



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse naturali e
Ambiente

Dipartimento di Scienze Chimiche

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari

**RIVESTIMENTI EDIBILI A BASE DI CHITOSANO:
APPLICAZIONI SULLE FRAGOLE**

Relatore
Prof. Fernando Formaggio

Laureanda
Chiara Costa
Matricola n. 1223026

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

INDICE

<i>RIASSUNTO</i>	p.1
<i>ABSTRACT</i>	p.1
<i>INTRODUZIONE</i>	p.2
CAPITOLO I: RIVESTIMENTI E FILM EDIBILI	p.3
1.1 Tipologie di rivestimenti e film edibili	p.3
1.2 Proprietà	p.5
1.3 Metodi di applicazione	p.7
1.3.1 Metodi di applicazione dei rivestimenti edibili	p.7
1.3.2 Metodi di applicazione dei film edibili	p.9
CAPITOLO II: CHITOSANO	p.10
2.1 Descrizione generale	p.10
2.2 Rivestimenti e film edibili a base di chitosano	p.11
2.2.1 Proprietà fisiche e chimiche	p.12
2.2.2 Attività antimicrobica	p.13
2.2.3 Attività antiossidante	p.14
2.2.4 Attività di barriera	p.15
CAPITOLO III: APPLICAZIONE DI RIVESTIMENTI E FILM EDIBILI A BASE DI CHITOSANO SULLE FRAGOLE	p.17
3.1 Attività antimicrobica	p.17
3.2 Perdita di peso e consistenza	p.23
3.3 Contenuto di flavonoidi della fragola	p.24
3.4 Stress ossidativo	p.25
3.4.1 Attività della superossido dismutasi	p.25
3.4.2 Contenuto di malondialdeide della fragola	p.26
3.5 Solidi solubili totali e acidità titolabile	p.28
<i>CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE</i>	p.30
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	p.31

RIASSUNTO

La richiesta da parte dei consumatori di una maggiore sostenibilità ambientale ed una riduzione degli sprechi indirizza sempre più l'attenzione verso soluzioni ecosostenibili anche nell'ambito del packaging alimentare, come l'utilizzo di materiali a base di biopolimeri per la produzione di film e rivestimenti edibili. Infatti questi polimeri naturali composti da polisaccaridi, proteine, lipidi possono essere un'alternativa al tradizionale utilizzo di plastiche derivanti dal petrolio che ha seri impatti ambientali. Inoltre questi materiali, grazie alla loro composizione, hanno il potenziale per aumentare la stabilità e la *shelf-life* dei prodotti.

Questo elaborato tratterà di film e rivestimenti edibili con un focus sulla descrizione del chitosano, biopolimero biodegradabile derivante dalla parziale deacetilazione della chitina con varie funzioni di protezione nei confronti dei prodotti alimentari.

Verranno prese in esame le applicazioni di rivestimenti a base di chitosano sulle fragole per descriverne il potenziale utilizzo e gli effetti in termini di durata dalla *shelf-life*.

ABSTRACT

The consumers' request of more eco-friendly products and of a reduction of waste directs the attention towards more sustainable solutions even in the area of food packaging, such as the use of materials made of biopolymers for the production of edible films and coatings. As a matter of fact, these polysaccharide-, protein- or lipid-based natural polymers could be an alternative for the traditional use of petroleum-based plastics which causes serious environmental problems. Furthermore, thanks to their composition these materials have the potential to increase the stability and shelf-life of food.

This thesis is about edible films and coatings and focuses on the description of chitosan, a biodegradable biopolymer obtained from the partial deacetylation of chitin with various protection functions on food products.

Applications of chitosan-based coatings on strawberries are examined in order to describe their potential use and effects in terms of shelf-life duration.

INTRODUZIONE

Il confezionamento è una delle operazioni post-raccolta più critiche per la conservazione e l'allungamento della durata di conservazione di frutta, verdura e alimenti trasformati.

I recenti cambiamenti nella domanda alimentare, le tendenze della produzione industriale (prodotti freschi, gustosi, a lunga conservazione e a qualità controllata), la variazione degli stili di vita e le richieste più ecosostenibili da parte dei consumatori stanno portando all'evoluzione di nuove tecniche di confezionamento oltre al contenitore passivo usato come strumento di barriera fisica. I rivestimenti e film edibili rappresentano un metodo ecologico, promettente ed efficace che crea uno strato sottile di sostanze commestibili sulle superfici dei prodotti alimentari, con proprietà che permettono di prevenire il deterioramento durante la vita post-raccolta degli alimenti. Dunque, vengono applicati su molti prodotti per preservarne la qualità attraverso il controllo dei processi fisiologici, biochimici o di ossidazione.

Uno dei principali polimeri utilizzati per questo tipo di imballaggi è il chitosano che con le sue capacità antimicrobiche, antiossidanti e di barriera riesce a prolungare la *shelf-life* di molti prodotti. Inoltre, l'incorporazione di vari additivi al rivestimento a base di chitosano permette che vengano estese e migliorate le sue caratteristiche.

Le fragole sono uno dei frutti economicamente più importanti al mondo, tuttavia sono prodotti facilmente deperibili. Dunque questa suscettibilità al deterioramento può essere migliorata tramite l'impiego di rivestimenti e film edibili a base di chitosano. Può essere allungata la vita post-raccolta grazie alle proprietà di questo biopolimero associato anche ad altri additivi.

Dunque la sfida per le industrie alimentari sarà quella di sviluppare e implementare questi metodi e tecnologie innovativi nell'ambito del packaging alimentare per controllare e ridurre le perdite in post-raccolta assicurando sempre la sicurezza alimentare al consumatore e mantenendo il sapore i valori nutrizionali.

Capitolo I

RIVESTIMENTI E FILM EDIBILI

1.1 Tipologie di rivestimenti e film edibili

I rivestimenti edibili sono considerati come un'alternativa sostenibile e biodegradabile nel campo del packaging alimentare e forniscono un'ottimizzazione della qualità degli alimenti rispetto all'imballaggio convenzionale (Petkoska, 2021).

In generale, i materiali a base biologica e biodegradabili possono essere classificati in tre categorie in base alle fonti da cui provengono (Fig.1.1):

- materiali sviluppati da biomassa/fonti naturali (proteine, polisaccaridi e lipidi) (Pooja Saklani, 2019);
- materiali prodotti da microrganismi, solitamente appartenenti a tipi specifici di polisaccaridi (Ramos, 2018; Regubalan, 2018);
- materiali prodotti da monomeri a base biologica (Ramos, 2018; Regubalan, 2018).

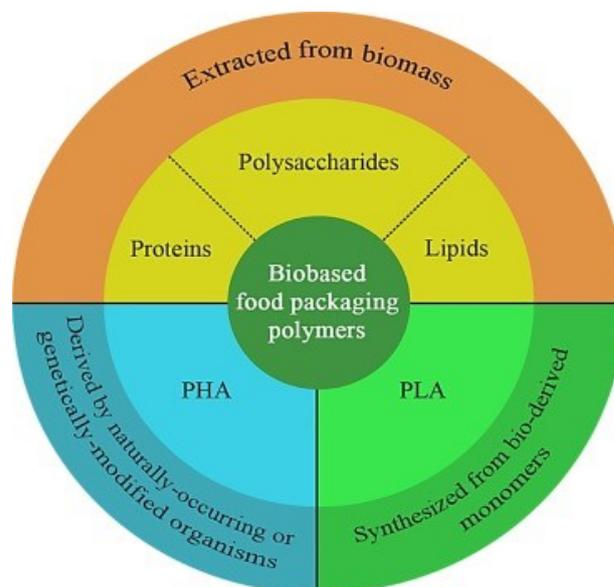


Fig. 1.1. Materiali a base biologica e biodegradabili per il confezionamento alimentare.

I materiali per il packaging edibile sono un sottogruppo dei materiali a base biologica e biodegradabili e sono stati ampiamente studiati come alternativa al tradizionale imballaggio alimentare. I biopolimeri utilizzati come materiali commestibili sono classificati in (Hanani, 2014; Jeevahan, 2019; Jiménez, 2018; Kumar, 2019; Shit, 2014):

- polisaccaridi (Arancibia, 2014; Sánchez-Ortega, 2014; Thakur, 2019; Xie, 2014): tra cui cellulosa, chitosano, amido, pectina, alginato, carragenina, pullano *etc.*;
- proteine (di origine animale o vegetale) (Cecchini, 2017; Chen, 2019; Erdem, 2019; Galus, 2019; Sarabandi, 2019; Schmid, 2019; Teixeira, 2014): collagene, caseina e proteine del siero di latte o proteine della soia, gelatina di collagene, glutine, zeina di mais, *etc.*;
- lipidi (Fabra, 2012; Galus, 2015; Sánchez-Ortega, 2014): classificati in acidi grassi, vitamine, cera d'api, cera di paraffina, cera di carnauba, cera di polietilene, cera di candelilla, cera di crusca di riso, cera di ouricuri e olio di jojoba *etc.* (Morillon, 2002);
- compositi (Ramos 2014, Talegaonkar 2017).

I materiali utilizzati derivano da polimeri naturali che possono essere consumati direttamente dall'uomo senza alcun potenziale rischio per la salute. Vi sono due tipologie di packaging edibile: film e rivestimenti. I primi sono una pellicola solida preformata utilizzata generalmente nella produzione di involucri, buste, sacchetti, capsule, mentre i secondi vengono applicati come un sottile strato direttamente sulla superficie degli alimenti (Petkoska, 2021).

Questi materiali commestibili possono essere utilizzati in varie applicazioni di tecnologia alimentare, da soli o in combinazione con altri componenti (Bermúdez-Oria, 2019; Dhall, 2013; Erdem, 2019; Łupina, 2019; Robledo, 2018; Siracusa, 2020). Nella maggior parte dei casi è necessaria l'aggiunta di plastificanti per creare film a base di proteine e polisaccaridi. Senza plastificante aggiunto, i film ottenuti da diversi polisaccaridi sono generalmente fragili a causa delle interazioni tra le catene polimeriche (Han, 2014). I plastificanti riducono la coesione all'interno del film indebolendo le forze intermolecolari tra catene polimeriche adiacenti (Espitia, 2014; Marcos, 2010). In questo modo, vengono modificate e migliorate le proprietà meccaniche, riducendo la tensione di deformazione, la durezza, la densità e la viscosità e aumentando la flessibilità della catena polimerica e la resistenza alla rottura (Vieira, 2011). Alcuni plastificanti comunemente usati sono

polioli (glicerolo, sorbitolo e polietilenglicole), zuccheri (glucosio e saccarosio) e lipidi (monogliceridi, fosfolipidi e tensioattivi) (Espitia, 2014). Inoltre, l'uso di plastificanti naturali, come i trigliceridi da oli vegetali o esteri di acidi grassi, è in aumento perché hanno bassa tossicità e bassa migrazione (Vieira, 2011).

1.2 Proprietà

I rivestimenti edibili vengono applicati su molti prodotti per preservarne la qualità attraverso il controllo dei processi fisiologici, biochimici o di ossidazione (Panahirad, 2021). Questi materiali fungono da barriera per i trasferimenti di gas e umidità nel prodotto alimentare, prolungando la durata di conservazione dei prodotti deperibili (Md Nor, 2020). Diminuzione della perdita d'acqua, reazioni di ossidazione e frequenza respiratoria, così come ritardo nella maturazione e senescenza o attività metaboliche legate a questi eventi (*e.g.* produzione di etilene, attività enzimatiche), sono tra gli effetti positivi dei rivestimenti edibili che portano al prolungamento della *shelf-life* dei prodotti (Md Nor, 2020). I rivestimenti commestibili riducono anche significativamente la crescita microbica, proteggono i prodotti da danni meccanici e prevengono la fuoriuscita di composti volatili favorevoli.

Vari additivi, in particolare principi attivi, possono essere aggiunti ai rivestimenti edibili, migliorandone l'efficienza e la funzionalità. Il rilascio di principi attivi dai materiali di rivestimento sulla superficie dei prodotti inibisce le reazioni indesiderate (*e.g.* produzione di etilene, imbrunimento o scolorimento, ossidazione e crescita microbica) (Kumar, 2018). Infatti, possono essere incorporati vari additivi alimentari come antimicrobici, composti aromatici, antiossidanti, pigmenti e ioni che possono migliorare l'efficienza e la funzionalità (Panahirad, 2021).

Dunque, i materiali utilizzati per le applicazioni di packaging alimentare devono essere biocompatibili, non immunogenici e non tossici (Rukmanikrishnan, 2020) e non indurre alcuna reazione allergica (Chandra, 1997) dopo la loro assunzione con i prodotti alimentari. Inoltre, i film e i rivestimenti edibili devono essere biodegradabili (Siracusa, 2008) e i loro prodotti di degradazione non devono causare alcuna tossicità nell'organismo.

Le funzioni del packaging edibile variano a seconda del biopolimero che lo compone:

- polisaccaridi: i rivestimenti a base di polisaccaridi hanno una permeabilità selettiva ai gas, contribuendo così a migliorare la vita del prodotto senza creare condizioni anaerobiche. Questi biofilm a base di polisaccaridi sono idrofili e hanno basse proprietà di barriera nei confronti dell'acqua ed elevata resistenza meccanica (Galgano, 2015).
- lipidi: sono apolari e quindi facilmente solubili in solventi non polari come esano e cloroformio (Mohamed, 2020). I rivestimenti a base di lipidi aggiungono un aspetto lucido e riducono la perdita di umidità grazie alle loro proprietà idrofobiche. Tuttavia, in alcuni casi potrebbe crearsi un ambiente anaerobico con conseguente aumento del rischio di contaminazione (Alkan, 2013).
- proteine: sono biopolimeri con composizioni e strutture complesse. L'elevata capacità di legame intermolecolare delle proteine le rende adatte a molteplici funzioni e applicazioni. La capacità delle proteine di interagire con le molecole vicine consente loro di formare film forti, viscoelastici e coesivi. Le proprietà del film dipendono fortemente da caratteristiche molecolari come peso molecolare, flessibilità, carica e conformazione e stabilità termica della molecola proteica. Inoltre, la sequenza amminoacidica e l'interazione tra le catene proteiche influenzano anche le proprietà meccaniche del film (Calva-Estrada, 2019).
- compositi: in queste tipologie di imballaggi alimentari si propone la combinazione di almeno due costituenti dove la debolezza di uno di essi viene compensata aggiungendo l'altro componente. Ad esempio, la permeabilità al vapore acqueo di polisaccaridi e proteine può essere migliorata aggiungendo lipidi, formando un composito che possiede proprietà sia idrofile che idrofobiche così come può essere migliorata la resistenza meccanica dei film a base di lipidi aggiungendo proteine o polisaccaridi (Broumand, 2011; Chakravartula, 2019; Janjarasskul, 2010; Jeevahan, 2019; Majeed; 2013).

Dunque, in generale questi materiali mantengono i parametri di qualità e l'aspetto dei prodotti alimentari (frutta, verdura, carne, pesce, latticini, *etc.*). Inoltre, ne migliorano la durata di conservazione grazie alle promettenti proprietà di protezione contro l'umidità, la trasmissione dei gas, l'ossidazione dei lipidi, il controllo delle attività enzimatiche e il deterioramento microbico (Rooney, 2005; Parreidt, 2018). Pertanto, gli effetti sono quelli di ottenere la protezione dall'imbrunimento, dalla perdita di consistenza, dalla scomparsa

di composti aromatici volatili naturali e di componenti del colore (Sapper, 2018), preservando allo stesso tempo le proprietà nutrizionali, organolettiche e microbiologiche dei prodotti alimentari. I rivestimenti e film commestibili aiutano anche a mantenere le proprietà fitochimiche (antiossidanti, fenoli, coloranti) e fisico-chimiche (frequenza respiratoria, perdita di peso, solidi solubili totali e pH) per un periodo di tempo prolungato (Sharma, 2019).

1.3 Metodi di applicazione

Il packaging edibile prevede due forme: i rivestimenti edibili applicati direttamente sul prodotto alimentare e i film preformati avvolti attorno al prodotto stesso.

I rivestimenti possono essere posti sull'alimento mediante diversi metodi per ottenere un sottile strato protettivo (Yousuf, 2018; Thakur, 2019). Le tecniche di applicazione sono: immersione, spruzzatura, letto fluido e panning (Yanyun, 2011; Raghav, 2016). Invece, i film sono generalmente avvolti attorno alla superficie del prodotto alimentare come matrice solida e possono fungere da imballaggio primario. In questo caso, il film deve essere insapore, incolore e non interferire con gli attributi sensoriali del prodotto alimentare (Viana, 2018). I film edibili possono essere ottenuti attraverso due diversi metodi: processi a umido e a secco; sono anche chiamati rispettivamente processi di colata ed estrusione (Bull, 2011).

1.3.1 Metodi di applicazione dei rivestimenti edibili

I metodi di applicazione dei rivestimenti edibili sono:

- immersione (Fig. 1.2): prevede l'immersione di un campione di cibo nella soluzione formante il rivestimento (Senturk Parreidt, 2018). Il metodo di immersione consiste in tre fasi: immersione e permanenza, deposizione, evaporazione dei solventi (Andrade, 2012; Costa, 2014; Tavassoli-Kafrani, 2016). Il processo di immersione è ampiamente utilizzato per applicare i rivestimenti ai prodotti freschi. In generale, la frutta e la verdura vengono immerse per 5–30 secondi nella formulazione del rivestimento edibile (Suhag, 2020). Per la sua semplicità e il basso costo, l'immersione è il principale metodo di applicazione in laboratorio (Atieno, 2019). Tuttavia, in alcuni casi questo processo fornisce un

rivestimento che potrebbe creare difficoltà nella respirazione e nella conservazione del prodotto alimentare (Martín-Belloso, 2009). Inoltre, vi sono diversi problemi che possono presentarsi tra cui: la diluizione del rivestimento, l'accumulo di rifiuti o sporco e lo sviluppo di microbi nella vasca di immersione (Andrade, 2012).

- spruzzatura (Fig.1.2): è il metodo utilizzato più comunemente (Debeaufort, 2009; Parreidt, 2018). Il rivestimento spinto attraverso degli ugelli forma delle goccioline che vengono distribuite sulla superficie del prodotto alimentare. Vi sono tre tipi di tecniche di spruzzatura utilizzate nelle industrie: atomizzazione a spruzzo d'aria; atomizzazione "air-assisted airless"; atomizzazione a pressione.
- letto fluido (Fig.1.2): la soluzione di rivestimento e la sospensione vengono spruzzate sulla superficie di polvere fluidizzata tramite una serie di ugelli.
- panning (Fig.1.2): consiste nel posizionare gli alimenti che devono essere rivestiti in un contenitore in rotazione. La soluzione di stratificazione viene quindi spruzzata e il prodotto viene fatto rotolare per distribuire la soluzione di rivestimento uniformemente sulla superficie dell'alimento (Suhag, 2020).

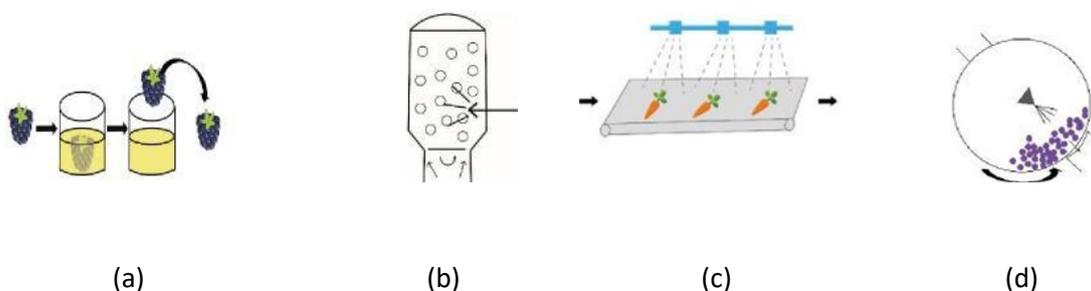


Fig. 1.2. Modelli schematici dei metodi di applicazione dei rivestimenti edibili (a) immersione; (b) letto fluido; (c) spruzzatura; (d) panning.

Questi metodi di deposizione dei rivestimenti sui prodotti alimentari dipendono dalla natura del cibo che deve essere rivestito, dalle caratteristiche della superficie e dall'obiettivo principale dell'imballaggio. La procedura di applicazione della soluzione di rivestimento edibile sui prodotti alimentari è accompagnata da quella di adesione che prevede la diffusione tra la soluzione di rivestimento e la superficie dell'alimento (Parreidt, 2018).

Il metodo di immersione è utilizzato maggiormente a livello di laboratorio, invece il metodo di spruzzatura è preferito per la formazione di rivestimenti su scala commerciale (Suhag, 2020).

1.3.2 Metodi di applicazione dei film edibili

I metodi di applicazione dei film edibili sono i seguenti:

- colata (Fig. 1.3): questo metodo prevede tre fasi per preparare un film da biopolimeri: solubilizzazione del biopolimero in un solvente adatto, colata della soluzione nello stampo, essiccamento della soluzione colata (Rhim, 2006).
- estrusione (Fig. 1.3): i biopolimeri sono plastificati dalla pressione del calore e dalla forza di taglio nella canna dell'estrusore per formare una massa fusa omogenea nel macchinario.

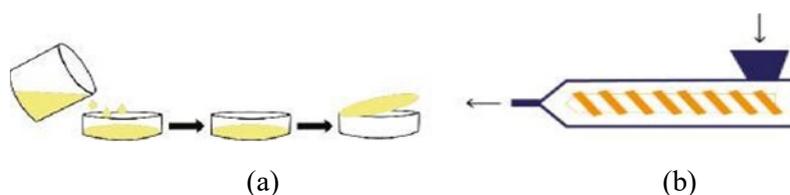


Fig. 1.3. Modelli schematici dei metodi di applicazione dei film edibili (a) colata, (b) estrusione

Le caratteristiche del film come resistenza meccanica, elasticità, reologia, umidità e permeazione di gas, colore, trasmissione della luce *etc.* sono determinate dalla chimica fisica dei biopolimeri (Sharma, 2018).

Lo spessore, la trasparenza, l'opacità, il grado di rigonfiamento, la stabilità termica, la resistenza meccanica, la velocità di trasmissione dell'ossigeno, la permeabilità al vapore acqueo e le caratteristiche biologiche sono i parametri più importanti dei film edibili (Skurtys, 2010; Kanatt, 2012; Khanzadi, 2015). I plastificanti vengono utilizzati per migliorare la resistenza meccanica, le proprietà di barriera e la stabilità termica (Park, 2008; Fakhouri, 2013).

I metodi di colata sono i più usati su scala di laboratorio, mentre quelli di estrusione sono preferiti per le applicazioni su scala commerciale (Suhag, 2020).

Capitolo II

CHITOSANO

2.1 Descrizione generale

Il chitosano ($C_6H_{11}O_4N$)_n è un derivato della chitina (figura 2.1), la quale è un abbondante biopolimero spesso presente nelle pareti cellulari della maggior parte di funghi, lieviti, insetti, gusci di crostacei, bachi da seta ed esoscheletri marini (Ahmad, 2020; Shanmuganathan, 2019; Zargar, 2015). Essa è costituita da più unità di N-acetilglucosammina legate tra di loro con un legame di tipo β -1,4 ed è strutturalmente simile alla cellulosa.

Il chitosano è un polimero biodegradabile e biocompatibile, sintetizzato per parziale deacetilazione in ambiente alcalino della chitina (Fig. 2.1). È classificato al secondo posto, dopo la cellulosa, come biopolimero più abbondante in natura (Moran, 2018). È solubile in soluzioni acide ed è considerato cationico a causa della protonazione dei suoi gruppi amminici, il cui valore di pKa è pari a 6,5 (Kumar, 2020).

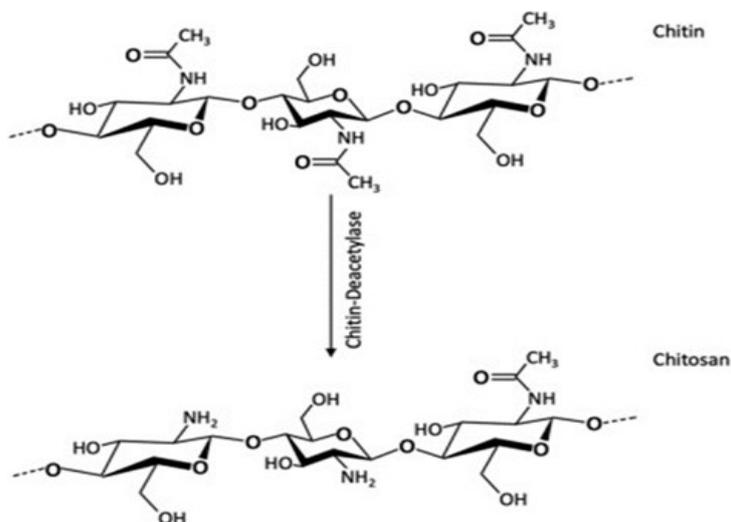


Fig. 2.1. Le strutture chimiche del chitosano e della chitina e la sua deacetilazione da parte della chitina deacetilasi.

Il principale processo di estrazione per ottenere il chitosano prevede tre passaggi fondamentali: demineralizzazione, deproteinizzazione e deacetilazione. In alcuni casi risulta necessario anche un passaggio complementare denominato decolorazione che ha lo scopo di rimuovere i pigmenti indesiderati, come β -carotene e astaxantina, utilizzando

diversi solventi inorganici e organici (*e.g.* acetone, perossido di idrogeno e ipoclorito di sodio) (El Knidri, 2018). L'estrazione industriale di chitosano o chitina può essere eseguita attraverso metodi biologici, chimici e con l'utilizzo di microonde (Abhinaya, 2021; Kaur, 2015; Shanmuganathan, 2019; Sivashankari, 2017). I metodi chimici sono ampiamente utilizzati per la produzione commerciale di massa di chitosano grazie alla loro elevata efficienza, ai brevi tempi di produzione e al basso costo (Shanmuganathan, 2019; Wang, 2020; Younes, 2015).

La fonte di chitina, il grado di deacetilazione e le condizioni di reazione (concentrazione dei reagenti, rapporto alcali/chitina e temperatura) sono i principali fattori che determinano il peso molecolare del chitosano e le sue proprietà funzionali (Garavand, 2020). Infatti, la letteratura descrive principalmente il chitosano in termini di peso molecolare medio, grado di deacetilazione e indice di polidispersione. I piccoli cambiamenti in questi parametri possono influenzare fortemente una serie di proprietà biologiche e fisico-chimiche del chitosano, comprese le proprietà idrofile/idrofobiche, la solubilità, la risposta cellulare e il grado di cristallinità (El Knidri, 2018; Qinna, 2015).

Quindi, il chitosano è un polisaccaride economico ed è disponibile in commercio in diverse forme come polvere, soluzione o scaglie con un colore bianco leggermente traslucido. In fase solida, il chitosano è semicristallino e generalmente solubile in acido organico diluito come acido acetico, citrico, formico, lattico, malico o tartarico (Cazón, 2019; Rhim, 1998).

Il chitosano è classificato come GRAS (Generally Recognized As Safe) dalla Food and Drug Administration degli Stati Uniti (USFDA) (Fortunati, 2017; Tezotto, 2014). Dunque, il chitosano potrebbe rivelarsi un promettente materiale ecosostenibile grazie alla sua rinnovabilità, biodegradabilità intrinseca, disponibilità naturale, non tossicità e facilità di modifica.

2.2 Rivestimenti e film edibili a base di chitosano

Le proprietà del chitosano lo rendono un biopolimero di grande interesse e adatto allo sviluppo di packaging con applicazioni nell'industria alimentare (per imballaggi attivi o intelligenti), biomedica e chimica (Siripatrawan, 2010). Infatti, il chitosano e i suoi derivati, oltre ad essere biodegradabili, atossici e biocompatibili, hanno anche proprietà antimicrobiche, antimicotiche e chelanti dei metalli (Aider, 2010; Bakshi, 2020).

Il chitosano utilizzato per rivestimenti e film edibili è efficace nel prolungare la vita post-raccolta di molte colture riducendo la perdita di umidità, la respirazione, la produzione di etilene, la maturazione e la perdita di consistenza. Allo stesso tempo consente di controllare il decadimento, migliorando di conseguenza la qualità e la conservabilità (Kumarihami, 2022). Inoltre, i rivestimenti edibili hanno la capacità di essere utilizzati come veicoli per specifici additivi alimentari in post-raccolta (agenti antimicrobici, antiossidanti, agenti anti-imbrunimento, aromi, coloranti e sostanze nutritive) che ritardano la perdita di colore, la crescita microbica e prolungano la *shelf-life* dei prodotti (Benítez, 2015; Fisk, 2008; Galgano, 2015; Suput, 2015; Xu, 2001).

2.2.1 Proprietà fisiche e chimiche

Le proprietà meccaniche dei film di chitosano possono essere modificate da molteplici fattori. Le caratteristiche del chitosano (grado di deacetilazione, peso molecolare), il metodo di produzione del film, la concentrazione di chitosano, il tempo di conservazione e le condizioni al momento delle misurazioni e durante tutta la prova sono fattori che influiscono sulla proprietà meccaniche (Cazón, 2019). Inoltre, l'aggiunta di eventuali agenti attivi utilizzati per arricchire la matrice a base di chitosano può influenzare le proprietà meccaniche, di barriera e funzionali (Flórez, 2022). I risultati di numerosi studi hanno dimostrato che per migliorare le proprietà meccaniche e strutturali si possono aggiungere composti fenolici (Flórez, 2022) e materiali come polimeri, oli essenziali, nanoparticelle, estratti vegetali (Wang, 2019).

Le modifiche superficiali, che introducono parti cariche o idrofobiche sulle superfici del chitosano, non solo aiutano a raggiungere l'equilibrio desiderato tra idrofobicità e idrofilia, ma migliorano anche le proprietà chimiche, meccaniche e biologiche dei compositi risultanti (Negm, 2020). I numerosi gruppi laterali reattivi come gruppi amminici e idrossilici offrono la possibilità di modificare chimicamente il chitosano. Data l'importanza delle modificazioni superficiali del chitosano, la letteratura recente ha visto un numero crescente di iniziative di ricerca con l'obiettivo di migliorare la solubilità in acqua e altre proprietà funzionali del chitosano (Zhu, 2016). Il polimero può essere modificato attraverso due vie principali: chimica e fisica. I risultati della ricerca hanno anche dimostrato che la natura idrofila del chitosano, che ha posto un collo di bottiglia significativo alle sue applicazioni, potrebbe essere superata utilizzando tecniche di modifica della superficie.

2.2.2 Attività antimicrobica

Il chitosano ha attività antimicrobica contro diversi microrganismi come funghi, lieviti e batteri Gram-positivi e Gram-negativi (Adiletta, 2021). Per quanto riguarda l'efficacia antimicrobica vengono proposti diversi modelli concernenti i meccanismi d'azione:

- interazione elettrostatica: il primo e più accettato modello suggerisce che a bassi valori di pH si instaura un'elevata interazione elettrostatica tra i gruppi amminici protonati del chitosano e i gruppi anionici carbossilici e fosfati delle superfici batteriche esterne. Il chitosano inibisce i batteri Gram-positivi neutralizzando le cariche negative sulla superficie con le proprie cariche positive, che successivamente portano all'idrolisi del peptidoglicano nella parete cellulare e alla fuoriuscita di soluti dalla cellula. Invece, quando interagisce con i batteri Gram-negativi, il chitosano si lega alla membrana esterna della parete cellulare per attrazione elettrostatica e blocca il trasporto dei nutrienti attraverso la parete cellulare (Adiletta, 2021). Dunque, il principale fattore responsabile dell'attività antimicrobica del chitosano è la presenza, la densità e la localizzazione delle cariche cationiche nella struttura portante del polimero (Sahariah, 2017)
- chelazione dei metalli: il secondo modello si applica alle specie batteriche che hanno ioni metallici sulla loro superficie (Sahariah, 2017). I gruppi amminici non protonati hanno una forte capacità di donare coppie di elettroni agli ioni metallici sulla superficie dei batteri per formare complessi, impedendo così la crescita del microrganismo (Rabea, 2003). Questo effetto di chelazione è ancora più potente degli effetti elettrostatici quando il pH è superiore a 6 (Sahariah, 2017).
- legame tra chitosano e DNA microbico: il terzo modello si basa sul fatto che il chitosano a basso peso molecolare (PM) che entra nella cellula, si lega al DNA e distrugge il microrganismo a livello intracellulare (Kou, 2022). Il chitosano a basso peso molecolare penetra nei nuclei dei microrganismi, si lega con il DNA e inibisce la sintesi del mRNA (Oladzadabbasabadi, 2022). Inoltre, quando il PM è basso la catena polimerica di solito si rilassa e si estende in una catena quasi lineare, esponendo più $-NH_3^+$ che possono interagire con l'organismo bersaglio (Pavinatto, 2013).

Oltre a questi modelli è stata proposta un'ulteriore modalità di azione antibatterica, basata sul peso molecolare e sullo stato fisico. Questo meccanismo prevede che per i bassi pesi molecolari l'azione venga spiegata dal legame con il DNA microbico sopra citato, mentre

per quanto concerne gli alti pesi molecolari il polimero forma uno strato impermeabile sulla superficie cellulare, influenzando il trasporto di costituenti vitali nella cellula batterica (Younes, 2015; Eaton, 2008).

Dunque, l'attività antimicrobica del chitosano dipende da diversi fattori:

- peso molecolare del chitosano (Confederat, 2021)
- grado di acetilazione (DA): il chitosano ha una maggiore efficacia nell'inibire la crescita microbica quando ha un basso grado di acetilazione (Sharma, 2016). Questo perché un DA inferiore suggerisce una maggiore concentrazione di gruppi amminici nella molecola e la protonazione di $-NH_2$ è cruciale per gli effetti biologici e la solubilità in acqua (Nilsen, 2015).
- concentrazione di chitosano (Confederat, 2021).
- fattori ambientali: pH, temperatura e cationi metallici (Confederat, 2021).
- microrganismo: specie, età cellulare (Confederat, 2021).

Il chitosano può prevenire la crescita di un'ampia gamma di funghi e batteri, mostrando più efficacia nei confronti dei batteri Gram-positivi rispetto ai Gram-negativi (Riaz, 2018).

Infine, è interessante notare come l'attività antimicrobica di film e rivestimenti a base di chitosano possa essere migliorata attraverso l'aggiunta di oli essenziali, composti fenolici ed estratti di frutta (Flórez, 2022).

2.2.3 Attività antiossidante

Un'altra nota funzione del chitosano è la sua attività antiossidante. Il chitosano può eliminare i radicali liberi in eccesso grazie alla presenza di gruppi funzionali amminici e idrossilici (Wei, 2019). Infatti, il chitosano è in grado di esercitare attività antiossidante attraverso lo *scavenging* dei radicali liberi. Tomida (2009) ha dimostrato che le attività antiossidanti e di *scavenging* del chitosano dipendono fortemente dal suo peso molecolare. Sulla base di questi risultati il chitosano a basso peso molecolare non solo elimina i radicali 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH), ma anche i radicali perossilici. Numerosi studi hanno dimostrato la capacità del chitosano di eliminare le specie reattive dell'ossigeno (ROS) prevenendo l'ossidazione dei lipidi negli alimenti e sistemi biologici. Il chitosano può eliminare i radicali liberi o chelare gli ioni metallici attraverso una donazione di atomi di idrogeno o di coppie di elettroni liberi. La chelazione si verifica dopo che il chitosano interagisce con gli ioni metallici attraverso i suoi gruppi amminici.

Nei frutti in cui sono stati applicati rivestimenti a base di chitosano, è stata riscontrata modulazione o controllo dello stress ossidativo nelle cellule. Infatti, i rivestimenti mantengono l'appropriato equilibrio dei ROS nelle cellule della frutta, attraverso l'interazione con vie ed enzimi coinvolti nella produzione di ROS e i meccanismi di *scavenging* che costituiscono essenzialmente il ciclo di base dei ROS. I rivestimenti a base di chitosano possono pertanto contrastare lo stress ossidativo riducendo la sovrapproduzione di ROS attraverso il potenziamento del sistema di difesa antiossidante, compresi i componenti enzimatici e non enzimatici che lavorano sinergicamente per migliorare la difesa cellulare nei frutti (Adiletta, 2021). Diversi studi hanno dimostrato un mantenimento dell'equilibrio del metabolismo dell'ossidazione intracellulare nei frutti rivestiti con chitosano grazie alla capacità di eliminare efficacemente i composti citotossici tramite antiossidanti enzimatici come catalasi, ascorbato perossidasi, glutatione perossidasi, monodeidroascorbato reductasi, deidroascorbato reductasi, glutatione reductasi e antiossidanti non enzimatici come glutatione ossidato, ascorbato, fenoli, antociani e flavonoidi.

I rivestimenti a base di chitosano agiscono come un film barriera sulla superficie del frutto che preserva il contenuto di antiossidanti non enzimatici durante la conservazione (Modesti, 2019). Precedenti studi hanno dimostrato che le capacità di barriera che controllano lo scambio di gas dei rivestimenti a base di chitosano causa una bassa permeabilità all'ossigeno nei frutti rivestiti e ciò porta all'inibizione dell'attività degli enzimi coinvolti nelle reazioni ossidative dei composti bioattivi (Kumar, 2017; Munhuweyi, 2017).

Un'ulteriore conferma dell'attività antiossidante è riscontrabile in altri studi che dimostrano che i rivestimenti a base di chitosano riducono il contenuto di malondialdeide (MDA), prodotto finale della perossidazione lipidica, indicatore della diminuzione dell'accumulo di ROS e dell'attività di lipossigenasi nei frutti in post-raccolta (Adiletta, 2021).

2.2.4 Attività di barriera

Le proprietà di barriera svolgono un ruolo importante nella conservazione dei prodotti alimentari, poiché una delle funzioni principali dei film di imballaggio è quella di separare gli alimenti dall'atmosfera circostante per ritardarne il deterioramento.

Le proprietà di barriera dei film vengono valutate quantitativamente esaminando il trasferimento, la diffusione e la permeabilità di film polimerici nei confronti di piccole

molecole come i gas (O_2 , N_2 , CO_2), vapori organici, vapore acqueo o liquidi. La valutazione della permeabilità al vapore acqueo (WVP) dei materiali da imballaggio biodegradabili ha ricevuto crescente attenzione negli ultimi anni dato il ruolo significativo dell'acqua nel favorire le reazioni di decadimento e nel determinare la freschezza e croccantezza degli alimenti. Pertanto, risulta importante che un materiale di confezionamento abbia un basso WVP.

I rivestimenti a base di chitosano modificano l'atmosfera che circonda il frutto agendo come barriere semipermeabili che controllano lo scambio di gas (C_2H_4 , CO_2 e O_2) (Jitareerat, 2007; Ali, 2011). Una bassa permeabilità all'ossigeno nei frutti rivestiti con chitosano porta all'inibizione dell'attività delle reazioni di ossidazione, responsabili dei cambiamenti di colore, odore e sapore degli alimenti, nonché della crescita di microrganismi e dell'imbrunimento enzimatico.

Tuttavia, i rivestimenti a base di chitosano, come molti altri film commestibili di polisaccaridi, hanno mostrato caratteristiche di barriera all'acqua relativamente basse a causa della loro elevata natura idrofila (Park, 2004; Aider 2010). Il WVP varia in base a una varietà di fattori come il peso molecolare, il grado di deacetilazione e la concentrazione di chitosano. Quindi, il fatto che i film di chitosano siano altamente permeabili al vapore acqueo ne limita l'uso poiché un controllo efficace del trasferimento dell'umidità è una proprietà desiderabile per la maggior parte degli alimenti, specialmente in ambienti umidi. Pertanto, sono state utilizzate diverse strategie per migliorare le proprietà fisiche dei film a base di chitosano e ovviare a questo problema, come per esempio l'incorporazione di materiali organici (ad esempio i polifenoli) per creare interazioni con il chitosano che limitino i contatti tra i suoi gruppi idrofili e l'acqua.

Infine, l'imballaggio di chitosano deve fornire una protezione dagli UV, proprietà molto richiesta dalle industrie alimentari per mantenere le caratteristiche nutrizionali del prodotto e ridurre al minimo lo scolorimento superficiale e gli odori sgradevoli prodotti dall'ossidazione dei lipidi causati dai raggi UV (Oladzadabbasabadi, 2022).

Capitolo III

APPLICAZIONE DI RIVESTIMENTI E FILM EDIBILI A BASE DI CHITOSANO SULLE FRAGOLE

Le fragole sono uno dei frutti economicamente più importanti al mondo, ma facilmente deperibili. Le fragole sono aclimateriche, suscettibili a lesioni meccaniche e deteriorabili a causa degli alti tassi di respirazione (Campaniello, 2008). La loro sottile buccia rende questi alimenti estremamente soggetti alla perdita di acqua ed all'attacco di batteri e funghi. Le principali infezioni fungine che colpiscono le fragole sono causate da *Botrytis cinerea* e *Rhizopus stolonifer*, che provocano l'alterazione di colore, consistenza e qualità e perdita post-raccolta (Mali, 2003; Peretto, 2014). Per migliorare la durabilità di questo prodotto possono essere applicati sulla sua superficie dei rivestimenti e film edibili composti da vari costituenti. Uno di essi può essere il chitosano. Generalmente le fragole non vengono trattate con rivestimenti formati esclusivamente da chitosano, ma da miscele di componenti che consentono di migliorarne le proprietà. Spesso viene utilizzato il glicerolo come plastificante per aumentare la resistenza del rivestimento alla permeazione dell'acqua e per migliorare l'elasticità (Pavinatto, 2020). Infatti, il glicerolo, poliolo idrofilo, riduce le interazioni inter-catena del chitosano, poiché si verificano preferibilmente tra gruppi OH del glicerolo e gruppi idrossilici o amminici del chitosano (Monte, 2018). Inoltre, i film e rivestimenti possono contenere oli essenziali o estratti di alcune sostanze che migliorano l'efficacia delle proprietà possedute dall'imballaggio di chitosano.

Nella letteratura sono presenti numerosi studi riguardanti le applicazioni sulle fragole di rivestimenti e film edibili a base di chitosano. Di seguito verranno riportati i risultati e le conclusioni tratti da alcuni di essi.

3.1 Attività antimicrobica

Sono stati condotti esperimenti su film a base di chitosano applicati tramite il metodo della colata (drop-casting) (Pavinatto, 2020). I film erano formati dall' 1% (p/p) del

polimero in una miscela di solventi contenente lo 0,5% (v/v) di acido acetico in acqua. Il chitosano possedeva un grado di deacetilazione del 78%, peso molecolare di 113 kDa. Inoltre, è stato aggiunto glicerolo utilizzato come agente plastificante nella proporzione del 30% (p/p) rispetto alla massa del chitosano. Le fragole ricoperte e non ricoperte conservate all'interno di scatole a una temperatura controllata di circa 25 °C sono state osservate visivamente per una settimana e sono stati valutati vari parametri. I risultati mostrano che i rivestimenti commestibili a base di chitosano studiati hanno un grande potenziale per l'applicazione come imballaggi edibili, poiché prolungano la durata di conservazione del frutto e sono stati ben accettati dai consumatori. Per quanto riguarda l'attività biologica di chitosano/glicerolo al 30% (Chi/30% Gly), essa è stata osservata in un terreno agar-agar dopo 1 giorno di inoculazione contenente *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* ed *Escherichia Coli*. È stato possibile riscontrare la presenza di zone di inibizione in tutti i saggi, i cui valori medi sono risultati rispettivamente di 35, 38,3 e 35,3 mm per l'inibizione di *S. aureus*, *E. coli* e *B. cereus*. Oltre alle sue proprietà battericide, il chitosano presenta anche proprietà antimicotiche. Infatti, 7 giorni dopo l'applicazione del film è stato possibile osservare chiaramente che la fragola non rivestita era completamente assorbita dai funghi, mentre la fragola rivestita non mostrava manifestazioni fungine (Fig. 3.1). Dunque, le fragole ricoperte con film di Chi/30%Gly hanno mostrato resistenza all'attacco di *Botrytis cinerea* e di batteri e un'alterazione insignificante nel loro sapore, aspetto, aroma e consistenza. In altre parole, il film di chitosano ha protetto la fragola dall'attacco di questi microrganismi, mostrando il suo potenziale come rivestimento edibile per le fragole.

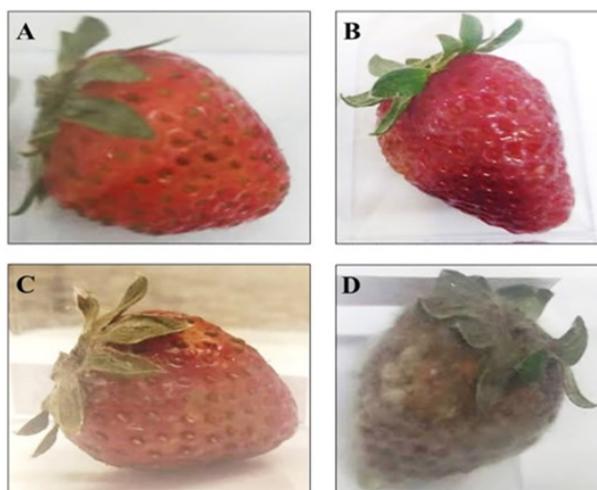


Fig.3.1. Fotografie di fragola A) rivestita con film Chi/30%Gly al giorno 0; B) non rivestita al giorno 0; C) rivestita con film Chi/30%Gly al giorno 7; D) non rivestita al giorno 7.

In un altro studio è stato utilizzato chitosano all'81,0% di grado di deacetilazione con diversi pesi molecolari (5, 19, 61 kDa) (Jang, 2020). Il chitosano è stato sciolto in una soluzione di acido acetico (0,5%, p/p) per preparare una soluzione di chitosano all' 1 e 2% (p/p). Successivamente sono stati aggiunti alla soluzione il 30% di glicerolo (p/p Chi) come plastificante e il 5% di tween 80 (p/p Chi), un polisorbato comunemente usato come tensioattivo ed emulsionante. Infine, la soluzione di chitosano è stata spruzzata sulle superfici delle fragole utilizzando uno spruzzatore elettrostatico. I risultati hanno mostrato effetti antibatterici e antimicotici senza differenza tra i diversi pesi molecolari (Fig. 3.2). Il numero di questi microrganismi nei campioni è aumentato in modo sostenibile nel tempo, ma i campioni rivestiti con chitosano presentavano valori più bassi (CFU/g) di muffe rispetto a quelli non rivestiti. Come mostrato in Fig. 3.2, il rivestimento di chitosano con 19 kDa ha dimostrato un'inibizione più forte della crescita di muffe entro i primi 5 giorni. Un conteggio di 10^6 CFU/g per lieviti, muffe o batteri totali è considerato il limite di accettazione per i prodotti a base di frutta. Come si può osservare dalla Fig. 3.2, dopo 11 giorni la conta delle muffe dei campioni non rivestiti ha raggiunto 6,65 log CFU/g e quindi i parametri di qualità dei campioni non rivestiti non sono stati più misurati dopo questo periodo. Invece, la conta delle muffe dei campioni rivestiti dava valori $<6,17$ log CFU/g entro 13 giorni e dopo 15 giorni è arrivata a 6,31–6,48 log CFU/g, ma non sono state osservate differenze significative tra i campioni.

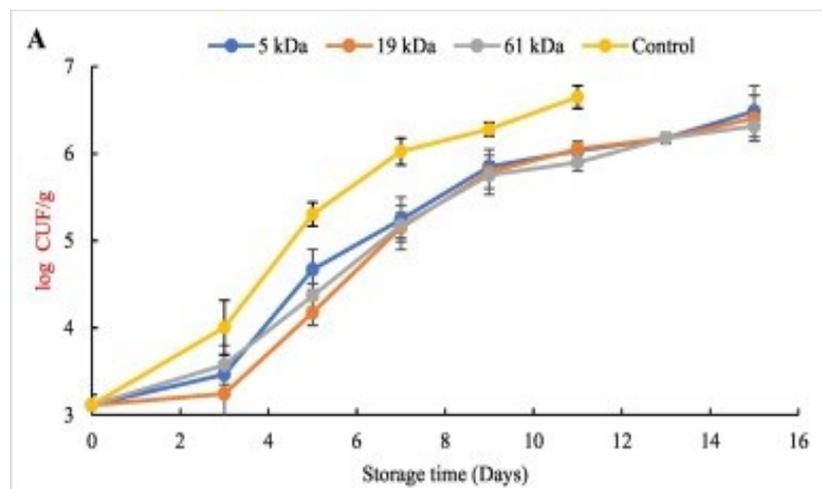


Fig. 3.2. Cambiamenti di crescita della muffa in fragole rivestite con chitosano con diversi PM.

Dunque, lo studio dimostra l'attività antimicrobica del rivestimento a base di chitosano evidenziando che questa proprietà non è correlata con il peso molecolare del polimero.

Secondo Wang (2022) per implementare ulteriormente le capacità antimicrobiche si possono impiegare oli essenziali. In particolare, in questo studio sono stati utilizzati film di chitosano contenenti olio essenziale di foglie di *Perilla frutescens* (PFEO) a diverse concentrazioni per il confezionamento di fragole infettate da *B. cinerea* durante la conservazione refrigerata a 4 °C per 10 giorni. Il chitosano è stato disciolto in una soluzione acquosa di acido acetico (0,5%, v/v) per preparare la soluzione di chitosano (2,0%, p/v) e sono stati aggiunti tween 80 (0,2%, v/v) come emulsionante, glicerolo come plastificante ed infine PFEO alle concentrazioni 0,0%, 0,2%, 0,6% e 1,0% (v/v). Da questo studio si è potuto evincere, come mostrato dalla Fig.3.3, la differenza tra i frutti rivestiti e non dal punto di vista dell'infezione fungina. In particolare, è osservabile che dopo 10 giorni di conservazione l'efficacia nel diminuire la crescita di *B. cinerea* cresce all'aumentare della quantità di PFEO, con risultati più evidenti per film di chitosano con PFEO all'1,0%.

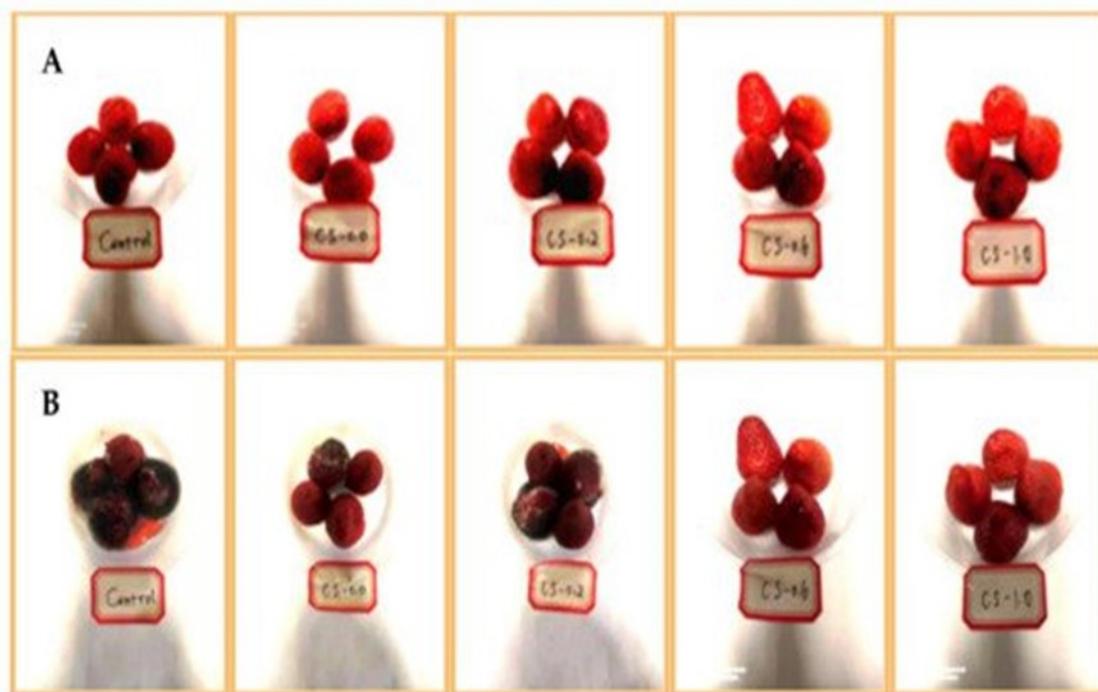


Figura 3.3. Fotografie di fragole durante la conservazione in frigorifero. (A): giorno 0, (B) giorno 10. Controllo, fragole confezionate senza film CS; CS-0.0, fragole confezionate con film CS CS-0.0; CS-0.2, fragole confezionate con film CS CS-0.2; CS-0.6, fragole confezionate con film CS CS-0.6; CS-1.0, fragole confezionate con film CS CS-1.0.

Possono essere aggiunti anche altri componenti. Infatti, secondo uno studio recentissimo l'aggiunta di estratti di curcuma (TU) e tè verde (GT) sembra migliorare l'attività

antimicrobica del rivestimento a base di chitosano (Yang, 2022). In questo studio è stato utilizzato un film di chitosano preparato mescolando chitosano (2% p/v) in una soluzione acquosa di acido acetico (1%, v/v), aggiungendo il glicerolo (30%, p/p Chi) come plastificante ed infine applicando diverse concentrazioni di estratti di curcuma e tè verde 1%, 3% e 5% v/v (di seguito indicati rispettivamente come CTU1, CTU3, CTU5, CGT1, CGT3, CGT5 e GTU5GT5). Il trattamento delle fragole con CTU5 e CTU5GT5 ha fortemente inibito la proliferazione di *B. cinerea* (Fig. 3.4). Nelle fragole non ricoperte, i sintomi sono stati rilevati nel 25% dei frutti dopo 4 giorni, ma dopo 10 giorni tutti hanno mostrato sintomi della fitopatìa da muffa grigia. Il trattamento delle fragole con chitosano (CS) e CGT5 ha ritardato la comparsa dei sintomi, osservando rispettivamente una percentuale di decadimento del 13% e del 10% dopo 5 giorni di conservazione. Il trattamento con CTU5 e CTU5GT5 ha inibito molto di più la comparsa di *B. cinerea*: dopo 14 giorni, le fragole sane erano il 45% per il trattamento con CTU5 e il 65% per quello con CTU5GT5, indicando che l'aggiunta di estratto di curcuma al rivestimento può ritardare i sintomi della muffa grigia in modo più efficace rispetto all'aggiunta di estratto di tè verde. Inoltre, come si può osservare in Fig.3.4, l'aggiunta di entrambi gli estratti ha avuto un effetto migliorativo sull'attività inibitoria rispetto all'aggiunta di solamente uno dei due estratti.

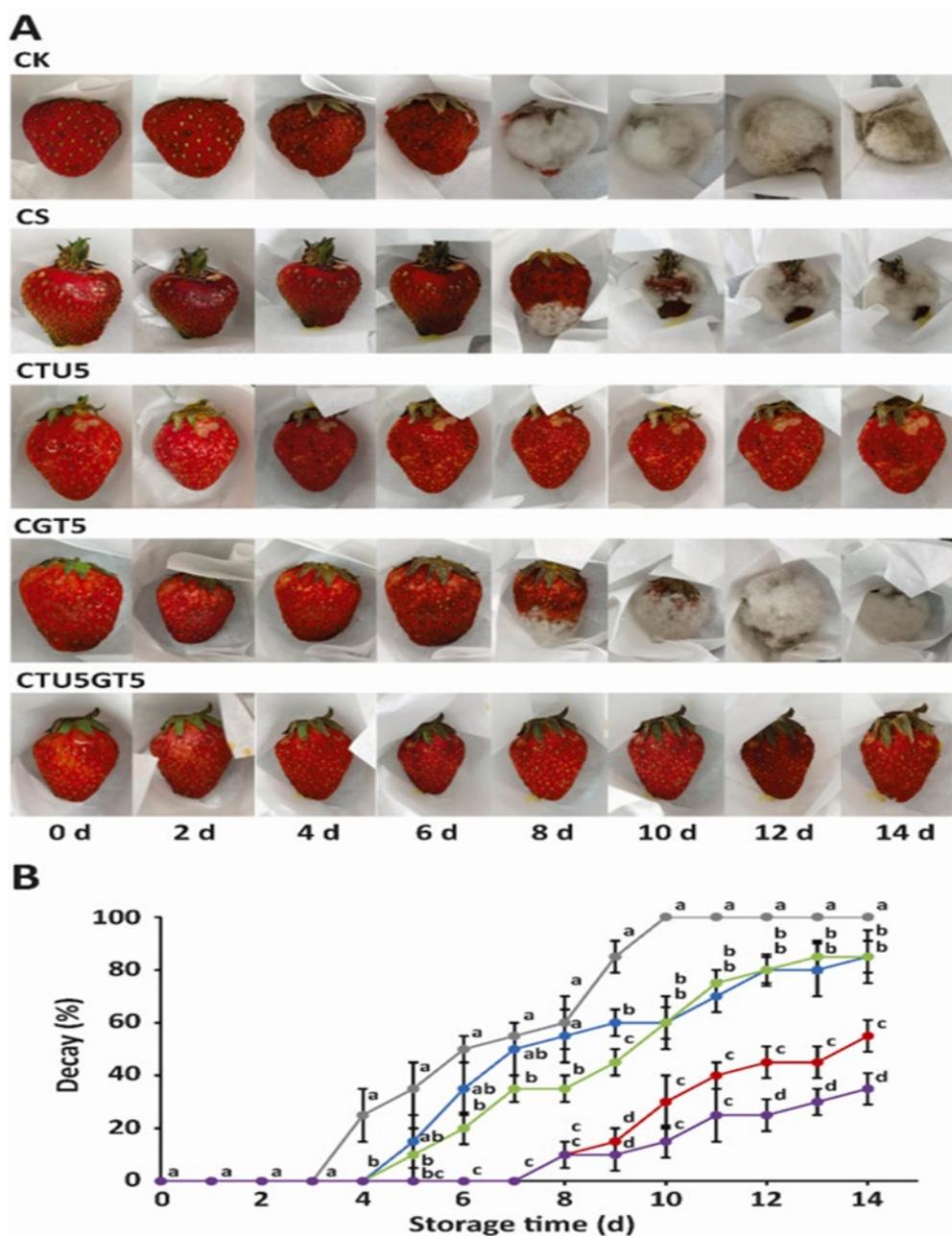


Fig. 3.4. Attività inibitoria dei rivestimenti di chitosano contenenti estratti di curcuma (TU) e tè verde (GT) contro la *B. cinerea*. Sono stati effettuati cinque esperimenti paralleli: 1. fragole non rivestite (CK; linea grigia), 2. rivestimento con film di chitosano (CS; linea blu), 3. rivestimento con film di chitosano contenente il 5% di estratto di curcuma (CTU5; linea rossa), 4. rivestimento con film di chitosano contenente il 5% di estratto di tè verde (CGT5; linea verde) e 5. rivestimento con film di chitosano contenente il 5% di estratto di curcuma e il 5% di estratto di tè verde (CTU5GT5; linea viola). (A) Immagini di fragole in post-raccolta e sintomi di decomposizione causati da *B. cinerea*. (B) Percentuale di decadimento. I dati sono stati espressi come media \pm DS con $n = 30$. I valori seguiti da diverse lettere minuscole nella stessa riga sono significativamente diversi l'uno dall'altro ($P < 0,05$).

3.2 Perdita di peso e consistenza

La perdita di peso della fragola è un indice importante che riflette la frequenza respiratoria e l'evaporazione dell'umidità tra il tessuto del frutto e l'aria circostante. I rivestimenti edibili a base di chitosano fungono da barriera formando uno strato semipermeabile sulla superficie del frutto che riduce le perdite di traspirazione. Durante la conservazione post-raccolta si verificano cali significativi della consistenza dei frutti a causa di cambiamenti biochimici nel turgore cellulare e nella struttura e composizione dei polisaccaridi della parete cellulare (Hernández-Muñoz, 2008). I frutti della fragola diventano più morbidi quando la lamella mediana si degrada e la pectina diminuisce durante la conservazione post-raccolta (Tai e Melton, 2002). Pertanto, il declino della fermezza è spesso considerato un segnale di declino della qualità o di attacco microbico.

I risultati di Jiang (2020), come si osserva in Fig.3.5, hanno dimostrato che i rivestimenti di chitosano sulla fragola possono ritardare significativamente la perdita di peso rispetto ai campioni non rivestiti.

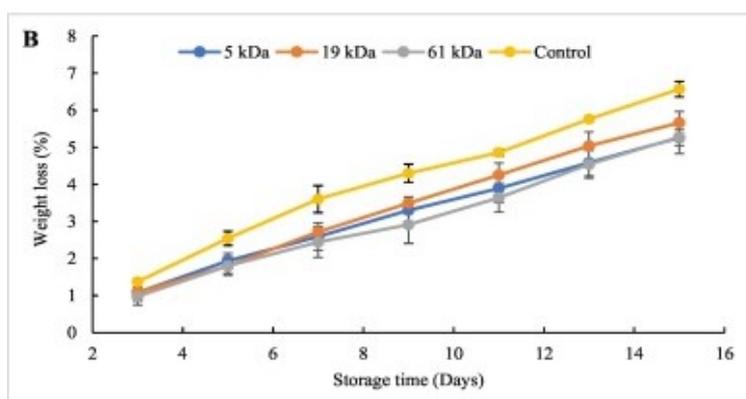


Fig.3.5. I cambiamenti di perdita di peso delle fragole ricoperte da chitosano con diversi PM.

Le fragole sono altamente suscettibili a una rapida perdita di acqua a causa della buccia estremamente sottile. Dunque, la perdita di peso di tutti i campioni rivestiti ha mostrato una tendenza all'aumento lineare durante la conservazione. Tuttavia, il rivestimento di chitosano sulla superficie della fragola ha agito come una barriera semipermeabile contro gas e acqua, riducendo così la respirazione e la perdita di acqua e contrastando la disidratazione e il restringimento del frutto. I valori di perdita di peso delle fragole ricoperte da chitosano con 5, 19 e 61 kDa erano rispettivamente del 5,26%, 5,66% e 5,28% dopo 15 giorni di conservazione.

In aggiunta, sempre questo studio ha dimostrato che il rivestimento di chitosano inibiva significativamente l'ammorbidimento della fragola, principalmente grazie alle capacità di barriera all'ossigeno e al vapore acqueo del chitosano che ritardavano l'attività metabolica e la perdita di acqua. Lo stesso rivestimento di chitosano aveva una buona resistenza meccanica sulla superficie della fragola e poteva rallentare il degrado della struttura. Come mostrato in Fig. 3.6, non sono state osservate differenze evidenti di perdite di consistenza tra fragole ricoperte con diversi pesi molecolari alla fine dello stoccaggio.

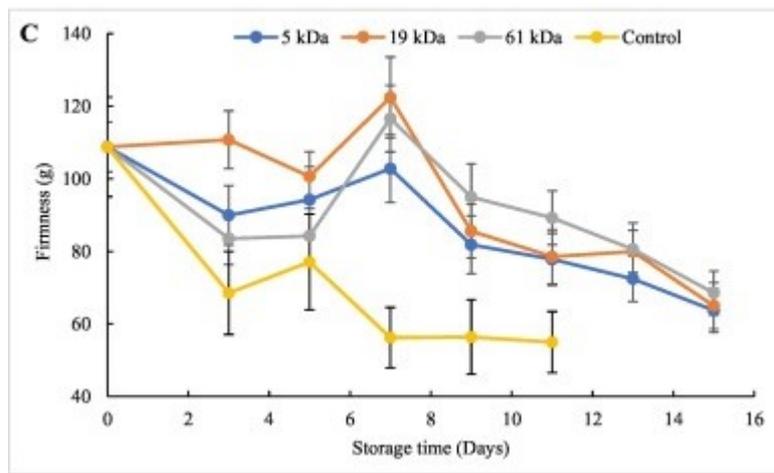


Fig.3.6. Consistenza delle fragole ricoperte da chitosano con diversi PM.

È stato anche studiato un rivestimento composto da chitosano (grado di deacetilazione del 70–85% ; peso molecolare da 100 a 300kDa) con l'aggiunta di acido ascorbico (Saleem, 2021). Come nei casi precedentemente descritti, anche questo rivestimento ha come componenti aggiuntive l'acido acetico, per migliorare la solubilità in acqua distillata, e il glicerolo come plastificante. Dopo 5 giorni, è stata osservata una perdita di peso significativamente inferiore nei frutti trattati con chitosano e chitosano con acido ascorbico e tale tendenza è continuata fino al giorno 15. Complessivamente, la massima perdita di peso è stata registrata nei frutti non rivestiti.

3.3 Contenuto di flavonoidi della fragola

I flavonoidi sono un gruppo importante nella famiglia dei composti fenolici con attività antiossidante e biologica.

Si è visto che il rivestimento a base di chitosano ritarda la riduzione dei flavonoidi della fragola durante la conservazione rispetto ai campioni non rivestiti (Jang, 2020). Infatti, dopo 11 giorni il contenuto di flavonoidi della fragola non rivestita è diminuito del 40,18%, mentre i valori dei campioni rivestiti con chitosano sono diminuiti dal 18,24 al 30,92% con un peso molecolare più elevato che sembrava più efficace. In particolare il chitosano con 61 kDa manteneva meglio il contenuto di flavonoidi come si può osservare nella Fig. 3.7.

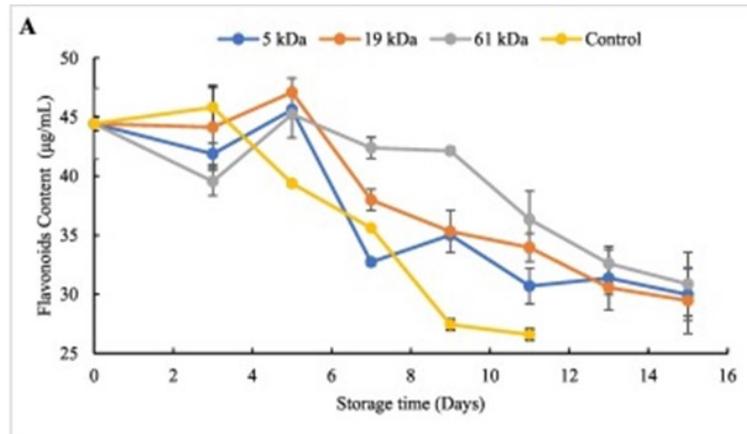


Fig. 3.7. Cambiamenti del contenuto di flavonoidi in fragole ricoperte da chitosano.

Inoltre, lo studio di Yang (2022) ha dimostrato che rivestimenti contenenti estratti di tè verde o curcuma o la combinazione di entrambi aumenta il contenuto fenolico. Le variazioni più evidenti sono state osservate 4 giorni dopo il trattamento, con incrementi del 10%, 53% e 48% utilizzando rispettivamente CTU5, CGT5 e CTU5GT5.

3.4 Stress ossidativo

I rivestimenti a base di chitosano hanno dimostrato in diversi studi la capacità di ridurre lo stress ossidativo nei prodotti alimentari svolgendo un'azione antiossidante.

3.4.1 Attività della superossido dismutasi

La superossido dismutasi (SOD) è un enzima metallo-dipendente che ha la funzione di neutralizzare i radicali liberi superossidi.

Il rivestimento a base di chitosano favorisce l'attività della SOD nella frutta fresca, ritardando la senescenza post-raccolta mediante l'eliminazione dei ROS (Fig. 3.8) (Jang,

2020). Infatti, l'attività della SOD gioca un ruolo importante nello *scavenging* delle specie reattive dell'ossigeno, essendo il primo enzima di *scavenging* dei ROS che catalizza la dismutazione dell'ossigeno tossico (superossido radicale) in perossido di idrogeno e ossigeno molecolare.

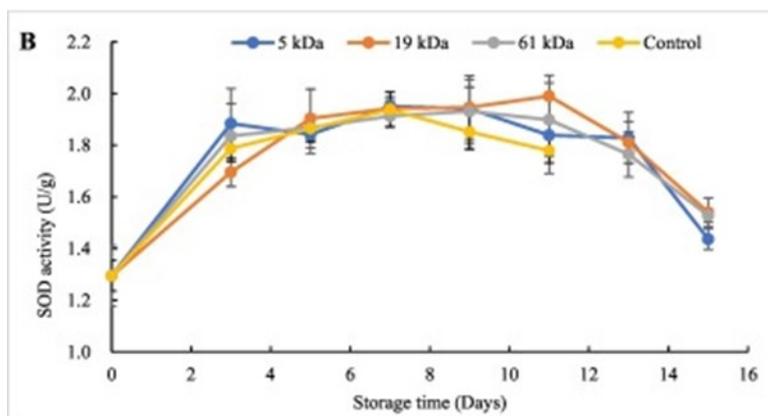


Fig. 3.8. Cambiamenti dell'attività della SOD in fragole ricoperte da chitosano con diversi PM.

Inoltre, l'incorporazione di acido ascorbico catalizza le attività degli enzimi di *scavenging* dei ROS come la SOD (Saleem, 2021). In aggiunta, l'aggiunta, l'aggiunta di estratti di tè verde migliora gli effetti sulla capacità antiossidante del rivestimento edibile (Yang, 2022).

3.4.2 Contenuto di malondialdeide della fragola

La malondialdeide (MDA) è il prodotto finale della perossidazione lipidica delle membrane ed è considerato un indicatore importante per giudicare il danno ossidativo nei tessuti vegetali. L'MDA viene utilizzato come misura della perdita di integrità della membrana in risposta allo stress ossidativo in post-raccolta.

Si è osservato che dopo 9 giorni il rivestimento di chitosano ritarda notevolmente la produzione di MDA nelle fragole (Jiang, 2020). Inoltre, al giorno 11 l'MDA dei campioni non rivestiti è aumentato del 162%, mentre i valori dei campioni rivestiti con 5, 19 e 61 kDa sono aumentati rispettivamente del 108%, 114% e 96% (Fig. 3.9).

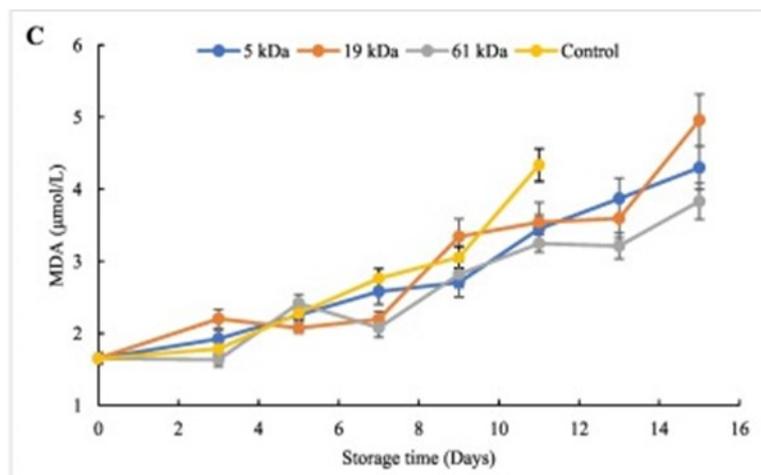


Fig. 3.9. Cambiamenti del contenuto di MDA in fragole ricoperte da chitosano.

Il ridotto accumulo di MDA nei campioni rivestiti ha suggerito che il chitosano può essere promettente per prevenire il danno ossidativo. Infatti, il rivestimento di chitosano regola le attività di enzimi antiossidanti, diminuendo quindi la perossidazione lipidica. Per quanto concerne il peso molecolare del rivestimento è stato osservato che dopo l'undicesimo giorno il contenuto di MDA era inferiore nel campione con PM 61 kDa rispetto a 5 e 19 kDa.

Degno di nota è anche il fatto che il contenuto di MDA sia significativamente più basso nei frutti trattati con chitosano e chitosano con acido ascorbico rispetto al controllo (Saleem, 2021). In particolare, il rivestimento con l'aggiunta dell'acido organico vede una significativa inibizione della produzione di MDA al giorno 15 (Fig. 3.10).

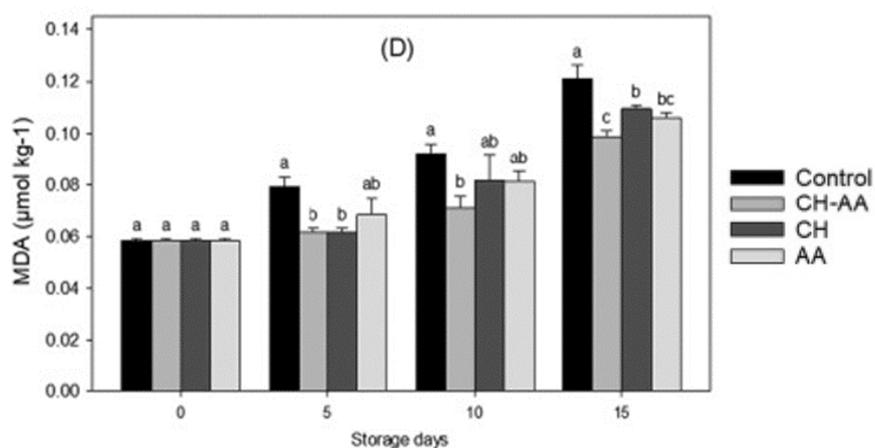


Fig.3.10. Influenza del chitosano insieme all'acido ascorbico sulla malondialdeide nelle fragole. Le barre di errore mostrano gli errori standard dei mezzi (3 repliche).

3.5 Solidi solubili totali e acidità titolabile

I solidi solubili totali (SST) sono uno dei parametri più importanti che influenzano la qualità della frutta e l'accettabilità da parte del consumatore. Questo valore tende ad aumentare durante il periodo di conservazione a causa dell'idrolisi dei polisaccaridi della parete cellulare, della scomposizione dell'amido in zuccheri solubili e dell'aumento della sostanza secca dovuto alla perdita di acqua. I rivestimenti a base di chitosano permettono di contenere l'aumento dei SST durante la *shelf-life* in quanto provocano cambiamenti a livello dell'atmosfera interna del frutto, con una riduzione del livello di O₂ e/o un aumento del livello di CO₂, che diminuisce la frequenza respiratoria e l'attività metabolica. Vi è inoltre soppressione della produzione di etilene.

Il contenuto di SST dei frutti rivestiti e non rivestiti aumenta gradualmente durante la conservazione (Saleem, 2021). L'aumento massimo del contenuto di SST è stato riscontrato nei frutti non trattati (da 7,3 a 8,5 °Brix), mentre per quanto riguarda i frutti rivestiti con solo chitosano o con chitosano e acido ascorbico il contenuto di SST veniva mantenuto da 7,3 a 8,1 e 8,0 °Brix, rispettivamente. Inoltre, il chitosano è una barriera protettiva contro la perdita d'acqua e quindi aiuta a mantenere il SST nei frutti.

L'acidità titolabile (AT) è una componente importante della qualità organolettica del frutto ed è diversa in ogni cultivar. L'AT stima il contenuto di acido organico dei frutti carnosì. Nella fragola, i principali acidi organici sono l'acido citrico e malico. L'AT ha la tendenza a diminuire con l'aumento dei giorni di conservazione, indipendentemente dai trattamenti. Tuttavia, i frutti non rivestiti hanno mostrato un rapido calo di AT rispetto ai frutti rivestiti (Saleem, 2021).

Complessivamente, i frutti trattati con chitosano e acido ascorbico hanno mantenuto un AT significativamente più alto dopo 15 giorni di durata di conservazione rispetto al controllo. L'AT si correla direttamente con il contenuto di acidi citrico e malico. Un calo generale degli acidi organici può essere prevedibile a causa di cambiamenti metabolici nei frutti o per il consumo di acidi organici come substrati durante la respirazione. Quindi, la riduzione di questi processi da parte del rivestimento di chitosano porta ad un tasso di perdita di AT ridotto.

Un altro fattore importante per quanto riguarda la qualità è il rapporto SST/AT (indice di maturazione), in quanto è fondamentale nella valutazione dell'armonia del sapore della frutta e l'accettabilità del consumatore.

L'indice di maturazione mostra un progressivo aumento dal giorno 5 al giorno 15 in tutti i trattamenti (Saleem, 2021). Tuttavia, il massimo aumento dell'indice di maturazione è stato osservato nei frutti di fragola non ricoperti rispetto agli altri trattati. Infatti, dopo 15 giorni le fragole ricoperte con chitosano e acido ascorbico hanno mostrato un aumento dell'indice di maturazione notevolmente inferiore (1,13 volte) rispetto al controllo non trattato.

Inoltre, anche con l'aggiunta di PFEO al rivestimento a base di chitosano i parametri SST, AT ed indice di maturazione delle fragole con i rivestimenti sono migliori. In particolare, per le fragole del gruppo trattato con rivestimento a base di chitosano con l'aggiunta dell'1% di PFEO i valori dei solidi solubili totali e l'indice di maturazione sono stati ridotti di molto al giorno 10 (Fig. 3.11). Infatti, al giorno 10 i valori di SST nel controllo risultano essere del 8,13%, mentre nelle fragole trattate del 6,74%, i valori di AT per il controllo 0,72 e per i frutti rivestiti 0,77 ed infine l'indice di maturazione nel controllo risulta 11,54 e nelle fragole con chitosano e PFEO 8,32 (Wang, 2022).

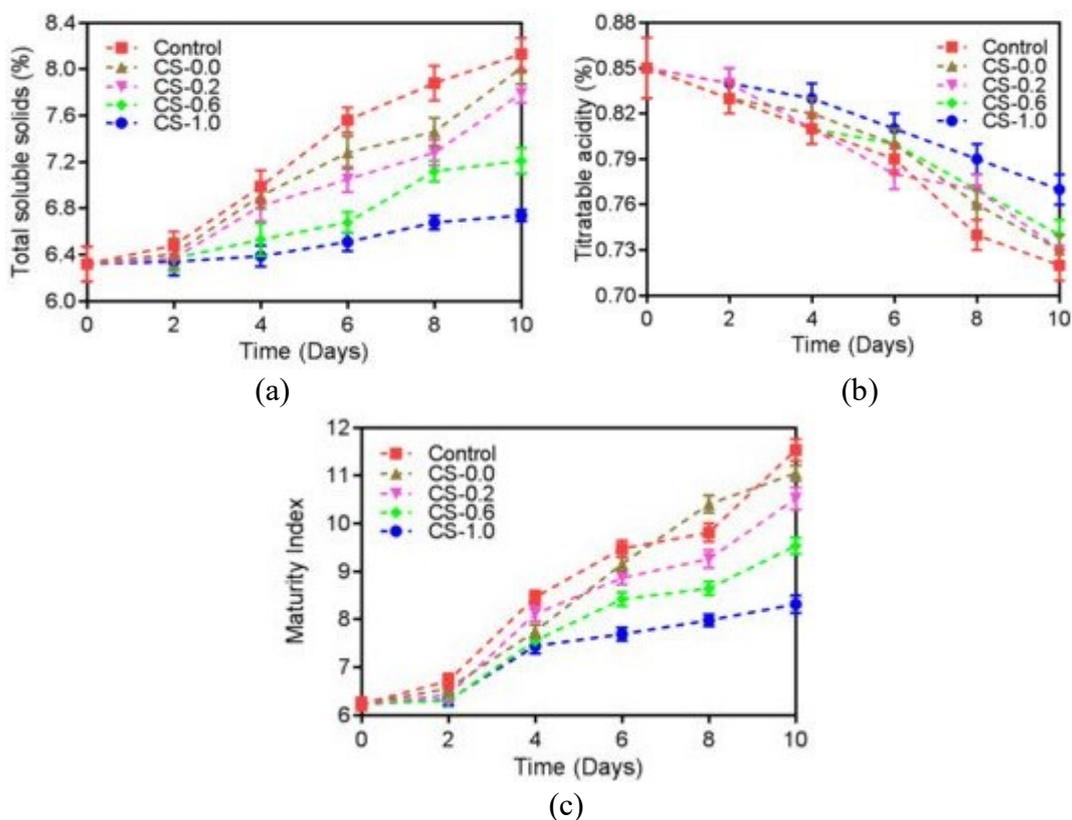


Figura 3.11. Valori di acidità titolabile (a), solidi solubili totali (b) e indice di maturità (c) delle fragole durante la conservazione in frigorifero (10 giorni). Controllo, fragole confezionate senza film CS; CS-0.0, fragole confezionate con film CS CS-0.0; CS-0.2, fragole confezionate con film CS CS-0.2; CS-0.6, fragole confezionate con film CS CS-0.6; CS-1.0, fragole confezionate con film CS CS-1.0.

CONCLUSIONE E PROSPETTIVE FUTURE

I film e i rivestimenti edibili a base di chitosano hanno dimostrato grandi potenzialità per l'applicazione nel campo del packaging alimentare, poiché permettono di prolungare la *shelf-life* dei prodotti alimentari. In particolare per quanto riguarda le fragole, è stata dimostrata l'efficacia come imballaggio ottenendo come risultati un'attività battericida e antimicotica, una riduzione della perdita d'acqua, di consistenza e dei composti fenolici e una protezione dallo stress ossidativo.

Tuttavia, sono necessari molti sforzi per sviluppare film a base di chitosano che possano soddisfare i criteri pratici e competere con i film per imballaggio a base di petrolio.

La mancanza di prove su commestibilità, biodegradabilità, effetti tossicologici e sulla salute, il marketing inadeguato, la mancanza di consapevolezza e le questioni culturali, possono influenzare l'accettazione da parte dei consumatori. La ricerca futura deve affrontare tutti questi problemi al fine di rendere i film e rivestimenti edibili industrialmente fattibili e di successo commerciale.

Inoltre, l'attuale produzione su scala di laboratorio di film commestibili presenta problemi come l'impossibilità di produrre film continui, lunghi tempi di asciugatura e controllo dello spessore impreciso, che devono essere affrontati prima dell'aumento della produzione industriale. Gli sviluppi dovrebbero focalizzarsi su come queste tecnologie possano essere ottimizzate o combinate con altre vantaggiose per avvicinarsi alla produzione industriale.

Dunque, sebbene i film e i rivestimenti edibili a base di chitosano debbano affrontare molte sfide per realizzarne l'uso pratico, si prospetta un futuro promettente nell'ambito del packaging alimentare.

BIBLIOGRAFIA

- Abhinaya, M.; Parthiban, R.; Kumar, P.S. & Vo, D.V.N. (2021). A review on cleaner strategies for extraction of chitosan and its application in toxic pollutant removal. *Environmental Research*, 196.
- Adiletta G.; Di Matteo, M. & Petriccione, M. (2021). Multifunctional Role of Chitosan Edible Coatings on Antioxidant Systems in Fruit Crops: A Review. *Int. J. Mol. Sci.*, 22(5).
- Ahmad, S.I.; Ahmad, R.; Khan, M.S.; Kant, R.; Shahid, S.; Gautam, L.; Hasan, G.M. & Hassan, M.I. (2020). Chitin and its derivatives: Structural properties and biomedical applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 526-539.
- Aider, M. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: review. *LWT Food Sci Technol.*, 43 (6), 837–842.
- Ali, A.; Muhammad, M.T.M.; Sijam, K. & Siddiqui, Y. Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica papaya* L.) fruit during cold storage. *Food Chem.*, 124, 620–626.
- Alkan, D. (2013). Development of novel bio-based methods for inhibition of plant pathogens. *Izmir Institute of Technology*.
- Andrade, R.D.; Skurtys, O. & Osorio, F.A. (2012). Atomizing Spray Systems for Application of Edible Coatings. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11 (3), 323-337.
- Arancibia, M.; Giménez, B.; López-Caballero, M.; Gómez-Guillén, M. & Montero, P. (2014). Release of cinnamon essential oil from polysaccharide bilayer films and its use for microbial growth inhibition in chilled shrimps. *LWT-Food Science and Technology*, 59 (2), 989-995.
- Atieno, L.; Owino, W.; Ateka, E.M. & Ambuko, J. (2019). Influence of coating application methods on the postharvest quality of Cassava. *International Journal of Food Science*, 1-17.
- Atta, M.; Manan, S.; Shahzad, A.; Ul-Islam, M.; Ullah, M.W. & Yang, G. (2022). Biobased materials for active food packaging: A review. *Food Hydrocolloids*, 125, Article 107419.
- Bakshi, P.S.; Selvakumar, D.; Kadirvelu, K. & Kumar, N.S. (2020). Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 150, 1072-1083.
- Benítez, S.; Achaerandio, I.; Pujolà, M. & Sepulcre, F. (2015). Aloe vera as an alternative to traditional edible coatings used in fresh-cut fruits: a case of study with kiwifruit slices. *LWT - Food Sci. Technol.*, 61, 184-193.
- Bermúdez-Oria, A.; Rodríguez-Gutiérrez, G.; Rubio-Senent, F.; Fernández-Prior, Á. & Fernández-Bolaños, J. (2019) Effect of edible pectin-fish gelatin films containing the olive antioxidants hydroxytyrosol and 3, 4-dihydroxyphenylglycol on beef meat during refrigerated storage. *Meat Science*, 148, 213-218.

- Broumand, A.; Emam-Djomeh, Z.; Hamed, M. & Razavi, S.H. (2011). Antimicrobial, water vapour permeability, mechanical and thermal properties of casein based Zataria multiflora Boiss. Extract containing film. *LWT-Food Science and Technology*, 44 (10), 2316-2323.
- Bull, S.E.; Ndunguru, J.; Grisse, W.; Beeching, J.R. & Vanderschuren, H. (2011). Cassava: Constraints to production and the transfer of biotechnology to African laboratories. *Plant Cell Reports*, 30 (5), 779-787.
- Calva-Estrada, S.J.; Jiménez-Fernández, M. & Lugo-Cervantes, E. (2019). Protein-based films: Advances in the development of biomaterials applicable to food packaging. *Food Engineering Reviews*, 11 (2), 78-92.
- Campaniello, D.; Bevilacqua, A.; Sinigaglia, M. & Corbo, M.R. (2008). Chitosan: antimicrobial activity and potential applications for preserving minimally processed strawberries. *Food Microbiol*, 25, 992–1000.
- Cazón, P. & Vázquez, M. (2019). Applications of Chitosan as Food Packaging Materials. *Springer International Publishing*, 81-123.
- Cazón, P. & Vázquez, M. (2019). Applications of chitosan as food packaging materials.
- 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.
- Cecchini, J.P.; Spotti, M.J.; Piagentini, A.M.; Milt, V.G. & Carrara, C.R. (2017). Development of edible films obtained from submicron emulsions based on whey protein concentrate, oil/beeswax and brea gum. *Food Science and Technology International*, 23 (4), 371-381.
- Chakravartula, S.S.N.; Soccio, M.; Lotti, N.; Balestra, F.; Dalla Rosa, M. & Siracusa, V. (2019). Characterization of composite edible films based on pectin/alginate/whey protein concentrate. *Materials*, 12 (15), 1-19.
- Chandra, R.K. (1997). Food hypersensitivity and allergic disease: A selective review. *American Journal of Clinical Nutrition*, 66 (2), 526S-529S.
- Chen, H.; Wang, J.; Cheng, Y.; Wang, C.; Liu, H.; Bian, H.; Pan, Y.; Sun, J. & Han, W. (2019). Application of protein-based films and coatings for food packaging: A review. *Polymers*, 11 (12), 1-32.
- Confederat, L.G.; Tuchilus, C.G.; Dragan, M.; Sha'at, M.; Dragostin, O.M. (2021). Preparation and Antimicrobial Activity of Chitosan and Its Derivatives: A Concise Review. *Molecules*, 26(12), Article 3694.
- Costa, C.; Conte, A. & Del Nobile, M.A. (2014). Effective preservation techniques to prolong the shelf life of ready-to-eat oysters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 2661-2667.
- Debeaufort, F. & Voilley, A. (2009). Lipid-Based Edible Films and Coatings. *Edible Films and Coatings for Food Applications*, 135–168.
- Dhall, R. (2013) Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53 (5), 435-450.
- Eaton, P.; Fernandes, J.C.; Pereira, E.; Pintado, M.E.; Malcata, F.X. (2008). Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Ultramicroscopy*, 108, 1128–1134.

- 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.
- Erdem, B.G.; Diblan, S. & Kaya, S. (2019). Development and structural assessment of whey protein isolate/sunflower seed oil biocomposite film. *Food and Bioproducts Processing*, 118, 270-280.
- Espitia, P.J.; Avena-Bustillos, R.J.; Du, W.X.; Chiou, B.S.; Williams, T.G.; Wood, D.; McHugh, T.H. & Soares, N.F.F. (2014). Physical and antibacterial properties of açai edible films formulated with thyme essential oil and apple skin polyphenols. *Journal of Food Science*, 79 (5), 903-910.
- Fabra, M.J.; Talens, P.; Gavara, R. & Chiralt, A. (2012). Barrier properties of sodium caseinate films as affected by lipid composition and moisture content. *Journal of Food Engineering*, 109 (3), 372-379.
- Fakhouri, F.M.; Costa, D.; Yamashita, F.; Martelli, M.; Jesus, R.C.; Alganer, K.; Collares-Queiroz, F.P. & Innocentini-Mei, L.H. (2013). Comparative study of processing methods for starch/gelatin films. *Carbohydrate Polymers*, 95 (2), 681-689.
- Fisk, C.L.; Silver, A.M.; Strik, B.C. & Zhao, Y. (2008). Postharvest quality of hardy kiwifruit (*Actinidia arguta* 'Ananasnaya') associated with packaging and storage conditions. *Postharvest Biol. Technol.*, 47, 338-345.
- Flórez, M.; Guerra-Rodríguez, E.; Cazón, P. & Vázquez, M. (2022). Chitosan for food packaging: Recent advances in active and intelligent films. *Food Hydrocolloids*, 124, Article 107328.
- Flórez, M.; Guerra-Rodríguez, E.; Cazón, P.; Vázquez, M. (2022). Chitosan for food packaging: Recent advances in active and intelligent films. *Food Hydrocolloids*, 124, Article 107328.
- Fortunati, E.; Giovanale, G.; Luzi, F.; Mazzaglia, A.; Kenny, J.M.; Torre, L. & Balestra, G.M. (2017). Effective postharvest preservation of kiwifruit and romaine lettuce with a chitosan hydrochloride coating. *Coatings*, 7.
- Galgano, F. (2015). Biodegradable packaging and edible coating for fresh-cut fruits and vegetables. *Italian Journal of Food Science*, 27 (1), 1-20.
- Galgano, F.; Condelli, N.; Favati, F.; Di Bianco, V.; Perretti, G. & Caruso, M.C. (2015). Biodegradable packaging and edible coating for fresh-cut fruits and vegetables. *Ital. J. Food Sci.*, 27, 1-20.
- Galus, S. & Kadzińska, J. (2015). Food applications of emulsion-based edible films and coatings. *Trends in Food Science & Technology*, 45 (2), 273-283.
- Galus, S. & Lenart, A. (2019). Optical, mechanical, and moisture sorption properties of whey protein edible films. *Journal of Food Process Engineering*, 42 (6), 1-10.
- Garavand, F.; Cacciotti, I.; Vahedikia, N.; Salara, A.R.; Tarhan, Ö.; Akbari-Alavijeh, S.; Shaddel, R.; Rashidinejad, A.; Nejatian, M.; Jafarzadeh, S.; Azizi-Lalabadi, M.; Khoshnoudi-Nia, S. & Jafari, S.M. (2020). A comprehensive review on the nanocomposites loaded with chitosan nanoparticles for food packaging. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-34.
- Han, J.H. (2014). A review of food packaging technologies and innovations. *Innovations in food packaging (2nd ed.)*, Academic Press, San Diego, 3-12.

- Hanani, Z.N.; Roos, Y. & Kerry, J. (2014). Use and application of gelatin as potential biodegradable packaging materials for food products. *International Journal of Biological Macromolecules*, 71, 94-102.
- Hernandez-Muñoz, P.; Almenar, E.; Del Valle, V.; Velez, D. & Gavara, R. (2008). Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria × ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 110 (2), 428-435.
- Janjarasskul, T. & Krochta, J.M. (2010). Edible packaging materials. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 415-448.
- Jeevahan, J. & Chandrasekaran, M. (2019). Nanoedible films for food packaging: A review. *Journal of Materials Science*, 54, 12290-12318.
- Jiang, Y.; Yu, L.; Hu, Y.; Zhu, Z.; Zhuang, C.; Zhao, Y. & Zhong, Y. (2020). The preservation performance of chitosan coating with different molecular weight on strawberry using electrostatic spraying technique. *International Journal of Biological Macromolecules*, 151, 278-285.
- Jiménez, A.; Requena, R.; Vargas, M.; Atarés, L. & Chiralt, A. (2018). Food hydrocolloids as matrices for edible packaging applications. *Role of materials science in food bioengineering*, Elsevier, 263-299.
- Jitareerat, P.; Paumchai, S. & Kanlayanarat, S. (2007). Effect of chitosan on ripening enzymatic activity, and disease development in mango (*Mangifera indica* L.) fruit. *N. Z. J. Crop. Hort. Sci.*, 35, 211–218.
- Kanatt, R.S.; Rao, M.S.; Chawla, S.P. & Sharma, A. (2012). Active chitosane polyvinyl alcohol films with natural extracts. *Food Hydrocolloids*, 29, 290-297.
- Kaur, S. & Dhillon, G.S. (2015). Recent trends in biological extraction of chitin from marine shell wastes: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35 (1), 44-61.
- Khanzadi, M.; Jafari, S.M.; Mirzaei, H.; Chegini, F.K.; Maghsoudlou, Y. & Dehnad, D. (2015). Physical and mechanical properties in biodegradable films of whey protein concentrate–pullulan by application of beeswax. *Carbohydrate Polymers*, 118, 24-29.
- Kou, S.; Peters, L. & Mucalo, M. (2022). Chitosan: A review of molecular structure, bioactivities and interactions with the human body and micro-organisms. *Carbohydrate Polymers*, 282, Article 119132.
- Kumar, A.; Singh, O.; Kohli, K. (2017). Post-harvest changes in functional and sensory properties of guava (*Psidium guajava* L. cv. Pant Prabhat) fruits as influenced by different edible coating treatments. *J. Pharmacogn. Phytochem*, 6, 1109–1116.
- Kumar, P. & Sethi, S. (2018). Edible coating for fresh fruit: A review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7 (5), 2619-2626.
- Kumar, S.; Mukherjee, A. & Dutta, J. (2020). Chitosan based nanocomposite films and coatings: Emerging antimicrobial food packaging alternatives. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 196-209.
- Kumar, S.; Mukherjee, A.; Dutta, J. (2020). Chitosan based nanocomposite films and coatings: Emerging antimicrobial food packaging alternatives. *Trends in Food Science & Technologies*, 97, 196–209.

- Kumar, V.; Hasan, M.; Mangaraj, S.; Pravitha, M.; Verma, D.K. & Srivastav, P.P. (2022). Trends in Edible Packaging Films and its Prospective Future in Food: A Review. *Applied Food Research*, 2, Article 100118.
- Łupina, K.; Kowalczyk, D.; Zięba, E.; Kazimierczak, W.; Mężyńska, M.; Basiura-Cembala, M. & Wiącek A.E. (2019). Edible films made from blends of gelatin and polysaccharide-based emulsifiers-A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 96, 555-567.
- M. Aider (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 43.
- Majeed, K.; Jawaid, M.; Hassan, A.; Bakar, A.A.; Khalil, H.A.; Salema, A. & Inuwa, I. (2013). Potential materials for food packaging from nanoclay/natural fibres filled hybrid composites. *Materials & Design*, 46, 391-410.
- Mali, S. & Grossmann, M.V.E. (2003). Effects of yam starch films on storability and quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa*). *J Agric Food Chem*, 51.
- Marcos, B.; Aymerich, T.; Monfort, J.M. & Garriga, M. (2010). Physical performance of biodegradable films intended for antimicrobial food packaging. *Journal of Food Science*, 75 (8), E502-E507.
- Martín-Belloso, O., Rojas-Graü, M.A. & Soliva-fortuny, R. (2009). Edible Films and Coatings for Food Applications, 295–313.
- Md Nor, S. & Ding, P. (2020). Trends and advances in edible biopolymer coating for tropical fruit: A review. *Food Research International*, 134, Article 109208.
- Modesti, M.; Zampella, L. & Petriccione, M. (2019). Chitosan mono- and bilayer edible coatings for preserving postharvest quality of fresh fruit. *Polymers for Agri-Food Applications; Gutiérrez, T.J., Ed.; Editorial Springer International Publishing*, 465–486.
- Mohamed, S.A.A.; El-Sakhawy, M. & El-Sakhawy, M.A.-M. (2020). Polysaccharides, protein and lipid-based natural edible films in food packaging: A review. *Carbohydrate Polymers*.
- Monte, M.L.; Moreno, M.L.; Senna, J.; Arrieche, L.S. & Pinto, L.A.A. (2018). Moisture sorption isotherms of chitosan-glycerol films: thermodynamic properties and microstructure. *Food Biosci.*, 22, 170-177.
- Moran, H.B.T.; Turley, J.L.; Andersson, M. & Lavelle, E.C. (2018). Immunomodulatory properties of chitosan polymers. *Biomaterials*, 184, 1-9.
- Morillon, V.; Debeaufort, F.; Blond, B.; Capelle, M. & Voilley, A. (2002). Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42 (1), 67-89.
- Munhuweyi, K.; Lennox, C.L.; Meitz-Hopkins, J.C.; Caleb, O.J.; Sigge, G.O. & Opara, U.L. (2017). Investigating the effects of crab shell chitosan on fungal mycelial growth and postharvest quality attributes of pomegranate whole fruit and arils. *Sci. Hortic.*, 220, 78–89.
- Negm, N.A.; Hefni, H.H.H.; Abd-Elaal, A.A.A; Badr, E.A. & Abou Kana, M.T.H. Advancement on modification of chitosan biopolymer and its potential applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 152, 681-702.

- Nilsen-Nygaard, J.; Strand, S.; Vårum, K.; Draget, K. & Nordgård, C. (2015). Chitosan: Gels and interfacial properties. *Polymers*, 7 (3), 552.
- Oladzadabbasabadi, N.; Nafchi, A.M.; Ariffin, M.; Wijekoon, M.M.J.O.; Al-Hassan, A.A.; Dheyab, M.A.; Ghasemlou, M. (2022). Recent advances in extraction, modification, and application of chitosan in packaging industry. *Carbohydrate Polymers*, 277, Article 118876.
- Panahirad, S.; Dadpour, M.; Peighambardoust, S.H.; Soltanzadeh, M.; Gullón, B.; Alirezalu, K. & Lorenzo, J.M. (2021). Applications of carboxymethyl cellulose- and pectin-based active edible coatings in preservation of fruits and vegetables: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 110, 663-673.
- Park, S.; Daeschel, M. & Zhao, Y. (2004). Functional properties of antimicrobial lysozyme–chitosan composite films. *J Food Sci*, 69(8), 215–221.
- Parreidt, T.S.; Müller, K. & Schmid, M. (2018) Alginate-based edible films and coatings for food packaging applications. *Foods*, 7 (170), 1-38.
- Pavinatto, A.; de Almeida Mattos, A. V.; Granato Malpass, A.C.; Okura, M.H.; Balogh, D.T. & Sanfelice; R.C. (2020). Coating with chitosan-based edible films for mechanical/biological protection of strawberries. *International Journal of Biological Macromolecules*, 151, 1004-1011.
- Pavinatto, A.; Pavinatto, F.J.; Delezuk, J.A.d.M.; Nobre, T.M.; Souza, A.L.; Campana-Filho, S.P. & Oliveira Jr., O.N. (2013). Low molecular-weight chitosans are stronger biomembrane model perturbants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 104, 48-53.
- Peretto, G.; Du, W-X.; Avena-Bustillos, R.J.; Sarreal S.B.L.; Hua S.S.T.; Sambo, P. & McHugh, T.H. (2014). Increasing strawberry shelf-life with carvacrol and methyl cinnamate antimicrobial vaporsreleased from edible films. *Postharvest Biol Technol* 89, 11–18.
- Petkoska, A. T.; Daniloski D., D'Cunha, N. M.; Naumovski, N. & Broach, A. T. (2021). Edible packaging: Sustainable solutions and novel trends in food packaging. *Food Research International*, 140, Article 109981.
- Pooja Saklani, P.; Nath, S.; Kishor Das, S. & Singh, S. (2019). A review of edible packaging for foods. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8, 2885-2895.
- Prathibhani, H.M.; Kumarihami, C.; Kim, Y-H.; Kwack, Y-B.; Kim, J. & Kim J.G. (2022). Application of chitosan as edible coating to enhance storability and fruit quality of Kiwifruit: A Review. *Scientia Horticulturae*, 292, Article 110647.
- Qinna, N.A.; Karwi, Q.G.; Al-Jbour, N.; Al-Remawi, M.A.; Alhussainy, T.M.; Al-So'ud, K.A.; Al Omari, M.M.H. & Badwan, A.A. (2015). Influence of molecular weight and degree of deacetylation of low molecular weight chitosan on the bioactivity of oral insulin preparations. *Marine Drugs*, 13 (4), 1710-1725.
- Rabea, E.I.; Badawy, M.E.-T.; Stevens, C.V.; Smagghe, G. & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4 (6), 1457-1465.
- Raghav, P.K.; Agarwal, N. & Saini, M. (2016) Edible coating of fruits and vegetables: A review. *International Journal of Scientific Research and Modern Education*, 1 (1), 2455-5630.

- Ramos, Ó.L.; Pereira, R.N.; Cerqueira, M.A.; Martins, J.R.; Teixeira, J.A.; Malcata, F.X. & Vicente, A.A. (2018). Bio-based nanocomposites for food packaging and their effect in food quality and safety. *Food packaging and preservation, Elsevier*, 271-306.
- Ramos, O.L.; Pereira, R.N.; Rodrigues, R.; Teixeira, J.A.; Vicente, A.A. & Malcata, F.X. (2014). Physical effects upon whey protein aggregation for nano-coating production. *Food Research International*, 66, 344-355.
- Regubalan, B.; Pandit, P.; Maiti, S.; Nadathur, G.T. & Mallick, A. (2018). Potential bio-based edible films, foams, and hydrogels for food packaging. *Bio-based materials for food packaging, Springer*, 105-123.
- Rhim, J.W.; Amar, K.M.; Sher, P.S. & Perry, K.W.N. (2006). Effect of the Processing Methods on the Performance of Polylactide Films: Thermocompression versus Solvent Casting. *Journal of Applied Polymer Science*, 101 (6), 3736-3742.
- Rhim, J.W.; Weller, C. & Ham, K.S. (1998). Characteristics of chitosan films as affected by the type of solvent acid. *Food Science and Biotechnology*, 7, 263-268.
- Riaz, A.; Lei, S.; Akhtar, H.M.S.; Wan, P.; Chen, D.; Jabbar, S.; Abid, M.; Hashim, M.M. & Zeng, X. (2018). Preparation and characterization of chitosan-based antimicrobial active food packaging film incorporated with apple peel polyphenols. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 547-555.
- Robledo, N.; Vera, P.; López, L.; Yazdani-Pedram, M.; Tapia, C. & Abugoch, L. (2018). Thymol nanoemulsions incorporated in quinoa protein/chitosan edible films; antifungal effect in cherry tomatoes. *Food Chemistry*, 246, 211-219.
- Rooney, M.L. (2005). Introduction to active food packaging technologies. *Innovations in Food Packaging*, 63-69.
- Rukmanikrishnan, B.; Ramalingam, S.; Rajasekharan, S.K.; Lee, J. & Lee, J. (2020). Binary and ternary sustainable composites of gellan gum, hydroxyethyl cellulose and lignin for food packaging applications: Biocompatibility, antioxidant activity, UV and water barrier properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 153.
- Sahariah, P. & Masson, M. (2017). Antimicrobial chitosan and chitosan derivatives: A review of the structure–activity relationship. *Biomacromolecules*, 18 (11), 3846-3868.
- Saleem, M. S.; Anjum, M.A.; Naz, S.; Ali, S.; Hussain, S.; Azam, M.; Sardar, H.; Khaliq, G.; Canan, I. & Ejaz, S. (2021). Incorporation of ascorbic acid in chitosan-based edible coating improves postharvest quality and storability of strawberry fruits. *Int. J. Biol. Macromol.*, 189, 160-169.
- Sánchez-Ortega, I.; García-Almendárez, B.E.; Santos-López, E.M.; Amaro-Reyes, A.; Barboza-Corona, J.E. & Regalado, C. (2014). Antimicrobial edible films and coatings for meat and meat products preservation. *The Scientific World Journal*, 1-14.
- Sapper, M. & Amparo, C. (2018). Starch-based coatings for preservation of fruits and vegetables. *Coatings*, 8 (152), 2-20.

- Sarabandi, K.; Jafari, S.M.; Mohammadi, M.; Akbarbaglu, Z.; Pezeshki, A. & Heshmati, M.K. (2019). Production of reconstitutable nanoliposomes loaded with flaxseed protein hydrolysates: Stability and characterization. *Food Hydrocolloids*, 96, 442-450.
- Schmid, M. & Müller, K. (2019). Whey protein-based packaging films and coatings. *Whey proteins, Elsevier*, 407-437.
- Senturk Parreidt, T.; Schmid, M. & Müller, K. (2018). Effect of dipping and vacuum impregnation coating techniques with alginate based coating on physical quality parameters of cantaloupe melon. *Journal of Food Science*, 83 (4), 929-936.
- Shanmuganathan, R.; Edison, T.N.J.I.; LewisOscar, F.; Kumar, P.; Shanmugam, S. & Pugazhendhi, A. (2019). Chitosan nanopolymers: An overview of drug delivery against cancer. *International Journal of Biological Macromolecules*, 130, 727-736.
- Sharma, P.; Shehin, V.P.; Kaur, N. & Vyas, P. (2019). Application of edible coatings on fresh and minimally processed vegetables: A review. *International Journal of Vegetable Science*, 25 (3), 295-314.
- Sharma, R. & Ghoshal, G. (2018). Emerging trends in food packaging. *Nutrition and Food Science*, 48 (5), 764-779.
- Sharma, S.; Barman, K.; Siddiqui, M.W. (2016) Chitosan: Properties and roles in postharvest quality preservation of horticultural crops. *Eco-Friendly Technology for Postharvest Produce Quality*, 269–296.
- Shit, S.C. & Shah, P.M. (2014). Edible polymers: Challenges and opportunities. *Journal of Polymers*, 1-14.
- Siracusa, V.; Karpova, S.; Olkhov, A., Zhulkina, A.; Kosenko, R. & Iordanskii, A. (2020). Gas transport phenomena and polymer dynamics in PHB/PLA blend films as potential packaging materials. *Polymers*, 12 (3), 1-19.
- Siracusa, V.; Rocculi, P.; Romani, S. & Rosa, M.D. (2008). Biodegradable polymers for food packaging: A review. *Trends in food science and technology*, 19, pp. 634-643.
- Siripatrawan, U. & Harte, B.R. (2010). Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 24 (8) 770-775.
- Sivashankari, P.R. & Prabakaran, M. (2017). Deacetylation modification techniques of chitin and chitosan. *Chitosan based biomaterials, 1, Elsevier*, 117-133.
- Skurtys, O.; Acevedo, C.; Pedreschi, F.; Enrione, J.; Osorio, F. & Aguilera, J.M. (2010). Food hydrocolloid edible films and coatings. *Nova Science Publishers, Inc, Properties and Structures*, 41-80.
- Suhag, R.; Kumar, N.; Petkoska, A.T. & Upadhyay, A. (2020). Film formation and deposition methods of edible coating on food products: A review. *Food Research International*, 136, 1-16.
- Suput, D.; Lazic, V.; Popovic, S. & Hromis, N. (2015). Edible films and coatings: sources, properties and application. *Food Feed Res.*, 42, 11-22.

Sustainable agriculture reviews 36: Chitin and chitosan: Applications in food, agriculture, pharmacy, medicine and wastewater treatment, Springer International Publishing, 81-123.

- Tai, H.K. & Melton, L.D. (2002). Ripening-related changes in cell wall polysaccharides of strawberry cortical and pith tissues. *Postharvest Biol. Technol.*, 26 (1), 23-33.
- Talegaonkar, S.; Sharma, H.; Pandey, S.; Mishra, P.K. & Wimmer, R. (2017). Bionanocomposites: Smart biodegradable packaging material for food preservation. *Food packaging, Academic Press*, 79-110.
- Tavassoli-Kafrani, E.; Shekarchizadeh, H. & Masoudpour-Behabadi, M. (2016). Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. *Carbohydrate Polymers*, 137, 360-374.
- Teixeira, B.; Marques, A.; Pires, C.; Ramos, C.; Batista, I.; Saraiva, J.A. & Nunes, M.L. (2014). Characterization of fish protein films incorporated with essential oils of clove, garlic and origanum: Physical, antioxidant and antibacterial properties. *LWT-Food Science and Technology*, 59 (1), 533-539.
- Tezotto-Uliana, J.V.; Fargoni, G.P.; Geerdink, G.M. & Kluge, R.A. (2014). Chitosan applications pre- or postharvest prolong raspberry shelf-life quality. *Postharvest Biol. Technol.*, 91, 72-77.
- Thakur, R.; Pristijono, P.; Scarlett, C.J.; Bowyer, M.; Singh, S.P. & Vuong, Q.V. (2019) Starch-based films: Major factors affecting their properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132, 1079-1089.
- Tomida, H.; Fujii, T.; Furutani, N.; Michihara, A.; Yasufuku, T.; Akasaki, K.; Maruyama, T.; Otagiri, M.; Gebicki, J.M. & Anraku, M. (2009). Antioxidant properties of some different molecular weight chitosans. *Carbohydrate Research*, 344 (13), 1690-1696.
- Viana, R.M.; Sá, N.M.S.M.; Barros, M.O.; Borges, M.D.F. & Azeredo, H.M.C. (2018). Nanofibrillated bacterial cellulose and pectin edible films added with fruit purees. *Carbohydrate Polymers*, 196, 27-32.
- Vieira, M.G.A.; Da Silva, M.A.; Dos Santos, L.O. & Beppu, M.M. (2011). Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *European Polymer Journal*, 47 (3), 254-263.
- Wang, D.; Yang, H.; Lu, X.; Wu, Y. & Blasi, F. (2022). The Inhibitory Effect of Chitosan Based Films, Incorporated with Essential Oil of *Perilla frutescens* Leaves, against *Botrytis cinerea* during the Storage of Strawberries. *Processes*, 10 (4), 706.
- Wang, W.; Xue, C. & Mao, X. (2020). Chitosan: Structural modification, biological activity and application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 4532-4546.
- Wang, X.; Yong, H.; Gao, L.; Li, L.; Jin, M. & Liu, J. (2019). Preparation and characterization of antioxidant and pH-sensitive films based on chitosan and black soybean seed coat extract. *Food Hydrocolloids*, 89, 56-66.
- Wei, L.; Tan, W.; Wang, G.; Li, Q.; Dong, F. & Guo, Z. (2019). The antioxidant and antifungal activity of chitosan derivatives bearing Schiff bases and quaternary ammonium salts. *Carbohydrate Polymers*, 226, Article 115256.

- Xie, F.; Pollet, E.; Halley, P. J. & Averous, L. (2014). Advanced nano-biocomposites based on starch. *Polysaccharides, bioactivity and biotechnology*, 1–75
- Xu, S.; Chen, X. & Sun, D.W. (2001). Preservation of kiwifruit coated with an edible film at ambient temperature. *J. Food Eng.*, 50, 211-216.
- Yang, C.; Lu, J-H.; Xu, M-T.; Shi, X-C.; Song, Z-W.; Chen, T-M.; Herrera-Balandrano, D.D.; Zhang, Y-J.; Laborda, P.; Shahriar, M. & Wang, S-Y. (2022). Evaluation of chitosan coatings enriched with turmeric and green tea extracts on postharvest preservation of strawberries. *LWT- Food Science and Technology*, 163, Article 113551.
- Yanyun, Z. (2011). Application of commercial coatings. *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*, 319-331.
- Younes, I. & Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications *Marine Drugs*, 13 (3), 1133-1174.
- Younes, I. & Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs*, 13 (3), 1133-1174.
- Yousuf, B.; Qadri, O.S. & Srivastava, A.K. (2018). Recent developments in shelf-life extension of fresh-cut fruits and vegetables by application of different edible coatings: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 89, 198-209.
- Zargar, V.; Asghari, M. & Dashti, A. (2015). A review on chitin and chitosan polymers: Structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications. *ChemBioEng Reviews*, 2 (3), 204-226
- Zhu, D.; Cheng, H.; Li, J.; Zhang, W.; Shen, Y.; Chen, S.; Ge, Z. & Chen, S. (2016). Enhanced water-solubility and antibacterial activity of novel chitosan derivatives modified with quaternary phosphonium salt. *Materials Science and Engineering C*, 61, 79-84.