti controllati ma non prende in considerazione rifiuti di imballaggio che possono finire nell'ambiente attraverso mezzi incontrollati per esempio in discarica.

3.4.1 Definizioni

Disintegrazione: la suddivisione fisica in frammenti piccolissimi dell'imballaggio e dei materiali di imballaggio.

Biodegradabilità "ultima": Decomposizione di un composto chimico organico da parte di microrganismi, in presenza di ossigeno, in anidride carbonica, acqua e sali minerali di qualsiasi altro elemento presente (mineralizzazione) e nuova biomassa o, in assenza di ossigeno, in anidride carbonica, metano, sali minerali e nuova biomassa.

La valutazione della possibilità di trattamento biologico degli imballaggi e dei componenti degli imballaggi deve includere come minimo i cinque seguenti procedimenti di valutazione:

- caratterizzazione;
- biodegradabilità;
- disintegrazione inclusi gli effetti sul processo di trattamento biologico;
- qualità del compost;
- riconoscibilità.

Caratterizzazione: Ogni materiale di imballaggio in corso di verifica deve essere identificato e caratterizzato prima delle prove, includendo almeno:

- informazioni e identificazione dei costituenti dei materiali di imballaggio;
- determinazione della presenza di sostanze pericolose, per esempio metalli pesanti;
- determinazione del contenuto di carbonio organico, residuo secco totale e solidi volatili nel materiale di imballaggio utilizzato per prove di biodegradazione e disintegrazione.

Biodegradabilità: Per essere designato come organicamente recuperabile, ogni imballaggio, materiale di imballaggio o componente di imballaggio deve essere intrinsecamente e definitivamente biodegradabile come dimostrato in prove di laboratorio e in base ai criteri e livelli di accettazione

Disintegrazione: Per essere designato come organicamente recuperabile, ogni imballaggio, materiale di imballaggio o componente di imballaggio deve disintegrarsi in un processo di trattamento biologico dei rifiuti e in base ai criteri e livelli di accettazione, senza alcun effetto negativo osservabile sul processo.

Qualità del compost: Per essere designato come organicamente recuperabile, nessun imballaggio o componente dell'imballaggio, sottoposto ad un processo di trattamento biologico dei rifiuti deve essere registrato come avente un effetto negativo sulla qualità del compost risultante.

Riconoscibilità: L'imballaggio o componente di imballaggio destinato ad entrare nel

circuito dei biorifiuti deve essere riconoscibile come compostabile o biodegradabile da parte dell'utente finale mediante mezzi appropriati.

Prove di laboratorio sulla biodegradabilità: Sono ammesse solo prove di biodegradazione che forniscono informazioni univoche sulla biodegradabilità intrinseca e definitiva di un materiale da imballaggio o dei suoi costituenti organici significativi.

Viene utilizzata la prova di compostaggio aerobico controllato, che è tecnicamente identica alla ISO 14855: 1999, a meno che risulti non idonea per il tipo e per le proprietà del materiale sottoposto a prova.

Nel caso in cui siano necessari metodi alternativi, deve essere utilizzato un metodo di prova della biodegradabilità internazionalmente normalizzato (vedere ISO/TR 15462), in particolare ISO 14851: 1999 e ISO 14852:1999 che sono realizzate per materiali polimerici.

Secondo la norma EN 13432, un materiale per definirsi “compostabile”, deve possedere le seguenti caratteristiche:

- degradarsi almeno del 90% in sei mesi se sottoposto ad un ambiente ricco di anidride carbonica; tali valori vanno testati con il metodo standard EN14046 (anche chiamato ISO14855);

- a contatto con materiali organici per un periodo di tre mesi, la massa del materiale deve essere costituita almeno per il 90% da frammenti di dimensioni inferiori a 2 mm; tali valori vanno testati con il metodo standard EN14045;
- il materiale non deve avere effetti negativi sul processo di compostaggio;
- bassa concentrazione dei metalli pesanti additivati al materiale;
- valori di pH entro i limiti stabiliti;
- contenuto salino entro i limiti stabiliti;
- concentrazione di solidi volatili entro i limiti stabiliti;
- concentrazione di azoto, fosforo, magnesio e potassio entro i limiti stabiliti

4. Scopo della tesi

Negli ultimi decenni si è assistito a una crescente domanda di imballaggi sostenibili, principalmente a causa delle crescenti preoccupazioni sulla diffusa presenza di plastica nell'ambiente. Una grande quantità di plastica sprecata, infatti, proviene dagli imballaggi alimentari, suscitando quindi l'attenzione dei ricercatori su questo tema. Il biopackaging è emerso come un'alternativa promettente agli imballaggi in plastica convenzionali, offrendo allo stesso tempo soluzioni e sfide. Per definizione, il biopackaging è costituito da risorse rinnovabili come estratti vegetali e plastica biodegradabile che riducono considerevolmente i rifiuti di plastica e l'impronta di carbonio [89]. Oltre ai benefici sull'ecosistema terrestre, il biopackaging può fornire vantaggi pratici, tra cui una durata di conservazione prolungata e una maggiore sicurezza alimentare [90]. Di conseguenza, il biopackaging viene sempre più scelto dalle aziende agroalimentari, anche perché è più sicuro per la salute umana rispetto alla plastica tradizionale, classificata come importante responsabile del cancro dell'infertilità e dei disturbi dello sviluppo [91]. Circa dieci anni fa, la tecnologia di imballaggio sostenibile ha iniziato a esplorare un nuovo tipo di materiale, recuperato principalmente dagli scarti dei crostacei: il chitosano, un polimero derivato dalla deacetilazione della chitina. L'interesse per il chitosano è cresciuto fortemente soprattutto per le sue caratteristiche uniche che lo rendono un potenziale e valido sostituto dei film plastici [92-93]. Le principali caratteristiche sono:

- i) biodegradabilità e sostenibilità – il chitosano deriva da fonti rinnovabili e viene degradato da enzimi in sostanze non tossiche [94-95];
- ii) proprietà di barriera contro l'ossigeno, il vapore acqueo e altri gas, esercitando un effetto antideterioramento;
- iii) bioattività – grazie alla sua capacità chelante e alla struttura cationica, il chitosano esercita attività antimicrobiche, antiossidanti e di inibizione enzimatica;
- iv) proprietà meccaniche che consentono di ottenere film dotati di buona flessibilità e trasparenza;
- v) attitudine alla miscelazione: può essere combinato con altri polimeri per migliorare le sue proprietà fisiche.

Oltre ai numerosi vantaggi, gli imballaggi a base di chitosano presentano delle criticità come:

- i. costo di produzione, che comporta prezzi più elevati rispetto alla plastica convenzionale;
- ii. scalabilità della produzione;
- iii. mantenimento nel tempo delle proprietà desiderate;
- iv. bassa compatibilità con alcuni tipi di alimenti, in particolare quelli che presentano un contenuto significativo di umidità e grassi [96].

Per questi motivi, negli ultimi anni i ricercatori hanno sviluppato nuove strategie nella tecnologia di imballaggio al fine di migliorare le proprietà meccaniche e fisiche di questo tipo di biopackaging [93]. Tra questi meritano menzione:

- i) film compositi, ottenuti incorporando altri polimeri naturali, come amido, cellulosa o alginato;
- ii) derivatizzazione del chitosano sui tre siti attivi del polimero come chitosano-acido gallico o chitosano innestato con chinossalina;
- iii) aggiunta di bioattivi che migliorano le proprietà antimicrobiche mantenendo inalterate le proprietà sensoriali;
- iv) nanoparticelle di chitosano che aumentano notevolmente la superficie di contatto con gli agenti deterioranti [93].

Nel presente studio è stata formulata una pellicola a base di chitosano (chitofilm) ottenuta da scarti della lavorazione dei crostacei, con ingredienti innovativi e funzionali. È stata prevista l'incorporazione di ingredienti speciali che hanno contribuito al miglioramento del biopackaging, quali proteine della seta e mucillagine di fico d'india. Per garantire la sicurezza e l'idoneità dell'imballaggio per i prodotti alimentari, le pellicole sono state testate su diversi campioni di formaggio analizzati microbiologicamente. Questi test hanno valutato la potenziale presenza di microrganismi che potrebbero influenzare la qualità e la sicurezza degli

alimenti confezionati. Inoltre, è stata eseguita un'analisi sensoriale per valutare gli attributi complessivi e l'accettazione da parte dei consumatori dei prodotti alimentari confezionati nel chitofilm. Infine, i composti volatili intrappolati nello spazio di testa degli alimenti confezionati sono stati monitorati mediante Microestrazione in Fase Solida (SPME) e gas cromatografia-spettrometria di massa (GC-MS).

5. Materiali e metodi

5.1 Materia prima

Quale materiali di partenza per l'ottenimento del chitosano sono stati utilizzati i gusci di gamberi (SSW), scartati dal mercato ittico. Lo scarto consisteva esoscheletri, antenne, zampe, occhi, rostri e bordi della coda della specie *Parapenaeus longirostris* provenienti dalle Zone FAO 37.1 e 37.2. Il materiale di scarto è stato acquistato nei mercati ittici locali di Messina (Italia).

L'SSW è stato pretrattato attraverso le seguenti fasi: pulizia prima con acqua corrente seguita da acqua distillata; essiccazione in una stufa convenzionale a 90 °C per 3 ore e infine macinazione in polvere tramite un mulino a coltelli (Retsch Grindomix gr 200). La granulometria del grano è stata calcolata mediante granulometro ottico (Haver Computerized Particle Analysis CPA 2-1), e stimata intorno a 1,2 mm. L'SSW pretrattato è stato conservato a -20°C fino alle prove di fermentazione.

5.2 Fermentazione

Per l'ottenimento della chitina dalla polvere di SSW, è stata effettuata una fermentazione batch ispirandosi ad un lavoro precedente [97]. Gli esperimenti prevedevano l'applicazione di due agenti microbici: *Lactobacillus plantarum* e *Bacillus subtilis* e una combinazione di entrambi i batteri in proporzioni uguali (1:1).

In particolare, in un pallone da 250 ml sono stati aggiunti:

- 100mL di terreno di coltura MRS;
- 5% (p/v) di inoculo dei ceppi batterici (1:1) con una concentrazione di 10^8 UFC/mL;
- 80g/L di glucosio;
- 5% (peso netto) del SSW.

Secondo l'approccio fermentativo proposto da Zare et al., il mezzo di fermentazione è stato incubato a 30°C per 160 ore e la velocità dell'agitatore dell'incubatore era di 150 g/min.

5.3 Deacetilazione

Il chitosano è stato prodotto dalla deacetilazione della chitina ottenuta tramite fermentazione. La chitina è stata fatta rifluire con una soluzione acquosa al 50% di

NaOH alla temperatura di 80°C e 120 g/min; la soluzione è stata poi filtrata e lavata con acqua distillata ed infine essiccata in una stufa, a 60°C per 12 ore. Il chitosano ottenuto era di qualità alimentare, con un grado di deacetilazione (DD) attorno all'85%. La DD è stata stimata tramite NMR (Risonanza Magnetica Nucleare) mediante strumentazione Bruker Avance 500 MHz NMR, con lo spettrometro dotato di Smart-Probe. In particolare, la DD è stata calcolata utilizzando gli integrali del picco dovuto a tre protoni del gruppo *N*-acetile a 2.0 ppm e del picco dovuto al protone al C2 a 3.5 ppm sullo spettro H NMR [98, 99]. La resa finale di chitosano è stata di 78,88 g di chitosano da 1 kg di SSW (7,9% p/p).

5.4 Preparazione del biofilm

L'intera procedura di preparazione del film è stata rappresentata attraverso la figura 14.

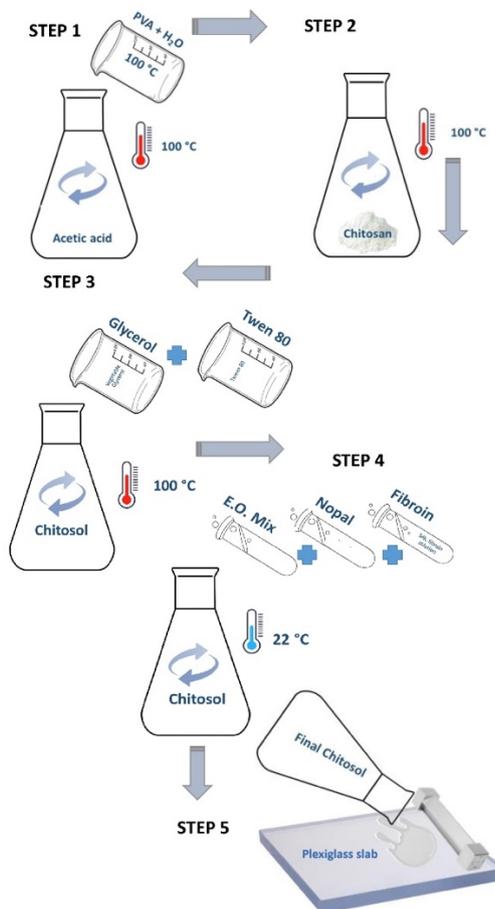


Figura 14: Rappresentazione della preparazione del film a base di chitosano.

La soluzione filmogena (1 L) è stata preparata come segue.

Sono stati disciolti in 100 ml di acqua distillata 3 g di alcool polivinilico granulare (PVA) fino al raggiungimento del punto di ebollizione; è stato dimostrato che il PVA possiede proprietà di barriera ai gas. È considerato un agente impermeabile e migliora le prestazioni meccaniche del prodotto finale come allungamento, resistenza ed elasticità e l'attitudine filmogena della formulazione liquida.

In un pallone, sotto agitazione, alla temperatura di 100°C e ad una velocità di rotazione di 500 g/min, sono stati aggiunti:

- PVA con 100 mL di acqua
- 780 mL di soluzione acquosa di acido acetico glaciale all'1%
- 20 g di chitosano

Il pallone è stato mantenuto in queste condizioni fino a completa dissoluzione.

Come plastificante naturale sono stati aggiunti 20 mL di glicerolo vegetale (99,5% v/v). Successivamente la temperatura è stata abbassata a 80°C per 5 minuti; quindi, alla soluzione sono stati aggiunti 10 mL di Tween 80, come emulsionante. La soluzione filmogena è stata raffreddata fino alla completa stabilizzazione. Successivamente nella soluzione è stata dispersa una miscela di oli essenziali sotto agitazione a 350 g/min per 5 minuti e a temperatura ambiente. La miscela era composta da 0,5 mL di ciascuno dei seguenti oli:

- *Thymus vulgaris*;
- *Calamintha nepeta*;
- *Camellia sinensis*;
- *Origanum vulgare*.

Infine, sono stati aggiunti 4 mL di mucillagine di pala di fico d'india (*Opuntia ficus indica* L. Miller) e 3 ml di soluzione di fibroina della seta. La prima è un addensante

naturale con spiccate attività antimicrobiche e antiossidanti [100] mentre il secondo migliora le proprietà di resistenza e permeabilità all'ossigeno e all'acqua [101]. I film sono stati ottenuti mediante deposizione ed essiccazione a 22°C su una lastra di plexiglass di strati uniformi (300 µm) della soluzione filmogena. Per questa operazione è stato impiegato un applicatore di pellicola in acciaio cromato (Wasag modello 288, ERICHSEN GmbH & Co. kg). I film ottenuti sono stati condizionati in una camera termostata a 23°C, con il 52% di umidità relativa (RH) per 8 ore secondo ASTM D618-13 (Standard Practice for Conditioning Plastics for Testing).

5.5 Prove meccaniche

Il biofilm ottenuto è stato testato per valutarne l'idoneità al confezionamento alimentare. In particolare, le proprietà meccaniche come la resistenza alla trazione e la durezza sono state valutate utilizzando test standard sui biopolimeri. È stata indagata l'influenza che i costituenti della soluzione filmogena esercitano sulle proprietà meccaniche del biofilm.

Sono stati analizzati quattro gruppi di biofilm, denominati A, B, C, D; ciascun gruppo conteneva cinque campioni e ciascun campione è stato analizzato in triplicato. Le proprietà meccaniche del gruppo A, ottenute come sopra descritto, sono state confrontate con quelle degli altri gruppi di campioni che avevano rispettivamente

formulazioni semi-complete (gruppo B), parziali (gruppo C) e base (gruppo D). Si riporta di seguito una breve descrizione dei gruppi:

Gruppo A: formulazione completa della soluzione filmogena;

Gruppo B: formulazione semi completa della soluzione filmogena senza alcool polivinilico;

Gruppo C: formulazione parziale della soluzione filmogena (miscela di chitosano, glicerolo e oli essenziali);

Gruppo D: formulazione base della soluzione filmogena (chitosano e glicerolo).

La resistenza alla trazione (TS) e l'allungamento a rottura (EB) sono stati valutati per ciascun gruppo di campioni secondo lo standard internazionale ASTM D882 -18 (metodo di prova standard per le proprietà di trazione dei fogli di plastica sottili). Le prove di trazione sono state eseguite con la macchina di prova universale modello 1000 (HIKS, Selfords, Redhill, Inghilterra, Regno Unito). Da ciascun campione, tre provini rettangolari (dimensioni: lunghezza, 125 mm; larghezza, 10 mm; spessore, ~ 0,3 mm) sono stati ottenuti mediante fustellatura. Lo spessore di ciascun campione è stato misurato con un micrometro digitale 49-56 della Messmer Büchel (Messmer Büchel - Industrial Physics, LLC, Veenendaal, Paesi Bassi). Le condizioni ambientali delle prove di trazione sono state: Temperatura $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$; umidità relativa (RH) $50 \pm 10\%$;

il condizionamento dei campioni è durato da 24 ore a $23 \pm 2^\circ\text{C}$; velocità della traversa $12,5 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$; distanza tra le impugnature 125 mm.

La durezza (Shore A) è stata valutata per ciascun gruppo di campioni secondo la norma internazionale UNI EN ISO 868:2005. Da ciascun campione sono state ottenute mediante fustellatura tre provette rettangolari (dimensioni: lunghezza 125 mm; larghezza 10 mm; spessore 0,3 mm). La durezza Shore A è stata misurata utilizzando un durometro (H17 A, Wallace, Kingston, Inghilterra). Le condizioni ambientali erano $T 23 \pm 2^\circ\text{C}$; UR, $50 \pm 10\%$ mentre il condizionamento dei campioni è stato per 24 ore a $23 \pm 2^\circ\text{C}$, UR, $50 \pm 10\%$.

5.6. Analisi dei formaggi confezionati

5.6.1 Campioni di formaggio

I campioni di formaggio sono stati acquistati presso caseifici situati a Messina (Italia) ed erano dei seguenti tipi:

- Formaggio a pasta molle
- Camembert
- Formaggio a pasta semidura

Tutti i campioni sono stati avvolti e raggruppati in due lotti diversi:

i) controllo (CTR), avvolto in film di polietilene commerciale;

ii) trattati (TRT), avvolti nel biofilm, detto anche chitofilm.

I campioni, in totale sei, sono stati conservati in un frigorifero con porta in vetro a 5-6°C, fino al momento dell'analisi.

Le analisi sono state eseguite ogni 2, 8 e 22 giorni.

5.6.2 Estrazione di sostanze volatili

In ogni giornata di campionamento sono stati estratti in triplicato due campioni (uno dal gruppo CTR, uno dal gruppo TRT) per ogni tipologia di formaggio. L'estrazione HS-SPME è stata eseguita manualmente perforando la pellicola che ricopre i formaggi. Preliminarmente, i campioni di formaggio (circa 20 gr ciascuno) sono stati tagliati in modo tale da creare uno spazio di testa in cui la fibra potesse essere facilmente esposta all'adsorbimento di sostanze volatili. Il rivestimento della fibra era DVB /Car- PDMS, lungo 1 cm, spesso 80 µm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). La presaturazione è avvenuta ponendo i campioni per 10 minuti a 30°C in un incubatore. L'esposizione della fibra è durata 20 minuti a 30°C in incubatore, dopodiché gli analiti sono stati desorbiti per 5 minuti a 250°C nell'iniettore GC.

5.6.3 Gas cromatografia

Per gli analiti volatili è stato utilizzato un sistema Shimadzu GC-2010 con rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID). L'apparato era dotato di una colonna capillare, precisamente una SLB-5ms (Merck, Darmstadt, Germania), $30\text{ m} \times 0,25\text{ mm i. d.} \times 0,25\text{ }\mu\text{m}$ di spessore del film; il programma della temperatura del forno era da 50°C a $4^\circ\text{C}/\text{min}$ a 250°C (2 min), a $10^\circ\text{C}/\text{min}$ a 300°C (5 min). L'iniezione è avvenuta in modalità splitless, il tempo di campionamento è stato di 5 minuti, rapporto di split 1:20, temperatura 250°C . Velocità lineare del gas di trasporto (He): 30 cm/s . FID: 300°C , gas H_2 ($40\text{ mL}/\text{min}$), N_2 ($80\text{ mL}/\text{min}$), aria ($400\text{ mL}/\text{min}$).

I dati sono stati gestiti mediante il software *GCsolution*.

Le analisi GC-MS sono state eseguite su uno Shimadzu GCMS-QP2010, dotato della stessa colonna capillare sopra descritta. I parametri della spettrometria di massa erano i seguenti: sorgente (EI) 200°C , interfaccia 230°C , velocità di scansione $10.000\text{ amu}/\text{sec}$, intervallo di massa di scansione $35\text{-}350\text{ m/z}$, librerie spettrali di massa FFNSC 2 (Shimadzu, Giappone), Adams 4th edition, Wiley 9, NIST17 e altri database non commerciali. Le corse gascromatografiche sono state acquisite alle stesse condizioni della GC-FID. La gestione dei dati è avvenuta tramite il software *GCMSsolution* (Shimadzu). Oltre alla corrispondenza delle librerie, l'identità dei singoli picchi è stata assegnata in base agli indici di ritenzione, misurati in campioni reali dopo l'estrazione SPME e l'iniezione di una miscela di n- paraffine C8-C18 [102].

5.6.4 Test microbiologici

È stato stimato l'impatto del chitofilm sulla qualità microbiologica e sulla durata di conservazione di tre distinte varietà di formaggio avvolte con lo stesso. Il test microbiologico aveva lo scopo di valutare l'attitudine del film a migliorare la durata di conservazione e a preservare la qualità e la sicurezza dei prodotti alimentari deperibili, come il formaggio.

Sono stati considerati tre diversi gruppi di campioni di formaggio: formaggio a pasta molle, camembert e formaggio a pasta semidura. In ciascun gruppo, nove campioni, considerati controllo (CTR), sono stati avvolti in un film di polietilene alimentare convenzionale, e nove campioni, considerati trattati (TRT), sono stati ricoperti con il chitofilm. Per simulare le tipiche condizioni di conservazione, tutti i campioni sono stati conservati in frigorifero alla temperatura di 5°C fino al momento del test. Durante la conservazione sono state studiate la qualità microbiologica e la sicurezza dei campioni. Per ciascun campione, analizzato in triplicato, è stata rilevata la crescita di batteri mesofili, *Enterobacteriacee* e batteri lattici al 2°, 8° e 22° giorno. L'analisi della conta dei batteri mesofili è stata effettuata utilizzando il terreno di coltura Plate Count Agar (PCA) a 30°C per 72 ore. La carica delle *Enterobacteriaceae* è stata stimata su Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA) dopo 48 ore a 37°C. Infine la carica di batteri lattici è stata contata su MRSA a 37°C dopo 48 ore.

5.6.5 Analisi sensoriale

L'analisi sensoriale è stata effettuata presso il laboratorio PanLab del dipartimento Biomorf dell'Università di Messina. Il panel era composto da 6 valutatori scelti tra personale esperto e laureati, con le seguenti caratteristiche

- età: compresa tra 25 e 49 anni (media = 35,3);
- genere: 5 donne e 1 uomo.

I valutatori sono stati precedentemente formati con sessioni specifiche, al fine di acquisire il lessico del sapore del formaggio, secondo lavori precedenti [103-104]. A questo scopo i valutatori sono stati istruiti a riconoscere attraverso standard di riferimento i seguenti attributi:

- acido (acido citrico, yogurt naturale);
- latteo (panna densa);
- burroso (diacetile , burro non salato);
- lievito (formaggio blu);
- erbe aromatiche (rosmarino in polvere e foglie secche di timo);
- menta (olio essenziale di menta piperita);
- salato (brodo di carne).

Ai campioni di riferimento è stato assegnato un punteggio di intensità pari a 6 su una scala da 0 a 10 punti. I campioni di formaggio a pasta molle, camembert e semiduro

(avvolti sette giorni prima del panel test) di entrambi i gruppi (CRT e TRT) sono stati forniti in cieco e in modo casuale. Ciascun valutatore è stato accertato negativamente per anosmia. Ciascun campione è stato analizzato in duplicato con una pausa di dieci minuti nel mezzo, durante la quale i palati sono stati risciacquati con acqua. Prima del test, i campioni sono stati rimossi dalla pellicola ed equilibrati a temperatura ambiente (20 ± 3 °C). I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica (XLSTAT, Microsoft Excel, 2023).

5.6.6 Analisi statistica

Il set di dati è espresso come media \pm deviazione standard (sd) della misurazione triplicata. Differenze significative ($p < 0,05$) all'interno delle medie sono state analizzate mediante ANOVA unidirezionale, quindi mediante test di significatività di Tukey (HSD), utilizzando il software statistico XLStat (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

6. Risultati e discussioni

6.1 Proprietà meccaniche

I risultati delle prove meccaniche sono presentati in Tabella 2, dove per ciascun gruppo (A, B, C, D) di film biodegradabili a confronto, sono riportati i valori di spessore (FT.), carico di rottura (TS.), allungamento a rottura (EB.) e durezza (H.), espressi come media \pm deviazioni standard. Non sono state riscontrate differenze significative ($p \geq 0,05$) in termini di spessore del film tra i diversi gruppi testati. Questa uniformità di spessore è un risultato positivo, poiché suggerisce che il processo di produzione è affidabile per tutte le formulazioni di film biodegradabili. Il gruppo A ha mostrato i più alti livelli di resistenza alla trazione, allungamento a rottura e durezza, rendendolo adatto ad applicazioni come il confezionamento di alimenti. Le maggiori prestazioni meccaniche del Gruppo A possono essere inequivocabilmente attribuite al contributo del PVA. Infatti, la presenza di PVA porta ad un aumento medio del 19,61% in TS., 8,52% in EB. e 29,09% in H. confrontando rispettivamente i gruppi A e B. Inoltre, l'EB. ottenuto per il Gruppo A raggiunge il valore molto significativo del 46,12%. Questo valore, correlato alla duttilità ed elasticità di un materiale, è stato confrontato con quelli presenti in letteratura per film realizzati in laboratorio con formulazione diversa ma spessori e condizioni di prova simili al nostro chitofilm. Susmitha et al., hanno proposto una pellicola alimentare a base di amido di mais/gelatina rinforzata con il 5% di purea di mango ed ha mostrato un EB del 35,4%, che è di oltre 10 punti inferiore a quello valutato per il gruppo A [105]. Allo stesso modo, Briassoulis et al.,

hanno riportato per un film alimentare a base di amido di mais e glicerolo un EB del 33,8% [106]. Valori EB significativamente più bassi, pari al 5,12% e al 4,18%, sono stati osservati da Hou et al., rispettivamente per film di collagene e film di miscela di collagene-chitosano (in un rapporto 60:40) [107]. Un confronto con film alimentari sintetici di origine biologica o commerciali non è stato fattibile, poiché questi sono prodotti attraverso processi industriali completamente automatizzati e hanno valori di spessore due ordini di grandezza inferiori a quelli ottenuti nel nostro studio. I risultati dei test meccanici suggeriscono che la pala di mucillagine di fico d'India e la soluzione di fibroina della seta non contribuiscono in modo significativo al miglioramento delle prestazioni meccaniche dei film. Pertanto, non possono essere considerati additivi in grado di migliorare le caratteristiche tecnologiche del film. Questo ruolo è, tuttavia, indiscutibilmente svolto dal PVA e dal glicerolo. Quest'ultimo è presente in tutte le formulazioni e svolge il ruolo cruciale di plastificante. Vale la pena ricordare che i film di chitosano sono rigidi e necessitano di plastificanti per ridurre le forze di attrito tra la catena polimerica come i legami idrogeno o le forze ioniche, al fine di migliorare le prestazioni meccaniche. L'incorporazione di polioli nella formulazione del film può superare questo inconveniente [108].

GRUPPO CAMPIONE	FT. [μm]	TS. [MPa]	EB. [%]	Durezza [Shore A]
A <i>media \pm sd</i>	309,00 ^{ns} \pm 0,81	23,25 ^a \pm 0,48	46,12 ^a \pm 7,94	71 ^a \pm 1,11
B <i>media \pm sd</i>	308,21 ^{ns} \pm 1,12	19,44 ^b \pm 0,64	38,60 ^b \pm 4,11	55b ^b \pm 1,25
C <i>Media \pm DS</i>	309,11 ^{ns} \pm 0,94	13,63 ^c \pm 0,56	34,35 ^c \pm 0,99	52b ^b \pm 1,13
D <i>Media \pm DS</i>	308,57 ^{ns} \pm 0,68	12,10 ^d \pm 0,81	27,91 ^c \pm 1,39	54b ^b \pm 2,28

ns = nessuna differenza significativa ($p \geq 0,05$). Diverse lettere in apice nella stessa riga indicano valori significativamente diversi ($p < 0,05$ mediante il test HSD post hoc di Tukey); le stesse lettere in apice nella stessa colonna indicano valori non significativamente diversi ($p > 0,05$ mediante il test HSD post hoc di Tukey).

Tabella 2: Parametri valutati nei test meccanici di diverse formulazioni di biofilm (vedere il testo per la descrizione). FT.: spessore del film; TS.: resistenza alla trazione; EB.: allungamento a rottura.

6.2 Analisi del formaggio confezionato

6.2.1. Composti organici volatili

Un modo per valutare il deterioramento del formaggio è monitorare lo sviluppo di composti organici volatili (COV). Sono state condotte ricerche approfondite sui composti volatili nel formaggio, identificando microbi e luce/acqua come causa della formazione di COV durante la conservazione. Pertanto, l'analisi dei COV è servita come mezzo per valutare come la tipologia di packaging (CTR e TRT) fosse correlata alla qualità dell'alimento durante la conservazione. La composizione dello spazio di testa di un formaggio è sensibile all'autossidazione e alla fotossidazione, che potrebbero generare un'ampia gamma di COV, compromettendo talvolta il gusto e l'aspetto del formaggio. Preliminarmente, è stata effettuata un'analisi qualitativa dello spazio di testa del formaggio tramite SPME -GC-MS al fine di scegliere gli standard di riferimento idonei per la validazione del metodo. I sei composti riportati nella tabella 3 sono rappresentativi dei principali gruppi di COV presenti nell'aroma del formaggio. LOQ, LOD, recupero e intervallo di linearità testimoniano l'efficacia del metodo SPME -GC sviluppato in termini di sensibilità, affidabilità e accuratezza [109]. La Figura 15 mostra il contenuto di COV espresso in area assoluta GC rilevato nei gruppi di formaggi CTR e TRT. Per quanto riguarda il formaggio a pasta molle (figura 15 in alto), i risultati evidenziano che una frazione volatile più abbondante si sviluppa nel gruppo CTR piuttosto che nel gruppo TRT.

Composto	LOQ (n g·g)⁻¹	LOD (n g·g)⁻¹	% Recupero (% RSD)	Intervallo di linearità (gg)⁻¹
n- Esanale	1.10	0,31	96,3 (8,4)	0,1 – 10,0
Acido ottanoico	2.42	0,85	102,7 (14,3)	0,1 – 10,0
Tetradecanoato di etile	0,48	0,09	85,7 (7,9)	0,1 – 10,0
δ- Decalattone	0,31	0,12	98,7 (8,1)	0,1 – 10,0
Limonene	0,42	0,26	97,4 (10,9)	0,1 – 10,0
Dodecano	0,53	0,27	97,9 (9,4)	0,1 – 10,0

Tabella 3: I sei composti dei principali gruppi di COV presenti nell'aroma del formaggio. Dati di validazione del metodo SPME-GC. LOQ, limite di quantificazione; LOD, limite di rilevabilità.

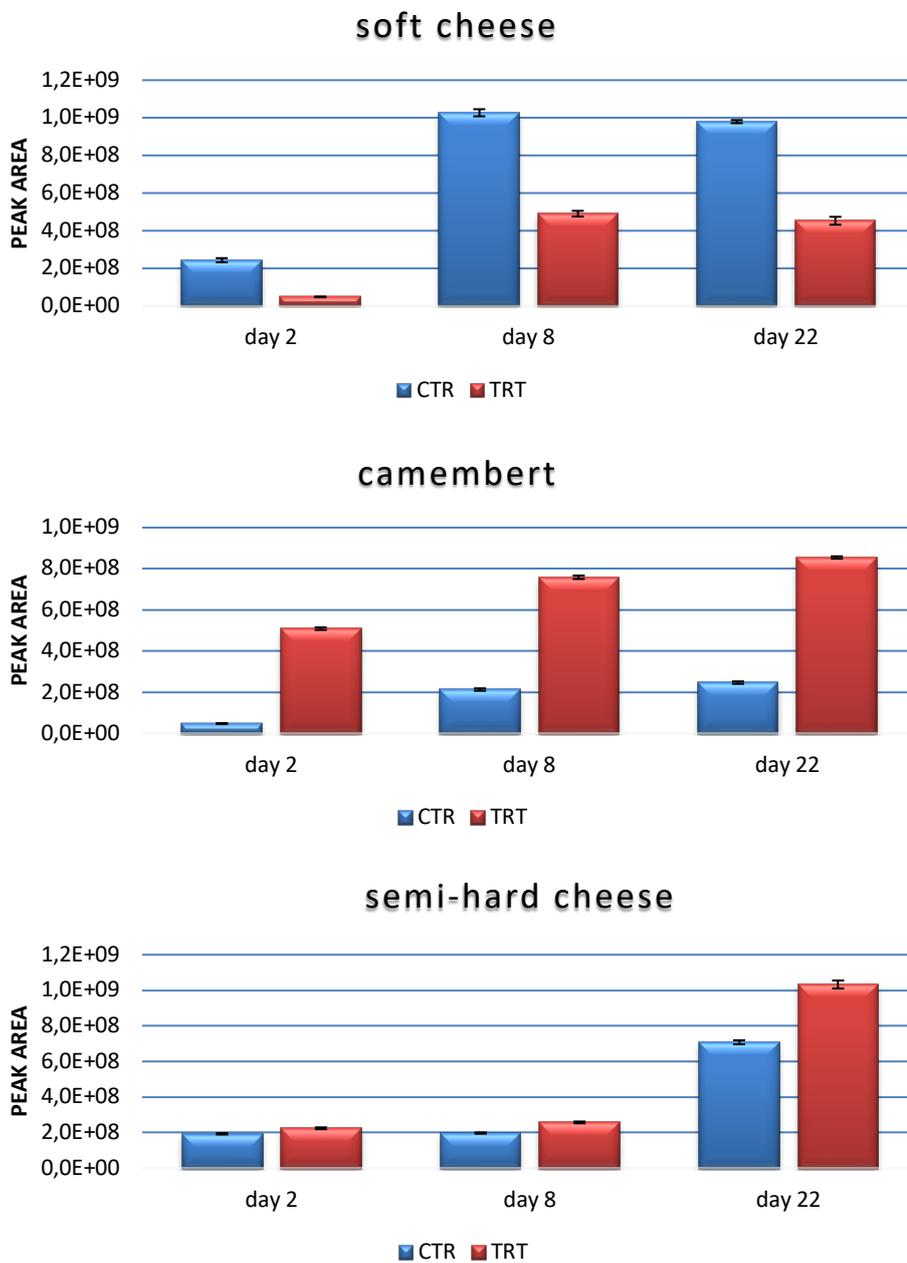


Figura 15: Contenuto di COV (composti organici volatili) nelle tre tipologie di formaggio (CTR e TRT).

Una tendenza opposta si osserva per il formaggio Camembert, dove la quantità di sostanze volatili diventa triplicata nel gruppo TRT. Questo comportamento può essere ampiamente giustificato dall'analisi di singole classi di analiti: come mostrato in figura 16, il contributo maggiore nel gruppo TRT è dato dai terpenoidi, componenti caratteristici degli oli essenziali [102]. In altre parole, questo risultato evidenzia un punto debole nella procedura di preparazione del chitofilm, in particolare nella fase di incorporazione della miscela di oli essenziali.

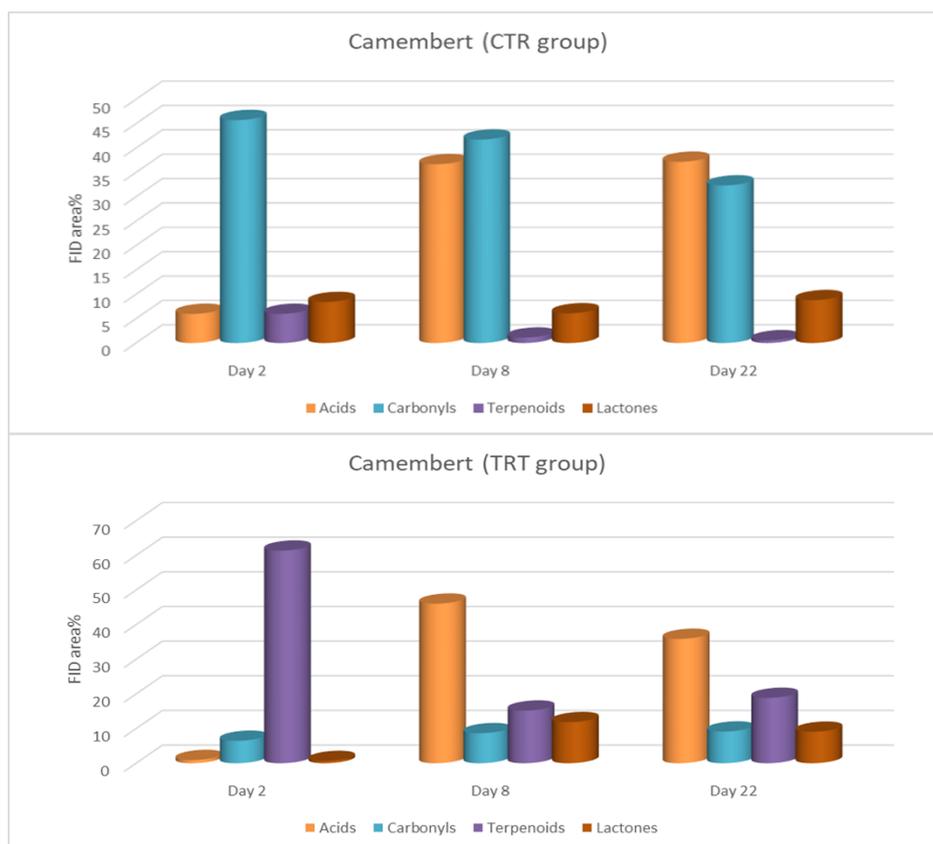


Figura 16: Sostanze organiche volatili nel formaggio Camembert (CTR e TRT).

È evidente che la miscela non si sia dispersa in modo uniforme all'interno della matrice del chitofilm. D'altro canto, non è stato possibile individuare differenze rilevanti tra i gruppi CTR e TRT nei formaggi semiduri (figura 15, in basso). Tuttavia, in un gruppo di campioni (TRT, giorno 22) è stato riscontrato un difetto di sigillatura – mancanza di adesione della pellicola sulla superficie del formaggio che ha probabilmente causato un marcato aumento di COV in questi campioni innescando irrancidimento e fenomeni di ossidazione. Le impronte volatili erano piuttosto ricche di picchi con uno spazio cromatografico che diventava sempre più affollato man mano che si allungava il tempo di conservazione. Questo risultato è in accordo con lavori precedenti [110]. Per effettuare un confronto tra i campioni CTR e TRT, tutti i COV sono stati raggruppati in base alla loro classe chimica. Come si può vedere nelle figure 16-18, le classi principali che contribuiscono alla composizione dello spazio di testa erano: acidi grassi liberi (cioè butirrico, capronico, caprilico, caprico), n- alcani (per es. esanale, nonanale, decanale), 2- alchenali [per es. (2E) -esenale, (2E) -eptenale, (2E) -ottenale], 2-chetoni (cioè 2- nonanone, 2- decanone , 2- undecanone), lattoni (per es. γ - nonalattone , δ - decalattone , γ -ottalattone) e terpenoidi (per es. limonene, eugenolo, timolo, carvacrolo).

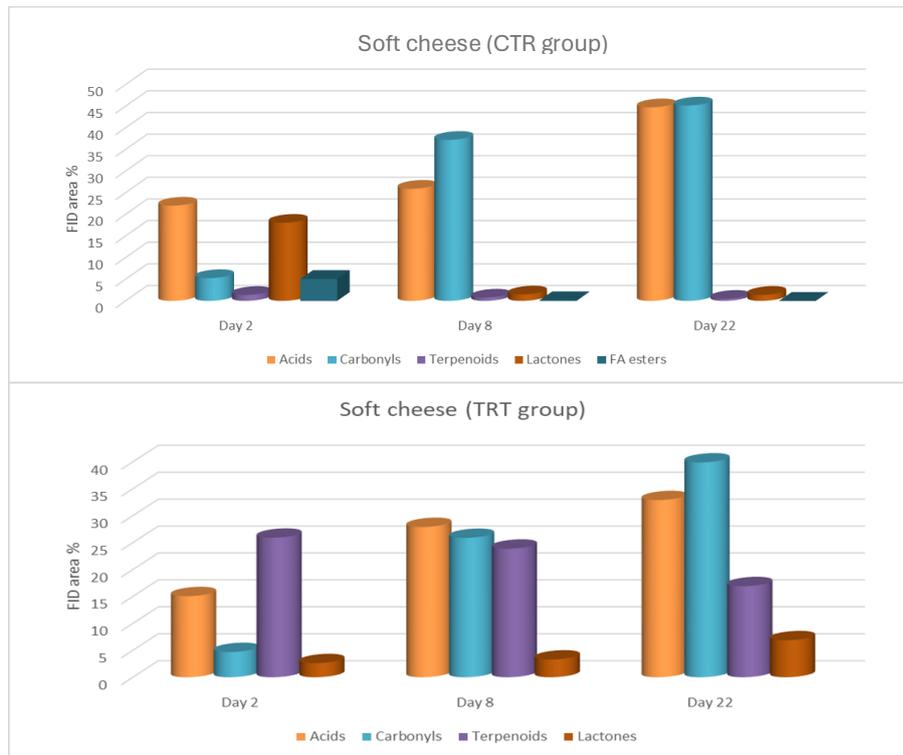


Figura 17: Sostanze organiche volatili nel formaggio a pasta molle (CTR e TRT).

I composti minori erano esteri e alcoli primari. Tutte le composizioni valutate sono in accordo con la letteratura per quanto riguarda i volatili rilasciati dalle matrici del formaggio [111-112]. La Figura 17 mostra che nel caso del formaggio a pasta molle la comparsa di acidi e lattoni avviene tempestivamente. Tuttavia, dopo una settimana, si verifica un notevole aumento di aldeidi e chetoni e questo schema persiste anche fino al giorno 22. All'interno del gruppo TRT, i terpenoidi occupano costantemente circa il 15-25% dello spazio cromatografico, il che è in linea con le aspettative a causa dell'aggiunta di oli essenziali. In confronto ad altre categorie di componenti, lattoni,

acidi grassi e carbonili mostrano una progressione simile a quella osservata nel gruppo CTR.

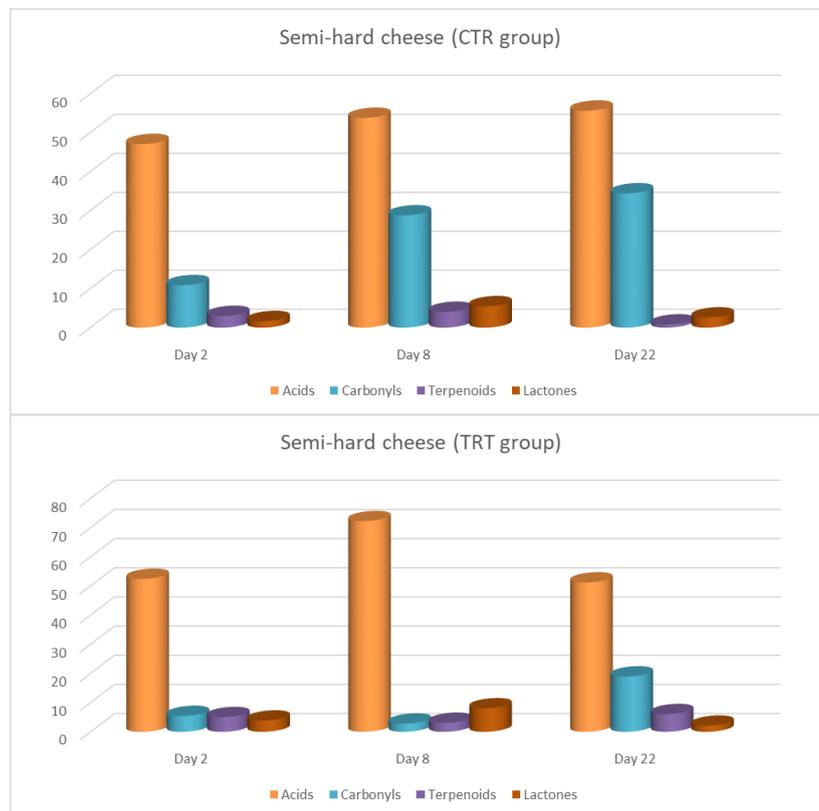


Figura 18: Sostanze organiche volatili nel formaggio a pasta semidura (CTR e TRT).

La figura 16 illustra la distribuzione dei composti organici volatili (COV) osservati nel formaggio Camembert. In particolare, vi è una presenza significativa di aldeidi e chetoni rilevati già dal giorno 2 nel gruppo CTR. Questa osservazione può essere

attribuita alle caratteristiche specifiche del formaggio Camembert, noto per il suo sapore delicato e sottile, intimamente legato al latte utilizzato nella sua produzione [112]. Questo latte trasporta i composti volatili derivati dal pascolo del bestiame, in particolare l'aroma dell'erba. Tra questi componenti figurano infatti i terpenoidi, ubiquitari nel mondo vegetale. Tuttavia, man mano che il formaggio continua a stagionare, la percentuale di acidi grassi aumenta, accompagnata da un aumento dei lattoni. Nel gruppo TRT, a parte la questione precedentemente menzionata relativa all'aggiunta di olio essenziale, gli acidi grassi liberi (FFA) sono più abbondanti dei carbonili. Si può ipotizzare che la presenza di oli essenziali possa in qualche modo ostacolare la degradazione da parte dei microbi della caseina, noto precursore dei composti carbonilici [115]. La figura 18 illustra la composizione dei COV nel formaggio a pasta semidura. È evidente che gli FFA svolgono un ruolo dominante nel profilo volatile di entrambi i gruppi CTR e TRT, allineandosi con le informazioni precedentemente documentate sui costituenti aromatici del formaggio stagionato. Nel gruppo CTR, la distribuzione dei COV rimane costante dal giorno 2 al giorno 22. Al contrario, il gruppo TRT mostra un calo dei carbonili, rispecchiando la tendenza osservata nella figura 16. Ancora una volta, sembra che la presenza di oli essenziali possa impedire la formazione di aromi indesiderati. Al fine di una corretta valutazione dei risultati presentati, sembra opportuno menzionare i meccanismi che presiedono alla formazione delle sostanze volatili nel formaggio. L'attività microbica e la conseguente scomposizione dei grassi sembrano svolgere un ruolo significativo nella formazione

dei componenti primari dell'aroma nella maggior parte delle varietà di formaggio. Gli elementi aromatici chiave del formaggio, responsabili del suo sapore e profumo, possono essere classificati come acidi grassi a catena corta e loro derivati, aldeidi, alcoli, chetoni e composti a base di zolfo. La degradazione degli aminoacidi è un processo fondamentale nella formazione del sapore del formaggio. In particolare, gli aminoacidi aromatici come fenilalanina, tirosina e triptofano, nonché gli aminoacidi a catena ramificata come leucina, isoleucina e valina, insieme alla metionina, fungono da precursori primari per questi composti aromatici [113]. In generale, man mano che il formaggio matura nel tempo, la concentrazione dei componenti volatili tende ad aumentare. La transizione dei composti volatili predominanti aumenta da 5 atomi di carbonio a un intervallo di 6-9 [114]. I microrganismi che risiedono nel formaggio svolgono un ruolo cruciale nella generazione di composti aromatici, in particolare attraverso la scomposizione del lattato, la degradazione delle proteine, la decomposizione dei grassi e la fermentazione del lattosio [114]. La caseina, ad esempio, contribuisce alla produzione di aminoacidi, acido acetico, ammoniaca, piruvato, aldeidi, alcoli e acidi carbossilici [115]. I lattoni e il citrato subiscono un catabolismo che porta alla creazione di lattato, diacetile, acetoino, 2,3- butandiolo, acetaldeide, acido acetico ed etanolo. L'acido butirrico, l'acido esanoico e il (2E) -nonenale svolgono un ruolo significativo nella creazione dell'aroma tipico dei vari tipi di formaggio. L'abbondanza di acidi grassi liberi (FFA) in tutte le varietà di formaggio evidenzia l'importanza della lipolisi come percorso

primario per la generazione dei sapori. Tra gli aromi indesiderati spicca l'acido acetico. A differenza di altri acidi, la sua origine non è collegata alla lipolisi; deriva dal metabolismo del citrato e dell'acido lattico da parte dei batteri lattici. Lo sviluppo di irrancidimento nel formaggio può essere attribuito a una lipolisi eccessiva o sbilanciata, che porta a una sovrabbondanza di FFA, i quali producono questi aromi indesiderati, come γ -nonalattone. Gli FFA servono anche come precursori di altri potenti composti aromatici, inclusi i metilchetoni e gli esteri. In questo studio, i campioni di formaggio confezionati sono stati intenzionalmente conservati in un frigorifero con porta trasparente per simulare le condizioni di vendita al dettaglio. Infatti, i prodotti lattiero-caseari sono spesso esposti alla luce durante la conservazione e l'esposizione nei locali di vendita al dettaglio. È risaputo che la luce può innescare processi di ossidazione negli alimenti, portando al deterioramento di nutrienti preziosi, cambiamenti di colore e allo sviluppo di sapori sgradevoli, che spesso coinvolgono composti come aldeidi e chetoni. I latticini sono particolarmente sensibili alle reazioni indotte dalla luce a causa della presenza di riboflavina (vitamina B2), un potente fotosensibilizzatore [116].

Il processo di autoossidazione nei lipidi insaturi comporta la generazione di radicali liberi, che successivamente portano alla formazione di prodotti di ossidazione dei lipidi. Questo processo di ossidazione porta alla creazione di vari composti carbonilici volatili, noti precursori di sapori sgradevoli. In precedenza, la valutazione della stabilità ossidativa del formaggio cremoso conservato in vassoi trasparenti e bianchi veniva

condotta attraverso la quantificazione delle sostanze volatili come percentuale dell'area [116]. In sintesi, la presenza di luce aumenta sostanzialmente le concentrazioni di aldeidi (cioè esanale), mentre l'esposizione a temperature più elevate è positivamente associata ad un aumento dei livelli di 2-chetoni, ottanale, nonanale e decanale. Al contrario, l'aumento delle temperature porta ad una diminuzione dell'acetoino e della sua forma ossidata, nota come 2,3- butanedione.

6.2.2 Microbiologia

La tabella 4 mostra l'andamento della crescita batterica per i mesofili (MES), *Enterobacteriaceae* e batteri lattici (LAC) in entrambi i gruppi CTR e TRT. Internamente ai due gruppi indagati, i risultati, espressi come media di Unità Formanti Colonie (CFU)/ ml per ciascuna tipologia di formaggio, sono stati raccolti in base al momento della valutazione microbiologica, ovvero al giorno 2, giorno 8 e giorno 22. In generale, i campioni TRT hanno dimostrato un'attività inibitoria sulla crescita batterica paragonabile o inferiore a quella osservata nei campioni CTR. Nel formaggio a pasta molle, al giorno 2, la conta dei batteri mesofili nel TRT era di un ordine di grandezza inferiore a quella rilevata nel CTR ($2,9 \cdot 10^2$ CFU mL⁻¹ vs $1,3 \cdot 10^3$ CFU/ml). Tuttavia, questa tendenza si è invertita durante la conservazione. La crescita batterica delle *Enterobacteriaceae* e dei batteri lattici era costantemente paragonabile nei campioni CRT e TRT di formaggio a pasta molle, camembert e formaggio semiduro.

Le proprietà antimicrobiche dei film in polietilene alimentare sono indubbiamente legate alle caratteristiche dei loro componenti, in particolare alla presenza di additivi chimici di sintesi in grado di esplicare l'azione di “conservante alimentare”. Tra questi, i più rilevanti sono le nanoparticelle di silice e biossido di titanio [117], etanolo, biossido di cloro e biossido di zolfo [118]. Nel chitofilm, l'azione antimicrobica si basa interamente sugli effetti combinati dei suoi costituenti naturali: chitosano, oli essenziali, nopal e fibroina della seta. I livelli comparabili di crescita batterica nei campioni TRT con quelli ottenuti in CTR, confermano che l'uso di sostanze naturali con proprietà antimicrobiche è un'alternativa valida e sostenibile nella produzione di involucri alimentari attivi. L'azione più significativa è senza dubbio esercitata dagli oli essenziali, che penetrano facilmente nella parete cellulare batterica, a causa della natura idrofobica e del carattere lipofilo dei loro componenti, interferendo con i meccanismi di trasporto molecolare e portando all'inattivazione cellulare. I risultati affermano l'efficacia degli oli essenziali nell'inibire la crescita dei batteri lattici, tipici del metabolismo del formaggio e Gram-positivi. La natura idrofobica di alcuni componenti della frazione volatile consente loro di penetrare nella parete cellulare, composta principalmente da peptidoglicani, acido teicoico e proteine [119]. In particolare, i composti fenilici presenti negli oli essenziali mostrano la più alta azione inibitoria contro i batteri Gram-positivi, interferendo con successo con gli enzimi coinvolti nella produzione di energia e denaturando le proteine [120]. Alcuni di questi composti, come timolo, carvacrolo, canfora e p-cimene, sono stati ritrovati in quantità

significative negli oli essenziali delle erbe aromatiche utilizzati nel film di chitosano (vedi par. 6.1.2). La presenza di composti fenolici nel nopal contribuisce ulteriormente a potenziare questo effetto [121]. Allo stesso modo, i risultati confermano la presenza di fenilpropanoidi (cioè eugenolo e chavicol), che esibiscono un'azione inibitoria contro i batteri Gram-negativi come le *Enterobacteriacee*. L'attività antimicrobica dell'eugenolo è particolarmente legata alla presenza del doppio legame nelle posizioni alfa e beta della catena laterale e del gruppo metilico in posizione gamma. La scelta di utilizzare una miscela di oli essenziali da erbe aromatiche è quindi valida, in quanto la presenza di diversi composti consente un'azione efficace contro batteri sia Gram-positivi che Gram-negativi, esaltando il carattere antimicrobico del film di chitosano [120]. Tuttavia, nel caso specifico dei formaggi, si può presumere che la natura antimicrobica del film sia moderatamente inibita, in quanto i grassi presenti nei formaggi possono incapsulare i costituenti idrofobici degli oli essenziali, limitando la loro capacità di accedere ai siti bersaglio dei microrganismi. Tuttavia, questo effetto è mediato dal pH più basso che aumenta l'idrofobicità degli oli essenziali, migliorando così la loro capacità di attaccare la parete cellulare [122].

CAMPIONAMENTO	TIPO DI CAMPIONE	MES CTR	MES TRT	ENT CTR	ENT TRT	LAC CTR	LAC TRT
GIORNO 2	<i>Formaggio morbido</i>	$1.3 \cdot 10^3$	$2.9 \cdot 10^2$	nd	$0,5 \cdot 10$	$8.4 \cdot 10$	$7,0 \cdot 10$
	<i>Camembert</i>	$4.6 \cdot 10^4$	$9.2 \cdot 10^4$	nd	$0,5 \cdot 10$	$9.4 \cdot 10^3$	$8.2 \cdot 10^3$
	<i>Formaggio semiduro</i>	$1.1 \cdot 10^5$	$1.3 \cdot 10^5$	$0,5 \cdot 10$	$0,5 \cdot 10$	$5.7 \cdot 10^4$	$1.1 \cdot 10^5$
Giorno 8	<i>Formaggio morbido</i>	$1.2 \cdot 10^2$	$6.1 \cdot 10^3$	nd	nd	$5.0 \cdot 10^5$	$4.4 \cdot 10^5$
	<i>Camembert</i>	$6.1 \cdot 10^3$	$1.4 \cdot 10^3$	nd	nd	$6.7 \cdot 10^5$	$2,5 \cdot 10^5$
	<i>Formaggio semiduro</i>	$1.9 \cdot 10^3$	$1.7 \cdot 10^3$	nd	nd	$4,5 \cdot 10^4$	$7,8 \cdot 10^4$
Giorno 22	<i>Formaggio morbido</i>	$6.2 \cdot 10^5$	$2.2 \cdot 10^6$	nd	nd	$1.1 \cdot 10^4$	$3.2 \cdot 10^4$
	<i>Camembert</i>	$8.2 \cdot 10^6$	$1.3 \cdot 10^6$	$9.9 \cdot 10^2$	$0,3 \cdot 10$	$8.0 \cdot 10^5$	$6.7 \cdot 10^5$
	<i>Formaggio semiduro</i>	$1.9 \cdot 10^6$	$1.1 \cdot 10^6$	nd	nd	$1.2 \cdot 10^4$	$1.6 \cdot 10^5$

MES: mesofilo; **ENT:** *Enterobacteriaceae* ; **LAC:** batteri lattici

Tabella 4: Andamento della crescita batterica osservato nei diversi tipi di formaggio indagati durante la conservabilità.

6.2.3 Analisi sensoriale

Il panel ha rilevato notevoli differenze sensoriali tra i due gruppi di formaggi, come illustrato nella figura 19. Tutti gli attributi erano distinguibili tranne "menta" ed "erbe", che non sono stati rilevati nel gruppo CTR. Questi ultimi hanno mostrato punteggi più alti per attributi come lievito (7,6 contro 4,1), latteo (6,3 contro 5,0), burroso (8,5 contro 7,1) e saporito (6,1 contro 5,0), mentre entrambi i gruppi hanno ricevuto la stessa valutazione per l'attributo acido (6,1 vs. 6,1). Questa analisi descrittiva preliminare delle caratteristiche sensoriali dei campioni di formaggio è servita come mezzo iniziale per determinare se la composizione del biofilm possa influenzare il gusto del formaggio. In altre parole, l'analisi sensoriale mirava a valutare se l'eventuale migrazione degli ingredienti dalla pellicola alla matrice del formaggio potesse compromettere il sapore e l'aspetto del cibo. I risultati hanno dimostrato chiaramente che:

- i) l'inclusione della miscela di oli essenziali ha alterato significativamente il gusto del formaggio conservato nel chitofilm, principalmente a causa del suo forte impatto olfattivo;
- ii) la scelta degli oli essenziali, utili a prolungare la conservabilità dei formaggi, deve essere fatta con attenzione, poiché il loro aroma deve armonizzarsi con l'alimento con cui entrano in contatto.

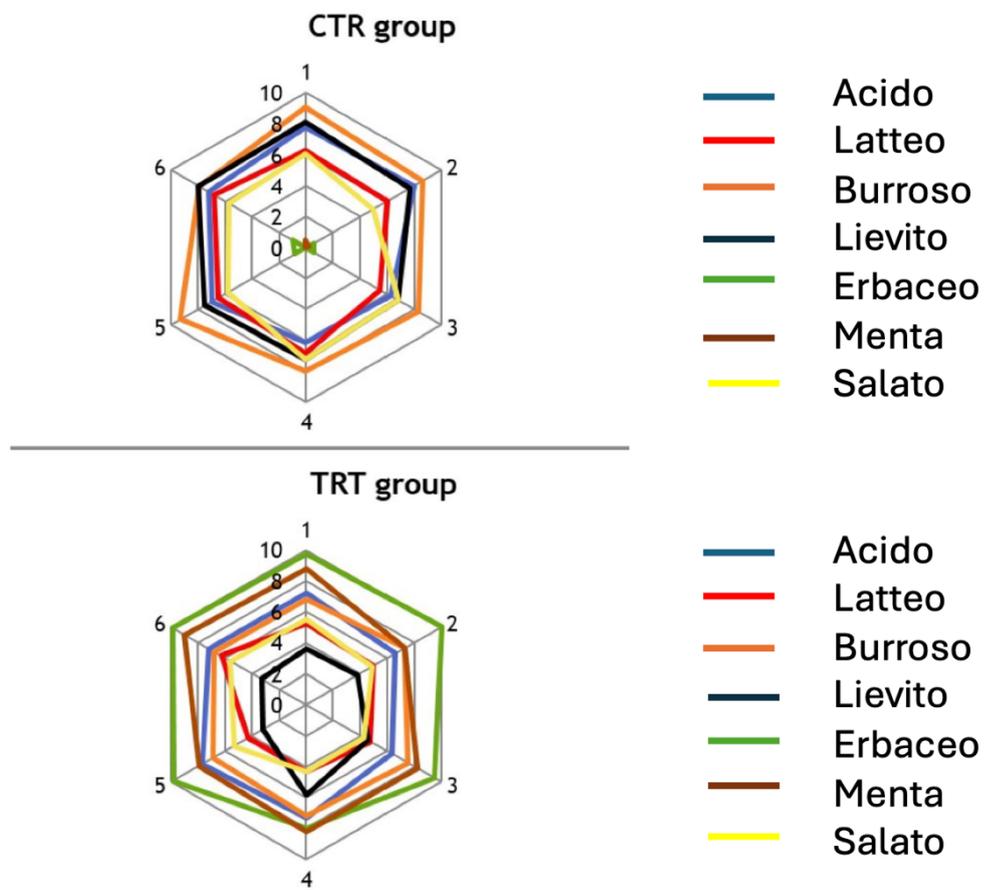


Figura 19: Diagramma a ragno che mostra gli attributi sensoriali dei campioni di formaggio (CTR e TRT) percepiti dai partecipanti al panel.

7. Conclusioni

In conclusione, questo studio rappresenta un progresso significativo nella tecnologia di confezionamento a base di chitosano incorporando ingredienti specializzati nella formulazione del rivestimento. I risultati dei test meccanici hanno indicato che il Gruppo A, con l'incorporazione di PVA, ha mostrato i più alti livelli di resistenza alla trazione, allungamento a rottura e durezza. In particolare, la pala di mucillagine di fico d'india e la soluzione di fibroina della seta non hanno contribuito in modo significativo al miglioramento delle prestazioni meccaniche dei film. Al contrario, il PVA e il glicerolo hanno svolto un ruolo cruciale, con il glicerolo che agisce come plastificante per migliorare la flessibilità dei film di chitosano. L'analisi dei COV è stata effettuata per valutare l'impatto di due diversi metodi di confezionamento (CTR e TRT) sull'efficacia della conservazione. La composizione dello spazio di testa nel formaggio, indicativa di autossidazione e fotossidazione, è stata esaminata mediante SPME-GC-MS. L'incorporazione degli oli essenziali nel gruppo TRT non è stata uniforme, indicando una potenziale debolezza nella procedura di preparazione del chitofilm, in particolare nella fase di dispersione degli oli essenziali. Le sostanze organiche volatili complessive sono cresciute nel tempo, in accordo con studi precedenti. Il raggruppamento per classi chimiche dei COV ha mostrato che acidi grassi liberi, n- alcani, 2- alchenali, 2- chetoni, lattoni e terpenoidi erano i principali contributori alla composizione dello spazio di testa. Le differenze quali-quantitative nella composizione della frazione volatile sono specificamente legate a ciascun gruppo

di campioni, anche se si può osservare una tendenza generale nel gruppo TRT, che ha mostrato un potenziale effetto inibitorio degli oli essenziali sulla formazione di aromi indesiderati. L'analisi microbiologica ha dimostrato che i campioni TRT generalmente avevano un'attività inibitoria sulla crescita batterica paragonabile o inferiore a quella osservata nei campioni CTR. A differenza delle pellicole alimentari in polietilene che si basano su additivi chimici sintetici per le proprietà antimicrobiche, l'efficacia del chitofilm è stata attribuita agli effetti combinati dei suoi costituenti naturali. Gli oli essenziali, soprattutto per le loro caratteristiche idrofobiche e lipofile, sono stati identificati come i più significativi, responsabili dell'attività antimicrobica, penetrando facilmente nelle pareti cellulari batteriche e portando all'inattivazione cellulare. L'analisi sensoriale condotta in questo studio ha rivelato notevoli distinzioni tra i gruppi di formaggi CTR e TRT. I risultati hanno indicato che l'inclusione della miscela di oli essenziali ha avuto un effetto significativo sul gusto del formaggio conservato nel chitofilm, evidenziando l'importanza della loro selezione. Ulteriori ricerche in questa direzione potrebbero contribuire a perfezionare le formulazioni dei materiali di imballaggio per ottenere sia la conservazione funzionale che risultati sensoriali positivi per il cibo confezionato. Questo biopackaging rientra ampiamente nelle strategie per uno sviluppo sostenibile della comunità globale [94].

Per concludere, l'evoluzione del packaging alimentare ci ha condotto da soluzioni rudimentali a un'era di innovazione e sostenibilità; infatti, è essenziale continuare a promuovere la ricerca e lo sviluppo di soluzioni di packaging sempre più sostenibili e

innovativi. L'obiettivo finale deve essere quello di bilanciare le esigenze di conservazione degli alimenti con la tutela dell'ambiente, in modo che le generazioni future possano godere di alimenti sicuri e di alta qualità senza danneggiare il nostro pianeta.

8. Bibliografia

1. FAO. 2019. The State of Food and Agriculture 2019. Moving forward on food loss and waste reduction. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
2. United Nations Environment Programme (2021). Food Waste Index Report 2021. Nairobi
3. Triollet, R., JRC Annual Report 2021, Foreman, A., Barry, G., Alvarez Martinez, A.F. and Mondello, S. editor(s), Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2022, ISBN 978-92-76-51231-8, doi:10.2760/53296, JRC128620.
4. WWF EUROPEAN POLICY OFFICE ANNUAL REVIEW 2023
5. Chen, J., Jayachandran, M., Bai, W., & Xu, B., (2022), *A critical review on the health benefits of fish consumption and its bioactive constituents*. Food Chemistry, 369, 130874.
6. Coppola Daniela, Chiara Lauritano, Fortunato Palma Esposito, Gennaro Riccio, Carmen Rizzo, and Donatella de Pascale, (2021), *Fish Waste: From Problem to Valuable Resource*, *Marine Drugs* 19, no. 2: 116.
7. Nirmal, N. P., Santivarangkna, C., Rajput, M. S., & Benjakul, S., (2020), *Trends in shrimp processing waste utilization: An industrial prospective*. Trends in Food Science & Technology.
8. Bhumbar, M. V., Bhagwat, P. K., & Dandge, P. B., (2019), *Extraction and characterization of acid soluble collagen from fish waste: Development of*

- collagen-chitosan blend as food packaging film*. Journal of Environmental Chemical Engineering, 102983.
9. Debbarma, A., Kumar, V., Mishra, P. K., Kakatkar, A. S., Gautam, R. K., Umra, F., & Chatterjee, S., (2023), *Valorisation of Basa fish (Pangasius bocourti) waste: Oil extraction and encapsulation*, International Journal of Food Science & Technology, 58(5), 2764-2771.
 10. Saranya, R., Tamil Selvi, A., Jayapriya, J. *et al.*, (2020), *Synthesis of Fat Liquor Through Fish Waste Valorization, Characterization and Applications in Tannery Industry*. Waste Biomass Valor 11, 6637–6647.
 11. Barzkar N, Sukhikh S, Babich O, Venmathi Maran BA and Tamadoni Jahromi S., (2023), *Marine collagen: purification, properties and application*, Front. Mar. Sci. 10:1245077.
 12. Zadehnajar, P., Akbari, B. & Karbasi, S., (2023), *Electrospun Nanocomposite Scaffold Based on Polycaprolactone-decellularized Umbilical Cord Wharton's Jelly/Multi-walled Carbon Nanotubes: A Biomimetic Substrate for Articular Cartilage Tissue Engineering*, J Polym Environ 31, 5272–5295.
 13. Ge, B.; Wang, H.; Li, J.; Liu, H.; Yin, Y.; Zhang, N.; Qin, S., (2020), *Comprehensive Assessment of Nile Tilapia Skin (Oreochromis niloticus) Collagen Hydrogels for Wound Dressings*, Mar. Drugs 2020, 18, 178.
 14. Madhumanchi, S., Suedee, R., Nakpheng, T., Tinpun, K., Temboot, P., & Srichana, T., (2019), *Binding interactions of bacterial lipopolysaccharides to*

- polymyxin B in an amphiphilic carrier “sodium deoxycholate sulfate*, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 182, 110374.
15. Nie, B., Ao, H., Long, T., Zhou, J., Tang, T., & Yue, B., (2017), *Immobilizing bacitracin on titanium for prophylaxis of infections and for improving osteoinductivity: An in vivo study*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 150, 183–191.
16. Shori, A. B., Ming, K. S., & Baba, A. S., (2021), *The effects of Lycium barbarum water extract and fish collagen on milk proteolysis and in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of yogurt*, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 68(2), 221-229.
17. Halim, N. R. A., Yusof, H. M., & Sarbon, N. M., (2016), *Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review*. *Trends in Food Science & Technology*, 51, 24-33.
18. Caruso, Gabriella, Rosanna Floris, Claudio Serangeli, and Luisa Di Paola., (2020), *Fishery Wastes as a Yet Undiscovered Treasure from the Sea: Biomolecules Sources, Extraction Methods and Valorization, Marine Drugs* 18, no. 12: 622.
19. Gao, R., Yu, Q., Shen, Y., Chu, Q., Chen, G., Fen, S., ... & Sun, Q., 2021, *Production, bioactive properties, and potential applications of fish protein hydrolysates: Developments and challenges*, *Trends in Food Science & Technology*, 110, 687-6999)

20. Shahidi, F., & Kamil, Y. J. (2001). *Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry*. *Trends in Food Science & Technology*, 12(12), 435-464.
21. Venugopal, V., (2016), *Enzymes from seafood processing waste and their applications in seafood processing*, *Advances in food and nutrition research*, 78, 47-69.
22. Yadav, M., Goswami, P., Paritosh, K. *et al.*, (2019), *Seafood waste: a source for preparation of commercially employable chitin/chitosan materials*, *Bioresour Bioprocess*. 6, 8.
23. Pachapur, V. L., Guemiza, K., Rouissi, T., Sarma, S. J., & Brar, S. K., (2016), *Novel biological and chemical methods of chitin extraction from crustacean waste using saline water*, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 91(8), 2331-2339.
24. Aam, Berit B., Ellinor B. Heggset, Anne Line Norberg, Morten Sørli, Kjell M. Vårum, and Vincent G. H. Eijsink, (2010), *Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine*, *Marine Drugs* 8, no. 5: 1482-1517.
25. Baron, R., Socol, M., Arhaliass, A., Bruzac, S., Le Roux, K., Del Pino, J. R., ... & Kaas, R., (2015), *Kinetic study of solid phase demineralization by weak acids in one-step enzymatic bio-refinery of shrimp cuticles*, *Process Biochemistry*, 50(12), 2215-2223.

26. Kaya, M., Mujtaba, M., Ehrlich, H., Salaberria, A. M., Baran, T., Amemiya, C. T., ... & Labidi, J., (2017), *On chemistry of γ -chitin*. Carbohydrate polymers, 176, 177-186.
27. Hosseinnejad, M., & Jafari, S. M., (2016), *Evaluation of different factors affecting antimicrobial properties of chitosan*, International journal of biological macromolecules, 85, 467-475.
28. Mao, X., Guo, N., Sun, J., & Xue, C., 2017, *Comprehensive utilization of shrimp waste based on biotechnological methods: A review*, Journal of Cleaner Production, 143, 814-823.
29. Dun, Y., Li, Y., Xu, J., Hu, Y., Zhang, C., Liang, Y., & Zhao, S., (2019), *Simultaneous fermentation and hydrolysis to extract chitin from crayfish shell waste*, International journal of biological macromolecules, 123, 420-426.
30. Mohan, K., Ganesan, A. R., Ezhilarasi, P. N., Kondamareddy, K. K., Rajan, D. K., Sathishkumar, P., ... & Conterno, L., (2022), *Green and eco-friendly approaches for the extraction of chitin and chitosan: A review*. Carbohydrate Polymers, 287, 119349.
31. Vicente, F. A., Huš, M., Likozar, B., & Novak, U., (2021), *Chitin deacetylation using deep eutectic solvents: ab initio-supported process optimization*, ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 9(10), 3874-3886.

32. El Knidri, H., Belaabed, R., Addaou, A., Laajeb, A., & Lahsini, A., (2018), *Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan*, International journal of biological macromolecules, 120, 1181-1189.
33. Samar, M. M., El-Kalyoubi, M. H., Khalaf, M. M., & Abd El-Razik, M. M., (2013), *Physicochemical, functional, antioxidant and antibacterial properties of chitosan extracted from shrimp wastes by microwave technique*. Annals of Agricultural Sciences, 58(1), 33-41.
34. El Knidri, H., El Khalfaouy, R., Laajeb, A., Addaou, A., & Lahsini, A., (2016), *Eco-friendly extraction and characterization of chitin and chitosan from the shrimp shell waste via microwave irradiation*, Process Safety and Environmental Protection, 104, 395-405.
35. Ma, Q., Gao, X., Bi, X., Xia, M., Han, Q., Peng, M., ... & Wang, M., (2021), *Combination of steam explosion and ionic liquid pretreatments for efficient utilization of fungal chitin from citric acid fermentation residue*, Biomass and Bioenergy, 145, 105967.
36. Kjartansson, G. T., Zivanovic, S., Kristbergsson, K., & Weiss, J., (2006), *Sonication-assisted extraction of chitin from shells of fresh water prawns (Macrobrachium rosenbergii)*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(9), 3317-3323.
37. Vallejo-Domínguez, D., Rubio-Rosas, E., Aguila-Almanza, E., Hernández-Cocoletzi, H., Ramos-Cassellis, M. E., Luna-Guevara, M. L., ... & Show, P. L.,

- (2021), *Ultrasound in the deproteinization process for chitin and chitosan production*, *Ultrasonics Sonochemistry*, 72, 105417.
38. Deng, J. J., Mao, H. H., Fang, W., Li, Z. Q., Shi, D., Li, Z. W., ... & Luo, X. C., (2020), *Enzymatic conversion and recovery of protein, chitin, and astaxanthin from shrimp shell waste*, *Journal of Cleaner Production*, 271, 122655.
39. Dhanabalan, V., Xavier, K. M., Eppen, S., Joy, A., Balange, A., Asha, K. K., ... & Nayak, B. B., (2021), *Characterization of chitin extracted from enzymatically deproteinized Acetes shell residue with varying degree of hydrolysis*, *Carbohydrate polymers*, 253, 117203.
40. da Silva Lucas, A. J., Oreste, E. Q., Costa, H. L. G., López, H. M., Saad, C. D. M., & Prentice, C., (2021), *Extraction, physicochemical characterization, and morphological properties of chitin and chitosan from cuticles of edible insects*, *Food Chemistry*, 343, 128550.
41. Tan, J. S., Abbasiliasi, S., Lee, C. K., & Phapugrangkul, P., (2020), *Chitin extraction from shrimp wastes by single step fermentation with Lactobacillus acidophilus FTDC3871 using response surface methodology*, *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(11), e14895.
42. Abuzar, Sharif, H. R., Sharif, M. K., Arshad, R., Rehman, A., Ashraf, W., ... Al-Sameen, M. A., (2023), *Potential industrial and nutritional applications of*

- shrimp by-products: a review*. International Journal of Food Properties, 26(2), 3407–3432.
43. Chen, X., Yang, H., & Yan, N., (2016), *Shell biorefinery: dream or reality?*, Chemistry—A European Journal, 22(38), 13402-13421.
44. Tan, Y.N., Lee, P.P. & Chen, W.N., (2020), *Microbial extraction of chitin from seafood waste using sugars derived from fruit waste-stream*, AMB Expr 10, 17.
45. Gómez-Estaca, J., Calvo, M. M., Sánchez-Faure, A., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C., (2015), Development, properties, and stability of antioxidant shrimp muscle protein films incorporating carotenoid-containing extracts from food by-products, LWT-Food Science and Technology, 64(1), 189-196.
46. Gulzar, S., Raju, N., Nagarajarao, R. C., & Benjakul, S., (2020), *Oil and pigments from shrimp processing by-products: Extraction, composition, bioactivities and its application-A review*. Trends in Food Science & Technology, 100, 307-319.
47. Ito, N., Seki, S., & Ueda, F., (2018), *The protective role of astaxanthin for UV-induced skin deterioration in healthy people—A randomized, double-blind, placebo-controlled trial*, Nutrients, 10(7), 817.
48. Yusoff, F. M., Banerjee, S., Nagao, N., Imaizumi, Y., Shariff, M., & Toda, T., 2020, *Use of microalgae pigments in aquaculture*. Pigments from microalgae handbook, 471-513.

49. Rodríguez-Sifuentes, L., Marszalek, J. E., Hernández-Carbajal, G., & Chuck-Hernández, C., (2021), *Importance of downstream processing of natural astaxanthin for pharmaceutical application*, *Frontiers in Chemical Engineering*, 2, 601483.
50. Daliri, E. B. M., Oh, D. H., & Lee, B. H., 2017, *Bioactive peptides*. *Foods*, 6(5), 32.
51. Ambigaipalan, P., & Shahidi, F., 2017, *Bioactive peptides from shrimp shell processing discards: Antioxidant and biological activities*, *Journal of Functional Foods*, 34, 7-17.
52. Afonso, C., Bandarra, N. M., Nunes, L., & Cardoso, C., (2016), *Tocopherols in seafood and aquaculture products*, *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(1), 128-140.
53. Mathew, G. M., Mathew, D. C., Sukumaran, R. K., Sindhu, R., Huang, C. C., Binod, P., ... & Pandey, A., 2020, *Sustainable and eco-friendly strategies for shrimp shell valorization*. *Environmental Pollution*, 267, 115656.
54. Misra, N. N., Koubaa, M., Roohinejad, S., Juliano, P., Alpas, H., Inácio, R. S., ... & Barba, F. J., (2017), *Landmarks in the historical development of twenty first century food processing technologies*, *Food Research International*, 97, 318-339.

55. Piringer, O. G., & Baner, A. L. (Eds.), (2008), *Plastic packaging materials for food: barrier function, mass transport, quality assurance, and legislation*. John Wiley & Sons.
56. Siracusa, V., & Rosa, M. D., (2018), *Sustainable packaging*. In *Sustainable food systems from agriculture to industry* (pp. 275-307). Academic Press.
57. Marichelvam, M. K., Jawaid, M., & Asim, M., (2019), *Corn and rice starch-based bio-plastics as alternative packaging materials*, *Fibers*, 7(4), 32.
58. Pratima, J., & Purraho, A., (2022), *Production of Packaging and Value Added Material from Bamboo Biomass*, *Journal of Packaging Technology and Research*, 1-15.
59. dos Santos, D. F., & Vasconcelos, A. J., (2022), *Study of the Mechanical Properties of Sugar Cane Fiber for Packaging Paper Based on Polyacrylamide and Natural Fibers*, *Advanced Materials Research*, 1170, 117-127.
60. Regattieri, A., Gamberi, M., Bortolini, M., & Piana, F., (2018), *Innovative solutions for reusing packaging waste materials in humanitarian logistics*, *Sustainability*, 10(5), 1587.
61. Douglas C. Giancoli, (2022), *Physics for Scientists and Engineers with Modern Physics* (Chapters 1-20), 5th Edition by Douglas C. Giancoli Copyright ©: 2020, 2008, 2000, 1989, 1984 by. Published by Pearson Education, Inc. All Rights Reserved.

62. Machado, G., Santos, F., Lourega, R., Mattia, J., Faria, D., Eichler, P., & Auler, A., (2020), *Biopolymers from lignocellulosic biomass: feedstocks, production processes, and applications*, Lignocellulosic biorefining technologies, 125-158.
63. Radev, R., & Pashova, S., (2020), *Application of edible films and coatings for fresh fruit and vegetables*, Qual. Access Success, 21, 108-112.
64. Shukla, P., Bhise, S., & Thind, S. S., (2019), *Role of biodegradable edible films and coatings in food industry*, Acta Scientific Nutritional Health, 3(5), 138-147.
65. Kocira, A., Kozłowicz, K., Panasiewicz, K., Staniak, M., Szpunar-Krok, E., & Hortyńska, P., (2021), *Polysaccharides as edible films and coatings: Characteristics and influence on fruit and vegetable quality—A review*, Agronomy, 11(5), 813.
66. Atarés, L., & Chiralt, A., 2016, *Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging*, Trends in food science & technology, 48, 51-62.
67. Zhang, X., Ismail, B. B., Cheng, H., Jin, T. Z., Qian, M., Arabi, S. A., ... & Guo, M., 2021, *Emerging chitosan-essential oil films and coatings for food preservation-A review of advances and applications*, Carbohydrate Polymers, 273, 118616.

68. Sánchez-González, L., Cháfer, M., Chiralt, A., & González-Martínez, C., 2010, *Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on Penicillium italicum*, Carbohydrate polymers, 82(2), 277-283.
69. Mohamed, A. Y. I., Aboul-Anean, H. E., & Amal, M. H., (2013), *Utilization of edible coating in extending the shelf life of minimally processed prickly pear*.
70. Tharanathan, R. N., (2003), *Biodegradable films and composite coatings: past, present and future*, Trends in food science & technology, 14(3), 71-78.
71. Chen, H., Wang, J., Cheng, Y., Wang, C., Liu, H., Bian, H., ... & Han, W., (2019), *Application of protein-based films and coatings for food packaging: A review*, Polymers, 11(12), 2039.
72. Balla, E., Daniilidis, V., Karlioti, G., Kalamas, T., Stefanidou, M., Bikiaris, N. D., ... & Bikiaris, D. N., (2021), *Poly (lactic Acid): A versatile biobased polymer for the future with multifunctional properties—From monomer synthesis, polymerization techniques and molecular weight increase to PLA applications*, Polymers, 13(11), 1822.
73. Amadu, A. A., Qiu, S., Ge, S., Addico, G. N. D., Ameka, G. K., Yu, Z., ... & Wang, S, (2021), *A review of biopolymer (Poly- β -hydroxybutyrate) synthesis in microbes cultivated on wastewater*, Science of The Total Environment, 756, 143729.

74. Balart, R., Garcia-Garcia, D., Fombuena, V., Quiles-Carrillo, L., & Arrieta, M. P., (2021), *Biopolymers from natural resources*, *Polymers*, 13(15), 2532.
75. Cazón, P., Velazquez, G., Ramírez, J. A., & Vázquez, M., (2017), *Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review*, *Food Hydrocolloids*, 68, 136-148.
76. Cagri, A., Ustunol, Z., & Ryser, E. T., (2004), *Antimicrobial edible films and coatings*, *Journal of food protection*, 67(4), 833-848.
77. Ma, W., Tang, C. H., Yin, S. W., Yang, X. Q., Wang, Q., Liu, F., & Wei, Z. H., (2012), *Characterization of gelatin-based edible films incorporated with olive oil*, *Food Research International*, 49(1), 572-579.
78. Bourtoom, T. J. I. F. R. J., (2009), *Edible protein films: properties enhancement*, *International Food Research Journal*, 16(1), 1-9.
79. Pirsá, S., & Aghbolagh Sharifi, K., (2020), *A review of the applications of bioproteins in the preparation of biodegradable films and polymers*, *Journal of chemistry letters*, 1(2), 47-58.
80. Nogueira, D., & Martins, V. G., (2019), *Use of different proteins to produce biodegradable films and blends*, *Journal of Polymers and the Environment*, 27, 2027-2039.
81. Galus, S., & Kadzińska, J., (2016), *Whey protein edible films modified with almond and walnut oils*, *Food Hydrocolloids*, 52, 78-86.

82. Gao, P., Wang, F., Gu, F., Liang, J., Li, N., & Ludescher, R. D., (2017), *Preparation and characterization of zein thermo-modified starch films*, Carbohydrate polymers, 157, 1254-1260.
83. Su, J. F., Huang, Z., Yuan, X. Y., Wang, X. Y., & Li, M., (2010), *Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions*, Carbohydrate polymers, 79(1), 145-153.
84. Amin, U., Khan, M. U., Majeed, Y., Rebezov, M., Khayrullin, M., Bobkova, E., ... & Thiruvengadam, M., (2021), Potentials of polysaccharides, lipids and proteins in biodegradable food packaging applications, International Journal of Biological Macromolecules, 183, 2184-2198.
85. Zhu, F., (2021), *Polysaccharide based films and coatings for food packaging: Effect of added polyphenols*, Food Chemistry, 359, 129871.
86. Kocira, A., Kozłowicz, K., Panasiewicz, K., Staniak, M., Szpunar-Krok, E., & Horthyńska, P., (2021), *Polysaccharides as edible films and coatings: Characteristics and influence on fruit and vegetable quality—A review*, Agronomy, 11(5), 813
87. Cazón, P., Velazquez, G., Ramírez, J. A., & Vázquez, M., (2017), *Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review*, Food Hydrocolloids, 68, 136-148.

88. Wang, H., Qian, J., & Ding, F., (2018), *Emerging chitosan-based films for food packaging applications*, Journal of agricultural and food chemistry, 66(2), 395-413.
89. Weber, C. J., Haugaard, V., Festersen, R., & Bertelsen, G., (2002), *Production and applications of biobased packaging materials for the food industry*, Food Additives & Contaminants, 19(sup1), 172–177.
90. Mitrus, M., Wojtowicz, A., & Moscicki, L., (2009), *Biodegradable polymers and their practical utility*, Thermoplastic starch: a green material for various industries, 1-33.
91. Muncke, J., Andersson, A. M., Backhaus, T., Boucher, J. M., Carney Almroth, B., Castillo Castillo, A., ... & Scheringer, M., (2020), *Impacts of food contact chemicals on human health: a consensus statement*, Environmental Health, 19, 1-12
92. Rinaudo, M., (2006), *Chitin and chitosan: Properties and applications*, Prog. Polym. Sci. 31 (7), 603-632.
93. Liu, T., Li, J.; Tang, Q., Qiu, P., Gou, D.; Zhao, J., (2022), *Chitosan-based materials: an overview of potential applications in food packaging*. Foods. 11 (10), 1490.
94. Vadalà, R., Di Bella, G., Kosakovska, O., Dugo, G., Cicero, N., & Costa, R., (2022); *Nutritional benefits of peanut by-products*, In Sustainable Food Science: a comprehensive approach (pp. 1-46). Elsevier

95. Vadalà, R., Lo Vecchio, G., Rando, R., Leonardi, M., Cicero, N., Costa, R. A., (2023), *Sustainable Strategy for the Conversion of Industrial Citrus Fruit Waste into Bioethanol*. Sustainability. 15 (12), 9647.
96. Wang, J., Euring, M., Ostendorf, K., Zhang, K., (2022), *Biobased materials for food packaging*, J. Bioresour. Bioprod. 7 (1), 1-13.
97. Tropea, A.; Potorti, A. G.; Lo Turco, V.; Russo, E.; Vadalà, R.; Rando, R.; Di Bella G., (2021), *Aquafeed Production from Fermented Fish Waste and Lemon Peel*. Fermentation, 7 (4), 272
98. Zare, H., Jafari, Z., & Darzi, H. H. (2022). *Production of chitin and chitosan from shrimp shell wastes using co-fermentation of lactiplantibacillus plantarum PTCC 1745 and Bacillus subtilis PTCC 1720*. Applied Food Biotechnology, 9(4), 311-320.
99. Lavertu, M., Xia, Z., Serreqi, A. N., Berrada, M., Rodrigues, A., Wang, D., Buschmann, M. D., Gupta, A., (2003), *A Validated ¹H NMR Method for the Determination of the Degree of Deacetylation of Chitosan*, J. Pharm. Biomed. Anal. 32 (6), 1149–1158.
100. Zambrano-Zaragoza, M., González-Reza, R., Mendoza-Muñoz, N., Miranda-Linares, V., Bernal-Couoh, T., Mendoza-Elvira, S.; Quintanar-Guerrero, D., (2018), *Nanosystems in Edible Coatings: A Novel Strategy for Food Preservation*. IJMS 2018, 19 (3), 705.

101. Zakharova, V. A., Kildeeva, N. R., (2021), *Biopolymer Matrices Based on Chitosan and Fibroin: A Review Focused on Methods for Studying Surface Properties*. Polysaccharides. 2 (1), 154–167.
102. Costa, R., De Fina, M.R., Valentino, M.R., Dugo, P., Mondello, L., (2007), *Reliable identification of terpenoids and related compounds by using Linear Retention Indices interactively with Mass Spectrometry search*, Nat. Prod. Commun. 2(4), 413-418.
103. Darıcı, M., Özcan, K., Beypinar, D., & Cabaroglu, T., (2021), *Sensory lexicon and major volatiles of rakı using descriptive analysis and GC-FID/MS*, Foods, 10(7), 1494.
104. Drake, M.A., Yates, M.D., Gerard, P.D., Delahunty, C.M., Sheehan, E.M., Turnbull, R.P., Dodds, T.M., (2005), *Comparison of differences between lexicons for descriptive analysis of Cheddar cheese flavour in Ireland, New Zealand, and the United States of America*. Int. Dairy J. 15 (5), 473-483.
105. Susmitha, A., Sasikumar, K., Rajan, D., Padmakumar M, A., Nampoothiri, K. M., (2021), *Development and Characterization of Corn Starch-Gelatin Based Edible Films Incorporated with Mango and Pineapple for Active Packaging*. Food Biosci. 41, 100977.
106. Briassoulis, D., Giannoulis, A., (2018), *Evaluation of the Functionality of Bio-Based Food Packaging Films*. Polymer Testing. 69, 39–51.

107. Hou, C., Gao, L., Wang, Z., Rao, W., Du, M., Zhang, D., (2020), *Mechanical Properties, Thermal Stability, and Solubility of Sheep Bone Collagen–Chitosan Films*. J. Food Process Eng. 43 (1), e13086.
108. Leceta, I., Guerrero, P., & De La Caba, K., (2013), *Functional properties of chitosan-based films*, Carbohydrate polymers, 93(1), 339-346.
109. Bicchi, C., Liberto, E., Matteodo, M., Sgorbini, B., Mondello, L., d'Acampora Zellner, B., Costa, R., Rubiolo, P., (2008), *Quantitative analysis of essential oils: a complex task*. Flavour Fragr. J. 23, 382-391.
110. Sunesen, L. O., Lund, P., Sorensen, J., Holmer, G., (2002), *Development of Volatile Compounds in Processed Cheese during Storage*. Food Sci. Technol. 35 (2), 128–134.
111. Mondello, L., Costa, R., Tranchida, P.Q., Chiofalo, V., Zumbo, A., Dugo, P., Dugo, G., (2005), *Determination of Flavor Components in Sicilian Goat Cheese by Automated HS-SPME-GC*, Flavour Fragr. J. 20, 659-665.
112. Chiofalo, B., Polidori, M., Costa, R., Salimei, E., (2005), *Fresh forage in dairy ass's ration: effect on milk fatty acid composition and flavours*. Ital. J. Anim. Sci. 4 (Suppl.2), 433-435.
113. Yvon, M., Rijnen, L., (2001), *Cheese Flavour Formation by Amino Acid Catabolism*, Int. Dairy J. 11 (4–7), 185–201.
114. Zheng, X., Liu, F., Shi, X., Wang, B., Li, K.; Li, B., Zhuge, B., (2018), *Dynamic Correlations between Microbiota Succession and Flavor*

Development Involved in the Ripening of Kazak Artisanal Cheese. Food Res. Int. 105, 733–742.

115. Singh, T. K., Drake, M. A., & Cadwallader, K. R., (2003), *Flavor of Cheddar cheese: A chemical and sensory perspective*, Comprehensive reviews in food science and food safety, 2(4), 166-189.
116. Pettersen, M. K., Eie, T., & Nilsson, A., (2005), *Oxidative stability of cream cheese stored in thermoformed trays as affected by packaging material, drawing depth and light.*, International dairy journal, 15(4), 355-362.
117. Becaro, A. A., Puti, F. C., Correa, D. S., Paris, E. C., Marconcini, J. M., & Ferreira, M. D., (2015), *Polyethylene films containing silver nanoparticles for applications in food packaging: characterization of physico-chemical and anti-microbial properties*, Journal of nanoscience and nanotechnology, 15(3), 2148-2156.
118. Sung, S.-Y., Sin, L. T.; Tee, T.-T., Bee, S.-T.; Rahmat, A. R.; Rahman, W. A. W. A., Tan, A.-C.; Vikhraman, M., (2013), *Antimicrobial Agents for Food Packaging Applications.* Trends in Food Science & Technology. 33 (2), 110–123.
119. Khorshidian, N., Yousefi, M., Khanniri, E., & Mortazavian, A. M., (2018), *Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese*, Innovative Food Science & Emerging Technologies, 45, 62-72.

120. Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., De Feo, V., (2013), *Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria*, *Pharmaceuticals*, 6 (12), 1451–14
121. De Farias, P. M.; De Vasconcelos, L. B.; Ferreira, M. E. S.; Alves Filho, E. G.; Tapia-Blácido, D. R., (2023), *Use of Chemically Treated Nopal Cladodes as Additive in the Cassava Starch Composite Films*. *Vinyl Additive Technology*, 29 (6), 1109–1124.
122. Khorshidian, N.; Yousefi, M.; Khanniri, E.; Mortazavian, A. M. Potential Application of Essential Oils as Antimicrobial Preservatives in Cheese. *Innovative Food Science & Emerging*