

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGRO-ALIMENTARI

CAMPUS DI CESENA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN

SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

Applicazione di alte pressioni idrostatiche (HPP)

per migliorare l'efficienza di estrazione di chitina e chitosano

da sottoprodotti di crostacei

Tesi in

69166- Analisi Fisiche E Reologiche Degli Alimenti

Relatore:

Dott.ssa Silvia Tappi

Correlatore:

Dott.ssa Ana Cristina de Aguiar Saldanha Pinheiro

Candidato: Sabrina Maria Carbone

Matricola N° 1035879

Anno Accademico 2022/2023

Sessione unica

Sommario

1. INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI	3
2. I SOTTOPRODOTTI DERIVATI DELLA LAVORAZIONE DEI CROSTACEI	4
2.1 QUANTITÀ DI SCARTI PRODOTTI.....	4
2.2 COMPOSTI AD ALTO VALORE DERIVATI DAI SOTTOPRODOTTI.....	6
2.2.1 PIGMENTI.....	7
2.2.2 CHITINA E CHITOSANO.....	9
2.2.3 LIPIDI.....	10
3. CHITINA E CHITOSANO	12
3.1 DEFINIZIONE E STRUTTURE CHIMICHE.....	12
3.2 METODI DI ESTRAZIONE DELLA CHITINA.....	16
3.2.1 ESTRAZIONE DELLA CHITINA MEDIANTE METODO CHIMITO.....	16
3.2.2 ESTRAZIONE DELLA CHITINA MEDIANTE TRATTAMENTI BIOLOGICI.....	17
3.3 DEACETILAZIONE DELLA CHITINA.....	18
3.3.1 DEACETILAZIONE DELLA CHITINA CON METODO ALCALINO.....	19
3.3.2 DEACETILAZIONE DELLA CHITINA CON METODO ENZIMATICO.....	19
3.4 PROPRIETÀ.....	20
3.4.1 PROPRIETÀ ANTIMICROBICHE.....	20
3.4.2 PROPRIETÀ ANTIOSSIDANTI.....	21
3.4.3 PROPRIETÀ ANTITUMORALI.....	22
3.5 APPLICAZIONI NEL SETTORE ALIMENTARE.....	22
3.5.1 PRODUZIONE DI BIOFILM.....	22
3.5.2 ADDITIVI ALIMENTARI.....	23
3.5.3 CHITINA E CHITOSANO COME PROBIOTICI E PREBIOTICI.....	23
4. TECNOLOGIE INNOVATIVE DI ESTRAZIONE	25
4.1 ULTRASUONI (EAU).....	25
4.2 CAMPI ELETTRICI PULSATI (PEF).....	26
4.3 ALTE PRESSIONI IDROSTATICHE (HPP).....	26
5. MATERIALI E METODI	28
5.1 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI.....	28
5.2 PRETRATTAMENTO CON HPP.....	28
5.3 ESTRAZIONE DELLA CHITINA.....	30
5.3.1 SOLUZIONI.....	30
5.3.2 DEMINERALIZZAZIONE.....	30
5.3.3 DEPROTEINIZZAZIONE.....	32

5.4 DEACETILAZIONE DELLA CHITINA	33
5.4.1 SOLUZIONI.....	33
5.4.2 PROCEDURA.....	34
5.5 CARACTERIZZAZIONE DELLA CHITINA E DEL CHITOSANO.....	34
5.5.1 RESE DI ESTRAZIONE.....	34
5.5.2 SOSTANZA SECCA CHITINA.....	35
5.5.3 CONTENUTO DI CENERI.....	35
5.5.4 CONTENUTO DI AZOTO TOTALE	35
5.5.5 COLORE.....	37
5.5.6 CALORIMETRIA DEFFERENZIALE A SCANSIONE.....	38
5.5.7 SPETTROSCOPIA INFRAROSSA A TRASFORMATA DI FOURIER (FTIR-ATR)	39
5.5.8 GRADO DI DEACETILAZIONE	41
5.4.9 CAPACITÀ DI LEGARE L'ACQUA.....	42
5.4.10 CAPACITÀ DI LEGARE L'OLIO.....	42
5.4.11 DETERMINAZIONE VISCOSIMETRICA DEL PESO MOLECOLARE DEL CHITOSANO	43
5.4.12 ANALISI STATISTICA	44
6. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	45
6.1 RESE DI PROCESSO.....	45
6.2 SOSTANZA SECCA	46
6.3 CONTENUTO DI CENERI.....	47
6.4 CONTENUTO DI AZOTO.....	48
6.5 COLORE	49
6.6 CALORIMETRIA DIFFERENZIALE A SCANSIONE.....	57
6.7 SPETTRI FTIR- ATR	58
6.8 GRADO DI ACETILAZIONE (DA%).....	60
6.9 CAPACITÀ DI LEGARE L'ACQUA	61
6.10 CAPACITÀ DI LEGARE L'OLIO.....	63
6.11 DETERMINAZIONE VISCOSIMETRICA DEL PESO MOLECOLARE DEL CHITOSANO.....	64
7. CONCLUSIONI.....	65
8. BIBLIOGRAFIA.....	66

1. INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

La produzione ittica globale è aumentata da 37 tonnellate con un consumo pro capite di 9 kg nel 1961 a 200 tonnellate con un consumo pro capite di 20.2 kg pro capite nel 2020 (FAO, 2020).

Questo immenso aumento ha portato allo sviluppo di un'industria della pesca più diversificata che fornisce prodotti della pesca crudi, lavorati e ulteriormente trasformati di alta qualità. Tuttavia, l'aumento della lavorazione si traduce in una massiccia produzione di rifiuti (il 20–80% del peso sbarcato può essere costituito da sottoprodotti, a seconda della lavorazione e delle specie di pesce). Vengono generati oltre 20 tonnellate di sottoprodotti della pesca (testa, pelle, pinne, ossa, carne rossa, visceri, ritagli e scaglie) (FAO, 2018).

Questi sottoprodotti rappresentano un'importante fonte potenziale di composti bioattivi, con importanti proprietà funzionali che possono essere isolate o concentrate, conferendo loro un valore aggiunto nei mercati di alta quota, come ad esempio i prodotti farmaceutici, nutraceutici e i cosmetici.

Per ottenere composti biologici da sottoprodotti ittici con buone caratteristiche organolettiche, funzionali è essenziale selezionare metodi di estrazione appropriati per ciascun ingrediente bioattivo. Negli ultimi anni, sono emerse tecnologie di estrazione innovative come alternativa ai metodi convenzionali per isolare composti di alto valore da pesci, molluschi e crostacei (Al Khawli et al., 2019).

I sottoprodotti dei crostacei possono essere utilizzati per estrarre la chitina e il suo derivato chitosano. La chitina e il chitosano possiedono importanti proprietà funzionali e biologiche che li rendono promettenti per migliorare la sicurezza, la qualità e la conservabilità degli alimenti nell'industria alimentare. Tuttavia, le metodiche chimiche tradizionali per ottenere la chitina e il chitosano presentano degli inconvenienti dal punto di vista tecnico e ambientale, quali prolungati tempi di estrazione e l'impiego di elevate quantità di solventi e acqua. Di recente, sono stati sviluppati metodi di estrazione innovativi che rispettano maggiormente l'ambiente.

La presente sperimentazione ha avuto come obiettivo studiare gli effetti del trattamento ad alta pressione idrostatiche (HPP) sulla resa e sulle proprietà fisico-chimiche della chitina e del chitosano estratti dai sottoprodotti dei gamberi. A tal fine, sono stati applicati tre livelli di pressione (400, 500 e 600 MPa) per 10 minuti ai sottoprodotti di gamberi rosa (*Parapenaeus longirostris*) e rossi (*Aristaeomorpha foliacea*). Successivamente, la chitina e il chitosano sono stati estratti da sottoprodotti trattati e non trattati con le alte pressioni mediante processi termochimici.

2. I SOTTOPRODOTTI DERIVATI DELLA LAVORAZIONE DEI CROSTACEI

2.1 QUANTITÀ DI SCARTI PRODOTTI

Il settore dell’acquacoltura dei crostacei negli ultimi decenni risulta essere il più grande settore di produzione di prodotti ittici a livello mondiale, in quanto gamberi e prodotti a base di gamberi sono consumati in tutto il mondo e le previsioni prevedono un aumento della domanda annua soprattutto per una maggiore consapevolezza dei consumatori del valore nutrizionale intrinseci in questi prodotti (Nirmal et al., 2020).

Si prevede che il mercato globale dei crostacei dal 2023 al 2028 avrà un tasso di crescita (CAGR) del 4,86%, questo tasso di crescita è guidato principalmente dalla crescita di domanda di prodotti a base di crostacei nelle applicazioni culinarie. Tutto ciò può essere attribuito a una sempre più elevata coscienza dei consumatori, i quali attribuiscono ai crostacei o prodotti da essi derivati come fonte di sostanze nutritive principalmente tra i consumatori attenti alla salute.

Inoltre, la rapida estensione dell’acquacoltura e lo sviluppo di tecniche e tecnologie avanzate stanno determinando un aumento della produzione e della disponibilità di crostacei d’allevamento, che, a sua volta, sta fornendo uno slancio al mercato (IMARC, 2023). Il principale produttore di gamberi risulta essere l’Asia la quale da sola rappresenta circa 80% della produzione globale di gamberi (Nirmal et al., 2020); secondo i dati FAO la Cina è il primo produttore di prodotti ittici con circa 12,68 milioni di tonnellate generate nel 2018 seguita da Perù, Indonesia, Federazione Russa e Stati Uniti (Figura 1) (FAO, 2020).

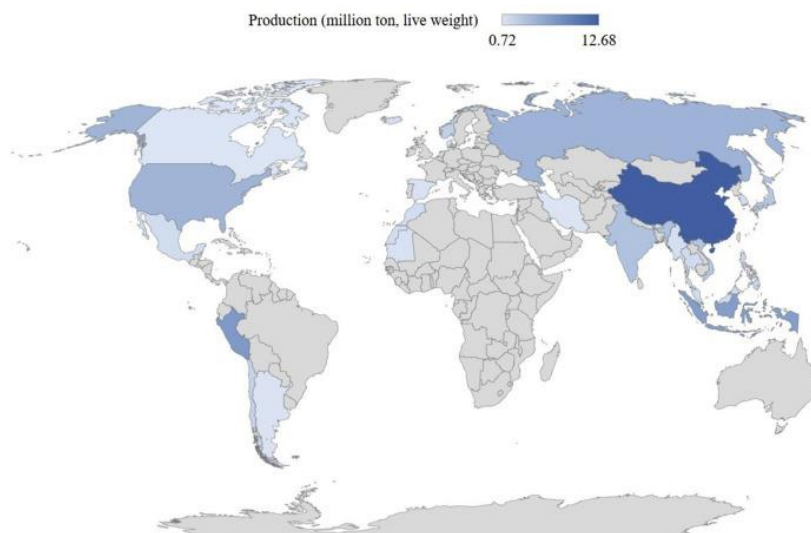


Figura 1. Produzione di cattura marina nel 2018: principali paesi e territori produttori (Cabanillas-Bojórquez et al., 2022).

L'aumento significativo della domanda di crostacei ha portato a un notevole incremento della quantità di sottoprodotti generati da questa categoria. A livello globale, si stima che ogni anno vengano generati dai 6 agli 8 milioni di tonnellate di sottoprodotti derivati dai crostacei. Ed effettuando un confronto tra il tonno e i crostacei si evince che mentre per il tonno il 75% del peso totale può essere convertito in filetti; in un gambero la porzione commestibile risulta essere soltanto il 40% (Yan & Chen, 2015).

Concentrandosi sulla lavorazione dei gamberi (**Figura 2**), essi possono essere stoccati con o senza guscio avendo come diretta conseguenza la generazione di circa il 50-60% di sottoprodotti includendo testa, viscere, guscio, ecc (Nirmal et al., 2020).

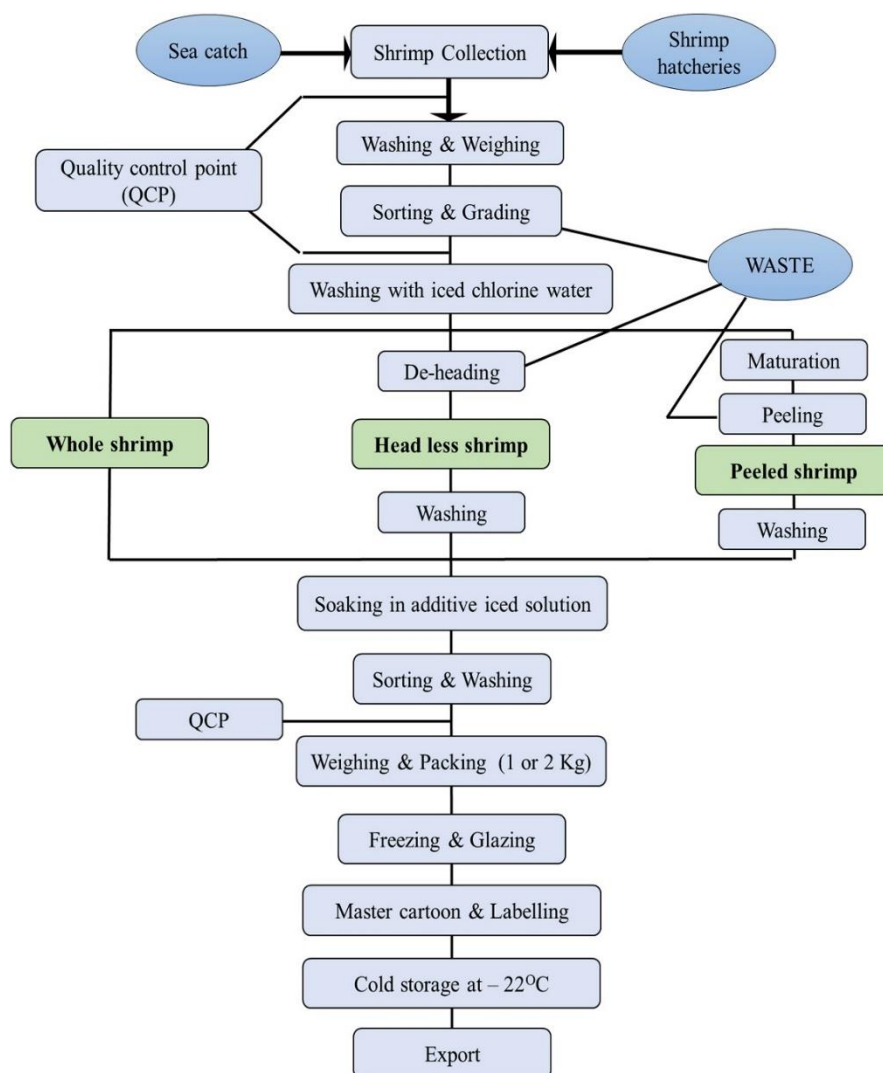


Figura 2. Presentazione schematica della lavorazione dei gamberi (Nirmal et al., 2020).

Nei paesi in via di sviluppo, gli scarti spesso vengono semplicemente dispersi in mare o in discariche; mentre nei paesi in via di sviluppo, lo smaltimento può risultare molto costoso raggiungendo fino a

150 dollari a tonnellata. Solamente una piccola parte di questi sottoprodotti vengono destinati come mangimi per animali o come ingredienti per la formulazione di mangimi per acquacoltura.

Tutto questo, comporta un notevole spreco avendo come diretta conseguenza la perdita di preziosi componenti bioattivi e l'aumento dell'inquinamento ambientale. Recuperare le molecole bioattive dai sottoprodotti dei crostacei comporterebbe un vantaggio sia per l'economia dell'industria ittica sia per l'ambiente, riducendo lo spreco e ottenendo simultaneamente prodotti ad alto valore.

2.2 COMPOSTI AD ALTO VALORE DERIVATI DAI SOTTOPRODOTTI

I sottoprodotti della lavorazione dei gamberi contengono preziosi componenti bioattivi come peptidi, chitina, chitosano, pigmenti, enzimi, lipidi, minerali e vitamine (**Figura 3**). Il quantitativo di ciascun costituente dipende da diversi fattori tra cui specie, periodo dell'anno e processo di lavorazione. Dal recupero di queste pregiate molecole è possibile sviluppare prodotti ad alto valore aggiunto, che trovano applicazione in diversi settori tra cui industrie farmaceutiche, alimentari, mangimistiche e ambientali.

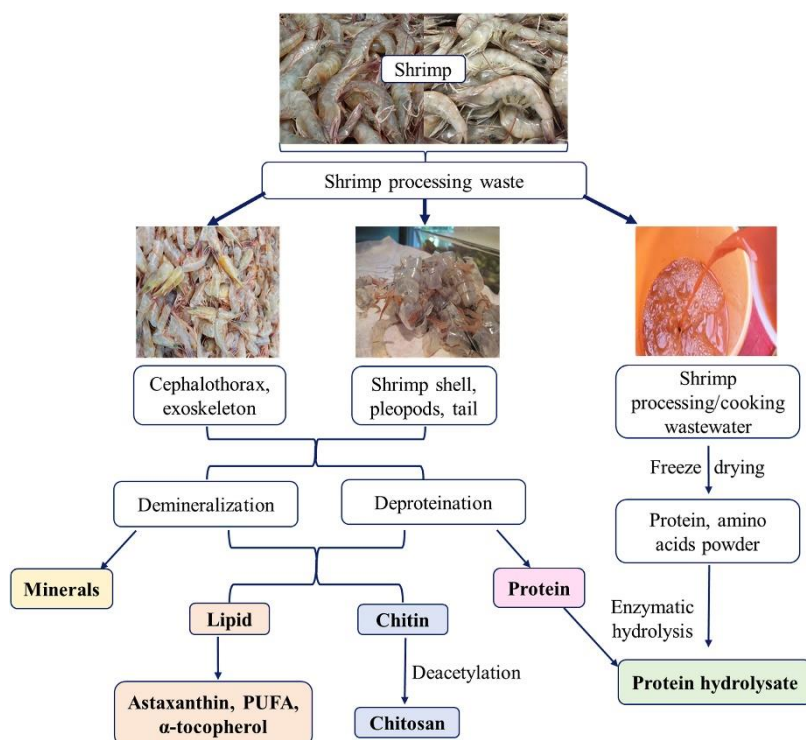


Figura 3. Composti bioattivi ricavati dagli scarti di lavorazione dei gamberi (Nirmal et al., 2020).

2.2.1 PIGMENTI

I crostacei sono ricchi di pigmenti come carotenoidi i quali svolgono una importante funzione fisiologica e conferiscono anche il tipico colore rosa-arancio ai crostacei. Proprio per la presenza dei carotenoidi i sottoprodotti potrebbero essere una scelta più economica per il recupero di questi pigmenti e rappresentare un'alternativa rispetto ai carotenoidi di sintesi (Sachindra & Mahendrakar, 2005).

I pigmenti ovvero in questo caso i carotenoidi sono un pigmento liposolubile, i quali nei crostacei si trovano complessati con le lipoproteine; essi possono essere estratti da diverse parti degli scarti dei gamberi, tra cui dalla testa. L'estrazione dei carotenoidi dagli scarti dei gamberi può essere effettuata con diverse procedure, tra cui mediante l'utilizzo di solventi, di cui i più utilizzati sono acetone, acetato di etile, esano, isopropanolo, metanolo, metiletilchetone ed etanolo, oppure mediante l'utilizzo di fluidi supercritici come anidride carbonica supercritica. Ma negli ultimi anni si pone sempre più lo sguardo verso metodiche alternative meno impattanti sull'ambiente tra cui diversi processi biotecnologici (**Tabella 1**) (Mao et al., 2017).

Tabella 1. Diversi trattamenti per l'estrazione di carotenoidi (astaxantina) mediante biotecnologie (Mao et al., 2017).

Products	Shrimp waste sources	Treatment	enzymes/microorganisms sources	carotenoids recovery (%)	References
Carotenoid pigment	brown shrimp (<i>Metapenaeus monoceros</i>)	Enzymatic hydrolysis	Trypsin	55	Chakrabarti, 2002
Carotenoids	<i>Penaeus indicus</i>	Enzymatic hydrolysis	Alcalase	82.5	Sowmya et al., 2014
Carotenoids	<i>Penaeus monodon</i>	Fermentation	Natural probiotic	72.6	Prameela et al., 2010b
Carotenoids	<i>Penaeus monodon</i>	Fermentation	<i>Pediococcus acidolactici</i> CFR2182	>75	Bhaskar et al., 2007
Astaxanthin	rock lobster (<i>Jasus lalandii</i>)	Enzymatic hydrolysis	Papain	54 µg/g	Auerswald and Gäde, 2008
Free astaxanthin	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Fermentation	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2400 µg/g	Pacheco et al., 2010
Astaxanthin	<i>X. kroyeri</i>	Enzymatic hydrolysis	Alcalase and pancreatin	47-57 µg/g (dry waste)	Holanda and Netto, 2006
Carotenoids	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Autolysis	Endogenous enzymes	826 µg/g	Cahú et al., 2012
Carotenoids	<i>Penaeus monodon</i>	Autolysis	Endogenous enzymes	63.4	Sowmya et al., 2011
Carotenoids	<i>Penaeus semisulcatus</i>	Enzymatic hydrolysis and alkaline treatment	Trypsin	NA	Jafari et al., 2012
Astaxanthin	<i>Pandalus borealis</i>	Enzymatic hydrolysis and reddish top layer	Proteolytic enzymes	91.9	Lee et al., 1999
Xanthophylls	<i>Parapenaeus longirostris</i>	Enzymatic hydrolysis	Barbel and bovine trypsins	80 µg/g	Sila et al., 2012
Carotenoids	<i>Litopenaeus vannamei</i>	Fermentation and enzymatic hydrolysis	<i>Pediococcus pentosaceus</i> , Savinase and Lipolase	66000 µg/g	Armenta and Guerrero-Legarreta, 2009
Carotenoids	<i>Penaeus indicus</i>	Fermentation	<i>Lactobacillus plantarum</i> B 4496	31.3 µg/g	Sachindra et al., 2007
Astaxanthin	<i>Penaeus</i> sp.	Fermentation and enzymatic hydrolysis	<i>Lactobacillus</i> bacterials, savinase, neutrase, alcalase and esperase	46000 µg/g	Armenta-López et al., 2002
Free astaxanthin	<i>Litopenaeus vannamei</i> , <i>stylirostris</i> and <i>setiferus</i>	Fermentation	<i>Lactobacillus plantarum</i>	115 µg/g	Gimeno et al., 2007

2.2.2 CHITINA E CHITOSANO

La chitina e il chitosano sono biopolimeri a cui oggi si presta notevole attenzione, in quanto di origine naturale e per le numerose applicazioni che possono essere realizzate in diversi ambiti, come l'industria alimentare, cosmetica, farmaceutica, biomedica, tessile e agricola.

La maggior parte della chitina commerciale presente sul mercato proviene da crostacei (Younes & Rinaudo, 2015).

SOTTOPRODOTTI DEI CROSTACEI



APPLICAZIONI CHITINA

- ✓ Industria Alimentare: Addensante, stabilizzante del colore, antiossidante
- ✓ Imballaggi: Biofilm commestibili e biodegradabili
- ✓ Agricoltura e agrochimica: Substrato nutritivo, fertilizzante e agente di controllo per la malattia delle piante
- ✓ Industria cosmetica: idratante, protezione cutanea e antietà
- ✓ Industria farmaceutica: Agenti antinfiammatori, pellicole per la medicazione delle ferite, trattamento di ferite croniche e pelli artificiali

APPLICAZIONI CHITOSANO

- ✓ Industria Alimentare: Nutrizione, additivi, agenti antimicrobici, alimenti nutraceutici, chiarificanti nell'industria delle bevande
- ✓ Imballaggi: Biofilm commestibili e imballaggi attivi
- ✓ Agricoltura e agrochimica: miglioramento del suolo, integratori
- ✓ Industria cosmetica: Prodotti per la cura della pelle, igiene orale, shampoo, profumi e deodoranti
- ✓ Industria farmaceutica: Prodotti dietetici, formulazioni terapeutiche,

Figura 5. Applicazione della chitina e del chitosano in diversi settori

2.2.3 LIPIDI

Negli ultimi anni, l'estrazione di lipidi dagli scarti dei crostacei è aumentata grazie alla presenza in essi di composti commerciali molto importati come gli acidi grassi polinsaturi o PUFAs. I crostacei, infatti, risultano essere una buona fonte di acidi grassi polinsaturi a lunga catena ($> C_{20}$) con un quantitativo di acido docosaesaenoico (DHA) molto simile a quello contenuto nel pesce azzurro e un contenuto superiore di acido eicosapentaenoico (EPA). Nei crostacei la principale fonte di lipidi risultano essere l'epatopancreas (11,6%) e il cefalotorace (2,7%) (Albalat et al., 2016; Azelee et al., 2023).

Il contenuto dei lipidi nei sottoprodotti di crostacei risulta essere molto differente, le principali cause che inducono a questa differenza sono la specie; ad esempio nella specie *Asiphaea scotiae* immatura e maschile si ha un contenuto che può variare dal 5 al 25% mentre nell'*Acanthephyra pelagica* dal 7 al 17%. Altre cause di questa diversità includono la posizione geografica e la tipologia specifica dei sottoprodotti. I lipidi estratti riscontrano un grande riutilizzo soprattutto per la loro azione antiossidante, antinfiammatoria, antitumorale e antimutagene (Clarke & Holmes, 1986).

Concentrandoci sui sottoprodotti dei gamberi, è importante notare che i principali costituenti degli acidi grassi sono gli acidi grassi polinsaturi (PUFA), in particolare l'acido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n3) e l'acido docosaesaenoico (DHA, 22:6n3) seguiti da acido oleico (C18:1n9c) e acido linoleico (C18:2n6c) (Nirmal et al., 2020).

Il profilo totale di acidi grassi saturi e insaturi può variare in base alla specie, le dimensioni, l'età, la dieta, il sesso, la stagione e della posizione geografica di pesca a strascico (**Tabella 2**).

Tabella 2. Variazione del profilo degli acidi grassi in diverse specie, pesca a strascico, genere e stagione (Gulzar et al., 2020).

Fatty acids (%)	Trawl variation				Gender variation		Seasonal variation	
	Deep sea water		Shallow water		<i>Metapenaeus affinis</i>		<i>Xiphopenaeus kroyeri</i>	
	<i>Aristeus antennatus</i>	<i>Aristeomorpha foliacea</i>	<i>Penaeus kerathurus</i>	<i>Penaeus japonicus</i>	Male	Female	Summer	Winter
Saturated fatty acids (SFA)								
C12:0	0.03	0.05	0.12	0.16	–	–	–	–
C14:0	2.98	2.4	1.17	1.48	1.96	1.47	–	–
C15:0	0.73	0.56	1.22	1.05	–	–	–	–
C16:0	20.79	19.51	17.99	17.38	23.24	23.7	35.8	34.2
C17:0	0.95	0.88	1.81	1.45	2.24	1.39	2.3	2.09
C18:0	5.75	6.44	9.63	7.68	20.05	18.08	16.2	14.7
C20:0	0.37	0.32	0.22	0.35	0.57	0.48	–	–
C21:0	0.72	0.72	1.19	1.57	–	–	–	–
C22:0	0.2	0.18	0.21	0.52	5.99	3.76	–	–
C23:0	–	–	–	–	5.55	4.76	0.8	0.9
C24:0	0.19	0.11	–	0.29	–	–	–	–
Monounsaturated fatty acids (MUFA)								
C16:1n7	5.24	4.09	4.27	5.04	2.73	6.04	4.74	4.55
C17:1n7	0.12	0.42	0.02	–	0.87	0.74	–	–
C18:1n9 t	0.22	0.16	0.23	0.23	0	0.29	1.7	2.41
C18:1n9 c	22.25	22.71	15.8	19.43	7.53	9.78	19.5	24.5
C18:1n7 c	4.93	3.46	3.66	3.22	–	–	–	–
C20:1n9	3.18	2.37	0.64	1.01	–	–	–	–
C20:1n7	0.91	0.41	–	–	0.74	0.81	–	–
C22:1n9	0.16	0.19	0.18	0.19	0.95	0.6	–	–
C24:1n9	0.56	1.09	0.04	0.7	1.45	1.01	–	–
Polyunsaturated fatty acids (PUFA)								
C18:2n6 t	0.32	0.04	0.03	0.1	–	–	–	–
C18:2n6	0.93	1.09	6.25	8.56	1.62	1.56	–	–
C18:3n6	0.02	0.06	–	–	–	0.56	–	–
C18:3n3	0.57	0.5	0.35	0.45	–	–	–	–
C20:2n6	0.04	0.02	–	–	1.14	0.72	–	–
C20:3n6	0.1	0.02	0.24	0.2	–	–	–	–
C20:3n3	0.11	0.22	0.05	–	–	–	–	–
C20:4n6	3.7	3.24	5.57	4.71	–	–	–	–
C20:5n3	9.39	10.37	14.08	11.66	12.71	14.38	4.26	4.83
C22:6n3	14.48	18.3	14.98	12.57	8.73	7.84	8.23	8.55
C22:2	–	–	–	–	–	0.43	2.35	3.24
References	Yerlikaya et al. (2013)				Dinçer and Aydın (2014)		Luzia et al. (2003)	

Le principali tecniche utilizzate per l'estrazione dei lipidi dai sottoprodotti dei gamberi tramite l'utilizzo di solventi organici a temperatura ambiente o elevate e pressione atmosferica. Questi metodi definiti tradizionali mostrano numerosi svantaggi tra cui costi elevati e una potenziale degradazione del prodotto proprio per le elevate temperature, i tempi di estrazione prolungati e tossicità dei solventi. Ad oggi, le principali alternative che vengono utilizzate sono anidride carbonica supercritica, microonde, incapsulamento e ultrasuoni (Ahmadkelayeh & Hawboldt, 2020).

3. CHITINA E CHITOSANO

3.1 DEFINIZIONE E STRUTTURE CHIMICHE

La chitina, è un polisaccaride di origine naturale di notevole importanza, identificato per la prima volta nel 1884; è il secondo polisaccaride più biodisponibile dopo la cellulosa (Younes & Rinaudo, 2015). È un composto prodotto da molti organismi (**Tabella 3**) tra cui funghi, alghe, esoscheletri di insetti, molluschi e gusci di crostacei in cui il contenuto di chitina risulta essere molto differente. (**Tabella 4**).

Tabella 3. Fonti di chitina (Hamed et al., 2016).

Kingdom/Phylum	Subphylum/Class	Groups/Species
Arthropods	Insects	Beetles, silkworm (<i>Bombyx mori</i>), <i>Aedes aegypti</i> ,
	Crustaceans	Crabs, shrimps, lobsters, prawns, krill
	Arachnids	Scorpions, spiders
Mollusks	Gastropods	Opisthobranchia
	Bivalves	
	Cephalopods	Squid pen beaks, cuttlefish bones
Fungi	Eurotiomycetes	<i>Aspergillus niger</i>
	Mucormycotina	<i>Mucor rouxii</i>
	Saccharomycetes	<i>Candida albicans</i>
Algae	Bacillariophyceae	Diatoms
	Phaeophyceae	brown algae
	Chlorophyceae	green algae

Tabella 4. Contenuto di chitina da diversi fonti (Hamed et al., 2016).

Organisms	Chitin content (%)	References
Crustaceans		
<i>Nephro</i> (lobster)	69.8 ^a	Synowiecki & Al-Khateeb, 2003
<i>Euphausia superb</i> (krill)	24 ^a	Arbia et al., 2013
<i>Homarus</i> (lobster)	60–75 ^a	
<i>Crangon crangon</i> (Shrimp)	17.8 ^a	
<i>Lepas</i> (goose barnacle)	58.3 ^a	
<i>Chionoecetes opilio</i> (Crab)	26.6 ^a	
Insects		
<i>Blatella</i> (cockroach)	18.4 ^a	Kaur & Dhillon, 2013
<i>Coleoptera</i> (ladybird)	27–35 ^a	
<i>Diptera</i>	54.8 ^a	
<i>Pieris</i> (butterfly)	64.0 ^a	
<i>Bombyx</i> (silk worm)	44.2 ^a	
<i>Galleria</i> (wax worm)	33.7 ^a	
Fungi		
<i>Aspergillus niger</i>	42.0 ^b	Synowiecki & Al-Khateeb, 2003
<i>Penicillium notatum</i>	18.5 ^b	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	19.5–42 ^b	
<i>Saccharomyces gutulata</i>	2.3 ^b	
<i>Mucor rouxii</i>	9.4 ^b	
Siboglinidae	33 ^c	Crini, Guibal, Morcellet, Torri, & Badot, 2009
Cnidaria	3–30 ^d	Crini et al., 2009
Brachiopod	4–29 ^a	Crini et al., 2009
Mollusks	6–40 ^e	Crini et al., 2009
Squid, cuttlefish, octopus		

^a chitin % compared to the dry mass of exoskeletons.

^b chitin % relative to the dry mass of mycelium.

^c chitin % is given compared to the dry mass of tube worm.

^d chitin % is given compared to the dry mass of membranes and egg capsules.

^e chitin % is based on the dry mass of cuttlebone, pen and beaks.

La chitina (C₈H₁₃O₅N)_n, o poli (β-(1→4) -N -acetil- d -glucosamina), è un polisaccaride lineare cationico composto da unità β-DN-acetilglucosamina legate con legami β (1 → 4) (**Figura 6**). È un polisaccaride che viene definito rigiro questo dovuto ai legami β che si trovano situati tra il carbonio C-1 e C-4. La sua cristallinità dipende dalla disposizione delle catene polimeriche e in particolare dalla posizione delle unità 2- N , N' -diacetilchitobiosio che formano due catene in antiparallelo nella sua struttura; e sulla base degli allomorfi cristallini vengono distinte tre diverse forme ovvero α, β e γ. L'α-chitina è composta da catene antiparallele, è il più abbondante e possiamo ritrovarla in pareti cellulari di funghi e lieviti, nei tendini dei krill, nell'aragosta e nei gusci dei gamberi. La β-chitina è costituita da catene parallele, risulta essere più rara rispetto all'α-chitina e si trova legata alle proteine del gladio (osso) dei calamari. La γ-chitina, invece, è costituita sia da catene parallele che antiparallele (**Figura 7**) (Mohan et al., 2022; Younes & Rinaudo, 2015).

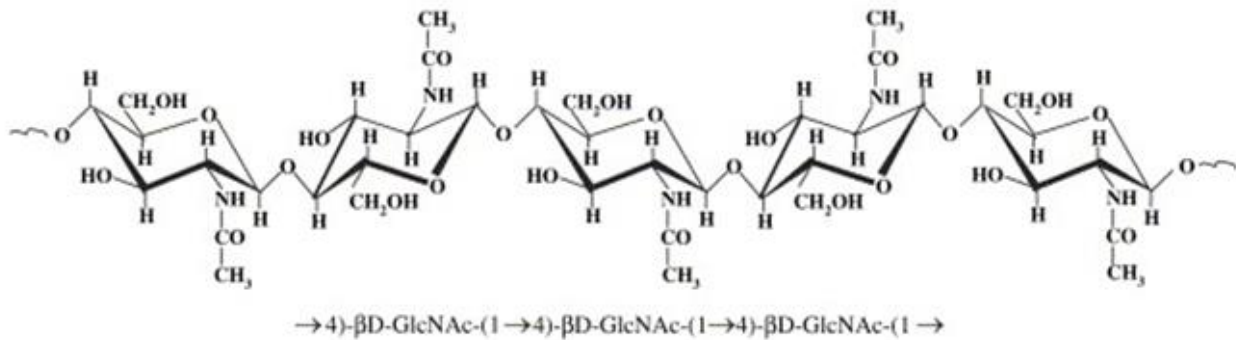


Figura 6. Struttura primaria della chitina (Harish Prashanth & Tharanathan, 2007).

Allo stato puro la chitina si presenta con una colorazione che va dal bianco al giallo, e risulta essere inodore e insapore. È altamente idrofoba e quindi insolubile in acqua e da parte dei principali solventi organici. La sua limitata solubilità è da attribuire al forte legame idrogeno intermolecolare che rende la chitina un materiale rigido. Alcuni dei solventi in cui è possibile solubilizzarla sono esafluoroisopropanolo, esafluoroacetone e cloroalcoli in combinazione con soluzioni acquose di acidi minerali e dimetilacetammide contenente il 5% di cloruro di litio.

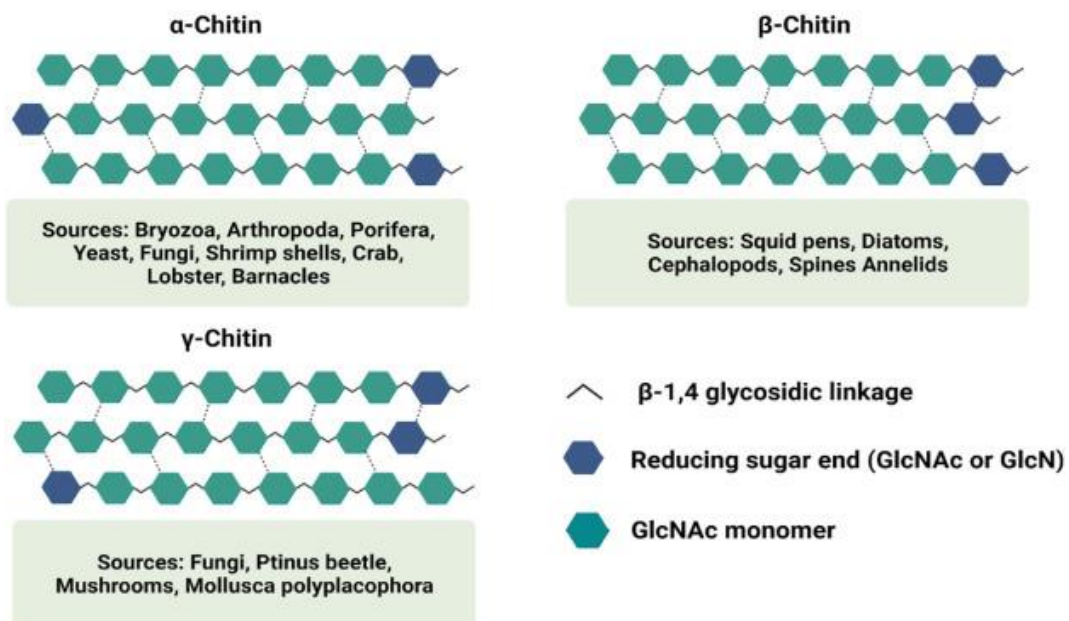


Figura 7. Immagine dei 3 diversi allomorfi della chitina α, β, γ che differiscono per l'orientamento delle rispettive catene polimeriche all'interno della macrostruttura microfibrillare (Mohan et al., 2022).

La forma deacetilata della chitina prende il nome di chitosano. Il chitosano (C₆H₁₁O₄N) è un biopolimero cationico e la sua struttura è costituita da β-(1 → 4)-2-acetamido- d -glucosio e β-(1 →

4)-2-ammino- d -unità di glucosio, la conversione da chitina a chitosano avviene tramite idrolisi dei gruppi acetamidici con la disposizione *trans* dei sostituenti C-2/C-3 nell'anello dello zucchero (**Figura 8**). La differenza tra chitina e chitosano è data dal grado di acetilazione, quanto il grado di DA (espresso come percentuale mole) risulta essere inferiore al 50% in moli, il prodotto prende il nome di chitosano. Durante la fase di deacetilazione vengono rimossi i gruppi acetile ma avviene anche una reazione di depolimerizzazione la quale viene indicata da una variazione del peso molecolare del chitosano.

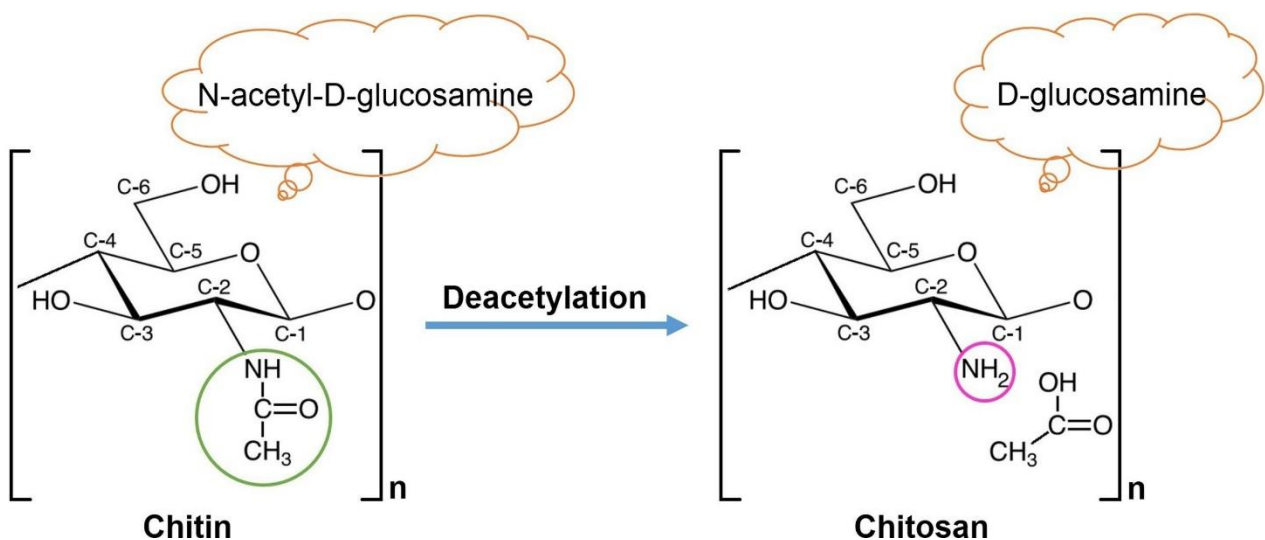


Figura 8. Deacetilazione della chitina a chitosano (Pakizeh et al., 2021).

Il chitosano contiene gruppi amminici sensibili al pH, che lo rendono neutro nel pH alcalino e caricato positivamente nel pH acido (Azelee et al., 2023). Risulta essere più solubile rispetto alla chitina questo dovuto alla presenza di gruppi amminici in posizione C-2, è solubile in soluzioni acide più acquose come l'acido acetico, citrico, formico e lattico. Questa differente solubilità è riconducibile ai gruppi amminici dei residui della D-glucosamina, essi infatti permettono la solubilità in soluzioni acquose acide diluite (pH<6) mediante protonazione di NH_2 . Tuttavia risulta essere insolubile in acqua e nella maggior parte dei solventi organici. Inoltre, il chitosano può formare complessi ionici con varie specie anioniche naturali o semplici come proteine e DNA; questo risulta essere possibile grazie alla presenza di gruppi amminici protonati i quali formano un policatione (Pakizeh et al., 2021).

Il chitosano in natura esiste in diverse forme polimorfiche, si presenta con una struttura rigida e cristallina dovuto alla presenza di legami idrogeno intramolecolari e intermolecolari (Harish Prashanth & Tharanathan, 2007).

Per depolimerizzazione del chitosano si ottengono i chitooligosaccaridi (COS), caratterizzati da un grado di polimerizzazione inferiore a 20 ed una massa molecolare medio inferiore a 3900 Da. Si mostra un crescente interesse per questi polimeri, che presentando bassa massa molecolare, bassa viscosità e corte catene, risultano più adatti per alcune applicazioni industriali. Oltre alle peculiari caratteristiche di solubilità in acqua, presentano importanti attività biologiche tra cui la riduzione della colesterolemia, l'incremento delle difese immunitarie, oltre che proprietà antibatteriche e antitumorali (Hamed et al., 2016).

3.2 METODI DI ESTRAZIONE DELLA CHITINA

Dagli scarti dei gusci dei crostacei viene recuperata la maggior parte della chitina, i metodi che vengono maggiormente utilizzati sono i metodi chimici, anche se, ad oggi, si sta convergendo sempre di più verso metodi che risultano essere più sostenibili.

3.2.1 ESTRAZIONE DELLA CHITINA MEDIANTE METODO CHIMICO

Attualmente il metodo di estrazione chimico della chitina risulta essere il più comunemente utilizzato in commercio nonostante presenti numerosi svantaggi antieconomici, ecologiche e influenzano negativamente le proprietà fisico-chimiche. Entrando nel dettaglio del metodo chimico esso prevede, successivamente a lavaggio, essiccazione e riduzione in frammenti o polveri, tre fasi: demineralizzazione, deproteinizzazione e decolorazione (**Figura 9**). La demineralizzazione prevede il trattamento della materia prima in polvere con acido cloridrico (HCL) a temperatura ambiente per 2-3 ore. Questo trattamento ha come scopo di rimuovere tutti i costituenti minerali come carbonato di calcio, fosfato di calcio e altri minerali presenti all'interno dei sottoprodotti dei crostacei. Successivamente avviene la deproteinizzazione, anche se questi due passaggi risultano essere invertibili quando l'interesse ricade sulla chitina. Per la deproteinizzazione viene effettuato un trattamento alcalino, le soluzioni in maggior misura utilizzate sono idrossido di sodio o idrossido di potassio con concentrazioni comprese tra 1% e il 10% e temperature comprese tra i 30°C e i 100°C. I tempi di reazione utilizzati vanno tra i 30 minuti alle 12 ore. Infine, qualora si desideri ottenere un prodotto incolore può essere effettuata una fase aggiuntiva di decolorazione. Per la rimozione dei

pigmenti possono essere utilizzati acetone o una miscela di solventi organici (Hamed et al., 2016; Kim, 2010).

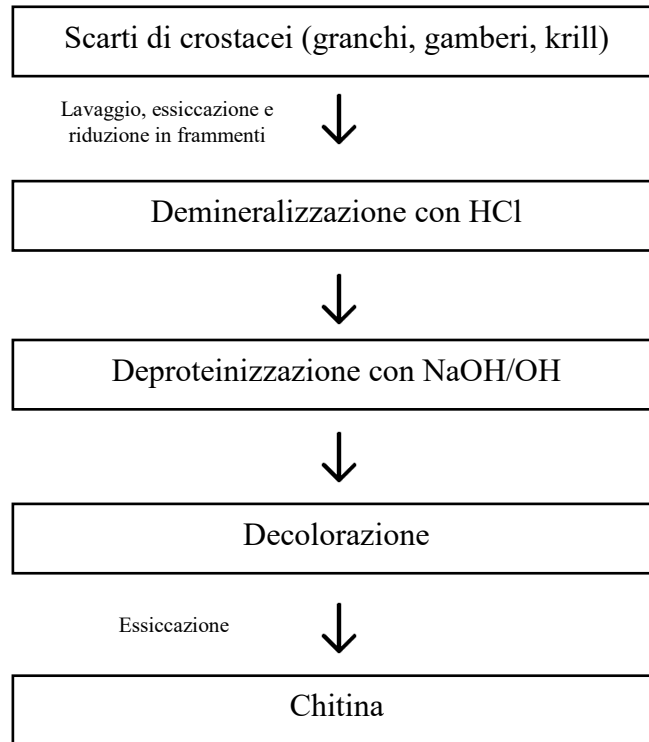


Figura 9. Diagramma di flusso estrazione chitina metodo chimico

3.2.2 ESTRAZIONE DELLA CHITINA MEDIANTE TRATTAMENTI BIOLOGICI

Con la crescente attenzione nei confronti dei temi ambientali, si è cercato di convergere l'attenzione verso differenti metodiche per l'estrazione della chitina i quali non prevedessero l'utilizzo di trattamenti acidi e alcalini che appunto potrebbero essere fonte di problemi ambientali. (Hamed et al., 2016). Inoltre, i metodi chimici generano residui e necessitano di un grande quantitativo di acqua in ogni fase del processo per la neutralizzazione e il lavaggio. Nell'estrazione della chitina mediante metodo biologico i processi di demineralizzazione e deproteinizzazione vengono affidati alla fermentazione batterica che producono acidi organici come acido lattico e acido acetico per il processo di demineralizzazione. Mentre per il processo di deproteinizzazione vengono utilizzati batteri che producono proteasi (**Figura 10**). Il processo biologico può essere compiuto o in una singola fase di fermentazione tramite l'utilizzo di una singola coltura batterica o in cui fasi di

fermentazione/ o co-fermentazione utilizzando due batteri. Ma, nell'ultimo decennio, l'attenzione è stata posta verso la fermentazione in due fasi questo perché permette di limitare i danni della bioestrazione della chitina utilizzando un processo fermentativo a stadio singolo. Sono diverse le tipologie di micorganismi che vengono utilizzati nei processi fermentativi a due stadi, ad esempio per la demineralizzazione troviamo *Lactobacillus casei* MRS1, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, una coltura mista di batteri batterici da yogurt biologico, *Lactobacillus acidophilus* FNCC116 e *Lactobacillus acidophilus*. Invece, per la demineralizzazione vengono utilizzate colture di arricchimento da fanghi di depurazione e carne macinata, *Bacillus licheniformis* F11.1, *Serratia marcescens* B742 ed *Exiguobacterium profundum*. In alcuni casi lo stesso batterio può essere utilizzato sia per la demineralizzazione che per la deproteinizzazione, come con *Pediococcus acidilactici* CFR2182. L'intero processo di fermentazione può avere tempistiche molto differenti, dai 4 ai 6 giorni fino ad un massimo di 12 giorni (Sixto-Berrocal et al., 2023).

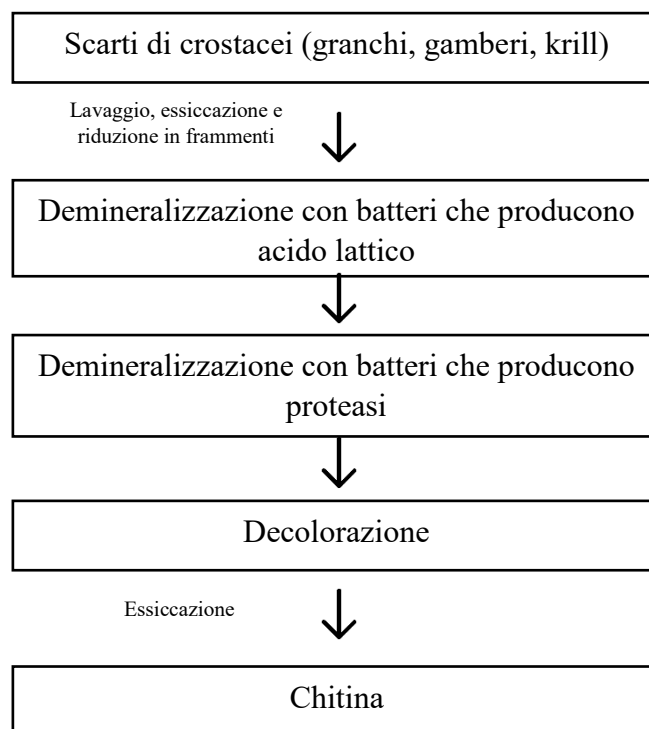


Figura 10. Diagramma di flusso estrazione chitina tramite trattamenti biologici

3.3 DEACETILAZIONE DELLA CHITINA

Il chitosano è un biopolimero ottenuto tramite deacetilazione parziale della chitina. Il grado di deacetilazione viene definito come il rapporto glucosamina/N-acetil glucosamina, che aumenta man

mano la chitina viene convertita in chitosano. La deacetilazione può essere eseguita tramite metodo alcalino o tramite metodo enzimatico.

3.3.1 DEACETILAZIONE DELLA CHITINA CON METODO ALCALINO

Successivamente alle fasi di demineralizzazione, deproteinizzazione e decolorazione per l'ottenimento della chitina, può essere effettuato una conversione in chitosano tramite deacetilazione con metodo alcalino. Questo metodo prevede la miscelazione della chitina con il 40-50% di idrossido di sodio NaOH (**Figura 11**). I trattamenti alcalini idrolizzano i gruppi acetili determinando la trasformazione delle unità N-acetil-D- GLUCOSAMINA in unità di D-GLUCOSAMINA con gruppi $-NH_2$ liberi. Il diverso grado di deacetilazione dipende da diversi fattori come temperatura di reazione, tempo di reazione e concentrazione della soluzione salina. Ad oggi, si sta spostando sempre di più l'attenzione verso metodi di deacetilazione enzimatici, questo perché i trattamenti alcalini possono causare inquinamento ambientale in quanto richiedono un ingente quantitativo di energia portando inoltre all'ottenimento di chitosano di scarsa qualità (Hamed et al., 2016).

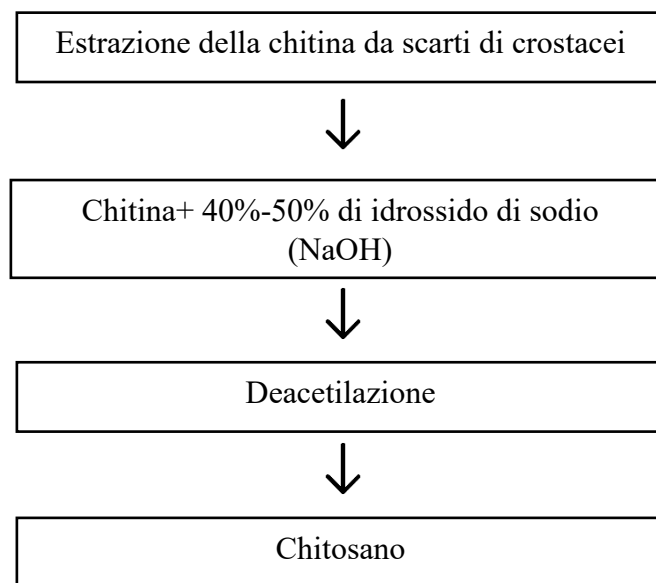


Figura 11. Diagramma di flusso deacetilazione chitina con metodo alcalino.

3.3.2 DEACETILAZIONE DELLA CHITINA CON METODO ENZIMATICO

La deacetilazione della chitina avviene grazie a enzimi chitina deacetilasi i quali rimuovono i gruppi acetili dalla chitina. Questa attività enzimatica è stata riscontrata in alcuni insetti in cui si pensa che essa consenta loro di idrolizzare alcuni materiali presenti nella loro riserva alimentare, ma, il

chitosano risulta anche essere presente nella parete cellulare di alcuni funghi. L'utilizzo di funghi produttori di enzimi risultano avere alcune problematiche legata ad una bassa resa di ceppi di produttori di deacetilasi, una bassa attività enzimatica e requisiti di fermentazione complicati. Per questo, ad oggi, gli attuali ceppi fungini possono essere sostituiti con batteri produttori di chitina deacetilasi. I batteri risultano avere una crescita più rapida e facilitata rispetto ai funghi nei sistemi di fermentazione (Hamed et al., 2016). (**Figura 12**)

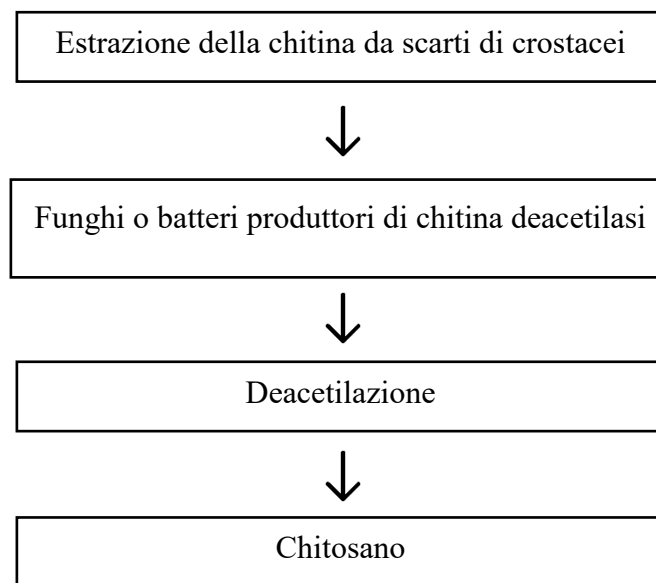


Figura 12. Diagramma di flusso deacetilazione chitina con metodo enzimatico.

3.4 PROPRIETÀ

Per la chitina e il chitosano risulta esserci un numeroso interesse in diversi ambiti tra cui quello biomedico, biotecnologico e farmaceutico. Questo interesse è dovuto a diverse proprietà come analgesiche, antitumorali, emostatiche, ipocolesterolemizzante, antimicrobiche e antiossidanti.

3.4.1 PROPRIETÀ ANTIMICROBICHE

Il chitosano esibisce numerosi vantaggi in quanto possiede un'attività antimicrobica più elevata, uno spettro di attività più ampio, una capacità di eliminare microorganismi più elevata e una minore tossicità nei confronti delle cellule dei mammiferi. Il meccanismo riconducibile all'inibizione della

crescita batterica è dovuto al polimero carico positivamente il quale si combina con componenti anionici dell'acido N -acetilmuramico, l'acido sialico e l'acido neuraminico, sulla superficie cellulare.

Le diverse modalità di azione del chitosano differiscono in base a peso molecolare. Il chitosano a basso peso molecolare si pensi penetri nella parete dei batteri, si combini con il DNA provocando una inibizione della sintesi dell'mRNA e la trascrizione del DNA. Invece, il chitosano ad alto peso molecolare potrebbe interagire con la superficie cellulare alterandone la permeabilità o formare uno strato impermeabile attorno alla cellula bloccandone così il trasporto dei soluti essenziali nella cellula (Younes & Rinaudo, 2015). Il chitosano mostra un'ampia attività antimicrobica sia nei confronti dei gram-positivi che gram-negativi (Harish Prashanth & Tharanathan, 2007). L'idrofilia della parete cellulare e la carica negativa della superficie cellulare risultano essere più elevate nei batteri gram-negativi rispetto ai gram-positivi; questo ci indica che in condizioni acide, le superfici cellulari cariche negativamente interagiscono con maggiore intensità con il chitosano carico positivamente. Inoltre, il grado di acetilazione del chitosano influisce sulla quantità di chitosano adsorbito. Infatti, un DA più basso, un MW più basso e un pH più basso danno una maggiore efficienza (Younes & Rinaudo, 2015). Ad esempio, l'attività antimicrobica aumenta con l'aumento del MW del chitosano nei confronti di *S.aureus*, mentre per *E.coli* l'attività antibatterica aumenta con la diminuzione del MW.. Il chitosano inoltre, riduce la crescita miceliale, l'infezione fungina, la produzione di sporangi, il rilascio di zoospore e la germinazione dei funghi (Younes et al., 2014).

3.4.2 PROPRIETÀ ANTIOSSIDANTI

Le specie reattive dell'ossigeno i ROS, come radicale superossido, perossido di idrogeno e radicale idrossile, sono una delle principali cause dello stress ossidativo, che ha come diretta conseguenza l'incidenza di diverse patologie come cancro, malattie cardiovascolari e invecchiamento precoce. L'ossidazione dei lipidi alimentari provoca la formazione di sapori sgradevoli e composti chimici indesiderati che possono essere pericolosi per la salute. Per ridurre al minimo il processo di ossidazione negli alimenti vengono aggiunti alcuni antiossidanti sintetici come butilidrossianisolo (BHA), butilidrossitoluene (BHT), t-butilidrochinone (TBHQ) e propil gallato. Ma, a causa dei potenziali rischi per la salute associati all'utilizzo di questi antiossidanti sintetici, si è rivolto l'interesse verso antiossidanti di origine naturale. Proprio per questo, negli ultimi decenni si è posta l'attenzione verso la chitina e i suoi derivati, perché studi hanno dimostrato che ad esempio il chitosano agisce come antiossidante. Il chitosano agisce come donatore di idrogeno neutralizzando i radicali dell'ossigeno

come idrossile, superossido, alchile nonché i radicali DPPH altamente stabili. Anche per le proprietà antiossidanti, così come per le proprietà antimicrobiche, la capacità di eliminazione dei radicali del chitosano dipende dal grado di DA e dal MW. I chitosani a basso peso molecolare sono più attivi di quelli con peso molecolare più elevato (Hamed et al., 2016; Younes & Rinaudo, 2015).

3.4.3 PROPRIETÀ ANTITUMORALI

Attraverso sia studi in vitro che in vivo, è stato dimostrato che il chitosano e i suoi derivati possiedono attività antitumorali. Il chitosano presenta un effetto diretto sulle cellule tumorali inibendone la proliferazione e inducendo l'apoptosi. Altri studi hanno messo in evidenza altri modi di come il chitosano agisce nei confronti delle cellule tumorali, ovvero non ha come effetto diretto l'uccisione della cellula tumorale ma porta ad un aumento della produzione di linfocine con conseguente proliferazione di linfociti T citotossici. Ulteriori studi hanno invece rilevato che le nanoparticelle di chitosano potrebbero anche indurre la morte necrotica (Younes & Rinaudo, 2015).

3.5 APPLICAZIONI NEL SETTORE ALIMENTARE

3.5.1 PRODUZIONE DI BIOFILM

Come descritto precedentemente, risulta avere proprietà antimicrobiche, e proprio sfruttando queste proprietà si è arrivati alla formulazione di imballaggi attivi edibili. I biofilm derivanti da chitosano possono essere consumati insieme al prodotto e risultano essere biodegradabili. Inoltre, i film hanno buone proprietà in senso generale in quanto risultano essere trasparenti consentendo una visione del prodotto e quindi della qualità visiva da parte del consumatore, possiedono buone proprietà meccaniche che contribuiscono a un buon mantenimento del prodotto. Ma, l'attività primaria dei biofilms derivanti da chitosano è agire come ritardante della proliferazione microbica. Possono essere applicati in diversi tipi di alimenti, da frutta e verdura, a cereali ma anche carne e pesce. Oltre a fungere da barriera protettiva, i biofilms possono essere utilizzati come mediatori di composti bioattivi avendo sempre come scopo il miglioramento della qualità degli alimenti. I film bioattivi polimerici potrebbero anche essere combinati con diversi agenti antimicrobici come acidi organici, batteriocine quali nisina e latticina, estratti vegetali come timo, proteine, antibiotici e agenti chelanti (EDTA) per diminuire il deterioramento degli alimenti da parte di microrganismi patogeni e aumentare la shelf-life. Una limitazione nell'applicazione di questi biofilm potrebbe essere legata a una caratteristica

intrinseca del chitosano, ovvero è fortemente idrofilo rendendolo con una scarsa resistenza alla trasmissione dell'acqua e alla permeabilità dei gas. Una delle possibili soluzioni per ovviare questa problematica sarebbe l'utilizzo di biofilm a base di chitosano, in sistemi multistrato (Hamed et al., 2016; Younes & Rinaudo, 2015).

3.5.2 ADDITIVI ALIMENTARI

Gli additivi alimentari vengono da sempre utilizzati negli alimenti per apportarne miglioramenti al sapore, al colore e per la modulazione della consistenza. Il chitosano e derivati, grazie alle sue caratteristiche chimico-fisiche, e alla derivazione naturale, viene utilizzato sempre di più come additivo alimentare. Infatti, ad oggi, il consumatore va alla ricerca di alimenti in cui i diversi composti che si trovino all'interno, siano di derivazione naturale e comportino anche un rispetto per l'ambiente. Tra i diversi ruoli, risulta essere uno stabilizzante del colore, grazie alla sua elevata affinità con molte classi di coloranti come, avendo una velocità di diffusione simile a quello del colorante nella cellulosa. Come, introdotto precedentemente, il chitosano agisce come agente antiossidante, ossidazione che negli alimenti come carne e pesce avviene principalmente per l'ossidazione degli acidi grassi nei lipidi.

Risulta anche svolgere attività come agente gelificante. Un gelificante è una sostanza in grado di modificare la consistenza del prodotto in cui viene inserito, conferendogli una maggiore densità e stabilizzazione dei cristalli. Quando l'alimento presenta un pH maggiore del chitosano tra 6.5 e 6.8 il chitosano potrebbe agire gelificante aumentandone la viscosità, non comportando effetti tossici o allergeni poiché di derivazione naturale (Agulló et al., 2003).

3.5.3 CHITINA E CHITOSANO COME PROBIOTICI E PREBIOTICI

I consumatori, ad oggi, vanno sempre più alla ricerca di alimenti nutraceutici. Il termine nutraceutico deriva dall'unione dei termini nutrizionale e farmaceutico, con questo termine ci si riferisce a prodotti alimentari che contribuiscono ad un ulteriore beneficio della salute con effetti superiori comparati con gli alimenti "tradizionali". Sul mercato ad oggi sono presenti numerosi integratori alimentari a base di chitosano e derivati, essi sono commercializzati come riduttori di grasso, agenti per abbassare i livelli di colesterolemia e come agenti antiossidanti (Crini, 2022). Il chitosano e chitooligosaccaridi vengono utilizzati come fonte di fibre alimentari, essi infatti proprio per la loro non digeribilità da

parte degli enzimi intestinali per la presenza del legame β -(1-4) glicosidico possono essere definiti come prebiotici. Il chitosano e i suoi derivati hanno un effetto benefico sui batteri “buoni” presenti nel tratto gastrointestinale, come *Bifidobacterium* e *Lactobacillus sp.* (Hamed et al., 2016).

Inoltre, il chitosano, risulta avere delle funzioni simili quelle delle fibre solubili avendo un meccanismo di azione differente rispetto a quello della fibra alimentare solubile vegetale. Il chitosano si dissolve nell’ambiente acido dello stomaco, emulsionando i lipidi e precipitando nell’ambiente intestinale diminuendone la viscosità. Ha come diretta conseguenza un miglioramento della mobilità intestinale (Agulló et al., 2003)

4. TECNOLOGIE INNOVATIVE DI ESTRAZIONE

Oggi giorno, si va sempre di più alla ricerca di processi tecnologici alternativi, finalizzati ad un minore impatto ambientale con una potenziale riduzione di consumo di energia e residui tossici ma anche un miglioramento nell'efficienza di applicazione. I possibili processi tecnologici alternativi utilizzabili per il miglioramento dell'estrazione di composti dai sottoprodotti dei crostacei possono essere gli ultrasuoni (EAU), il campo elettrico pulsato (PEF) e il trattamento ad alte pressioni (HPP).

4.1 ULTRASUONI (EAU)

L'utilizzo degli ultrasuoni nel campo alimentare ha registrato un notevole aumento. Gli ultrasuoni permettono di ridurre al minimo la lavorazione, massimizzare la qualità e garantiscono una maggiore sicurezza sugli alimenti. Gli ultrasuoni utilizzano frequenze che vanno da da 20 kHz a 10 MHz, e differiscono in base alla quantità di energia generata come potenza sonora (W), intensità sonora (W/m^2) o densità di potenza sonora (W/m^3) (**Figura 13**). Alcuni studi hanno dimostrato che applicazione degli ultrasuoni porta ad un miglioramento della resa e contemporaneamente un miglioramento delle proprietà funzionali. Questo perché, determina una rottura della parete cellulare e quindi una facilitazione nella penetrazione del solvente nei sottoprodotti dei crostacei (Al Khawli et al., 2019).

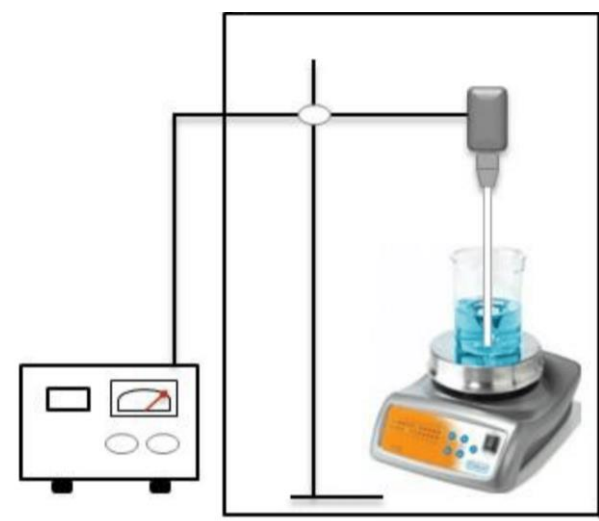


Figura 13. Rappresentazione schematica del processo di estrazione assistita da ultrasuoni

4.2 CAMPI ELETTRICI PULSATI (PEF)

I campi elettrici pulsati in campo alimentare possono sostituire o migliorare i processi tradizionali per la modifica degli alimenti o per la sanitizzazione. I trattamenti PEF prevedono l'applicazione di brevi impulsi elettrici ad alto voltaggio a matrici biologiche, inducendo il fenomeno noto come "elettroporazione". Questo processo è associato alla formazione di pori nella membrana cellulare, che facilitano il rilascio del contenuto cellulare intracellulare. In genere, in una cellula è presente un potenziale di membrana di circa 10 mV, quando viene esposto ad un campo elettrico esterno viene indotto un potenziale aggiuntivo che dipende dall'intensità del campo che viene applicato. Quando l'intensità del campo elettrico pulsato supera il valore soglia critico del potenziale di membrana di circa 1 volt, queste forze elettrostatiche causano una rottura elettrica. Una delle dirette conseguenze è l'aumento della permeabilità della membrana (Bhat et al., 2018). Il PEF potrebbe essere impiegato, ad esempio, nella valorizzazione dei sottoprodotti dei crostacei, con l'obiettivo di ottimizzare l'estrazione e il recupero dei composti bioattivi. Questa tecnologia rappresenta un approccio efficiente e innovativo per l'estrazione di biocomposti, offrendo vantaggi quali una maggiore permeabilità del solvente alla matrice, un miglior trasferimento di massa, la conservazione della bioattività e un incremento della resa.

4.3 ALTE PRESSIONI IDROSTATICHE (HPP)

La tecnologia HPP (High Pressure Processing) (**Figura 14**) è emersa come una valida alternativa ai metodi termici tradizionali per la conservazione degli alimenti. Questo approccio si basa sul principio di Pascal, secondo il quale "una pressione esercitata su un liquido incompressibile si distribuisce uniformemente in tutte le direzioni e con la medesima intensità in tutti i punti del liquido (pressione isostatica) e anche sulla superficie di un corpo (alimento) immerso nel liquido". Attraverso questa tecnica, la shelf-life degli alimenti viene estesa mediante l'applicazione di elevate pressioni, le quali inattivano la crescita microbica (de Rezende et al., 2022). L'impiego delle HPP come pretrattamento per ottimizzare i processi di estrazione di biocomposti risulta essere un'applicazione abbastanza recente. Attualmente, l'HPP è considerato come una potenziale tecnica di pretrattamento dei sottoprodotti, per ottimizzare il recupero dei possibili composti bioattivi in essi contenuti. Questa metodologia mira a ridurre l'impurità e prevenire la potenziale degradazione di composti bioattivi sensibili alle variazioni termiche (Shouqin et al., 2004).

La maggior parte degli studi presenti in letteratura riguarda il trattamento dei sottoprodotti dei crostacei con HPP per estrarre l'astaxantina. Nello studio condotto da (Irna et al., 2018) si evince che,

tramite l'applicazione di alte pressioni idrostatiche (HPP) a 210 MPa per circa 10 minuti e con miscela di solventi (acetone e metanolo 7:3 v/v), ha determinato un aumento significativo del contenuto di carotenoidi e della resa di astaxantina con tempi di estrazione più brevi.



Figura 14. Esempio sistema di trattamento degli alimenti ad alte pressioni idrostatiche HPP.

Attualmente, in letteratura esistono pochi studi che utilizzano le alte pressioni per estrarre chitina e chitosano. I polisaccaridi come la chitina e il chitosano sono carboidrati complessi composti da lunghe catene di unità monosaccaridiche. L'applicazione dell'HHP può portare a cambiamenti strutturali nei polisaccaridi, influenzandone le proprietà fisiche e chimiche. La modifica dei polisaccaridi da parte dell'HHP può avere vari effetti, tra cui cambiamenti nel peso molecolare, nella solubilità, nelle proprietà gelificanti e nella bioattività. Questa tecnologia potrebbe essere esplorata per il suo potenziale di miglioramento delle proprietà funzionali e nutrizionali dei polisaccaridi, rendendoli più adatti ad applicazioni specifiche nell'industria alimentare, farmaceutica e biomedica.

5. MATERIALI E METODI

5.1 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Gli scarti di produzione della specie *Pararpenaeus longirostris* (gambero rosa) (**Figura 15a**), pescati nel Mar Mediterraneo e Mar Adriatico e della specie *Aristaeomorpha foliacea* (gambero rosso) (**Figura 15b**), pescati nel Mar Mediterraneo e Mar ionico sono stati forniti dall'azienda Ecodesce Srl, con sede a Cesenatico, Italia. I sottoprodotti consistevano principalmente di esoscheletro degli animali, tra cui testa, gusci, pleopodi e coda. I sottoprodotti di entrambe le specie sono prima stati scongelati a temperatura ambiente e successivamente essiccati separatamente, in forno a 180°C per 2 ore. I sottoprodotti essiccati sono stati triturati fino ad ottenere una polvere omogenea per ogni specie di gambero.

5.2 PRETRATTAMENTO CON HPP

Successivamente, i campioni sono stati confezionati sotto vuoto all'interno di sacchetti trasparenti in PA/PE (poliammide/polietilene) (**Figura 16**) e trattati con HPP a tre diverse pressioni, 400MPa, 500MPa e 600 Mpa, tre repliche per ciascuna specie. L'impianto HPP utilizzata per questo pretrattamento è il modello Hiperbaric 420, con capacità di 420 litri (111 galloni) e il suo recipiente di 380 mm (15 pollici) di diametro, insieme agli 8 intensificatori ad alta pressione, consentono a questa unità di lavorare più di 2.600 kg/h (5.730 libbre/h). Le buste chiuse ermeticamente sottovuoto sono state collocate all'interno di una vaschetta, inserite nella camera dove hanno subito il trattamento con alte pressioni idrostatiche tramite un mezzo liquido (acqua). Nel momento in cui la pressione richiesta, 400, 500 e 600 MPa, è stata raggiunta, la pompa si è arrestata e la pressione è stata mantenuta costante per 10 min. Successivamente, il sistema è stato depressurizzato determinando la fine del trattamento.



Figura 15. Esoscheletro gambero rosso (a) e esoscheletro gambero rosa (b).

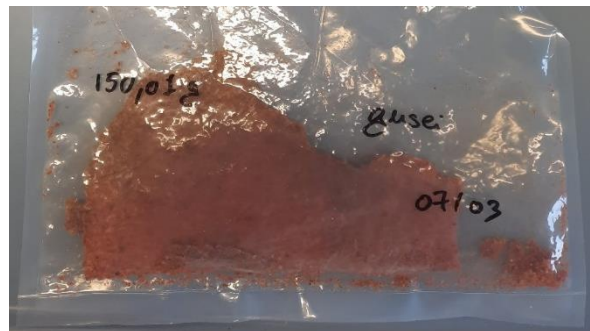
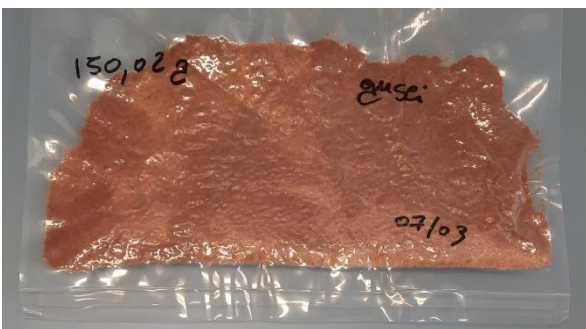


Figura 16. Esoscheletro gambero rosso (a) e esoscheletro gambero rosa (b).

5.3 ESTRAZIONE DELLA CHITINA

Per l'estrazione della chitina dai gusci di entrambe le specie è stato applicato il metodo chimico tradizionale, con una prima fase di demineralizzazione tramite soluzione diluita di acido cloridrico e successiva deproteinizzazione con una soluzione diluita di idrossido di sodio, seguendo il protocollo di estrazione descritto da (Tolaimate et al., 2003).

5.3.1 SOLUZIONI

Le soluzioni adoperate per trattare i sottoprodotti durante la fase di demineralizzazione e deproteinizzazione sono state preparate come descritto di seguito:

- HCl 0,55 M: la soluzione diluita di acido cloridrico prevedeva la miscelazione di 22.582 mL di HCl fumante 37% in 500 mL di acqua distillata
- NaOH 0.3 M: la soluzione di idrossido di sodio prevedeva la miscelazione di 12 g di NaOH e 1000 ml di acqua distillata.

5.3.2 DEMINERALIZZAZIONE

Per procedere con la fase di demineralizzazione, per entrambe le specie sono stati pesati esattamente circa 50g di gusci tritati e posti all'interno di un becker da 500 ml al quale sono stati aggiunti 500 ml (1:10 p/v) di HCl 0,55 M. Per entrambe le specie di gamberi, sono state effettuate due repliche per ciascun campione, sia non trattato sia trattato con le alte pressioni (HPP).

Il becker è stato posto su un agitatore magnetico e lasciato agitare per 15 minuti a temperatura ambiente (**Figura 17**). Dopo questa prima fase di miscelazione, il composto è stato filtrato tramite l'utilizzo di una beuta con filtro Büchner dotato di un filtro di carta, per eliminare il residuo di acido. (**Figura 18**)

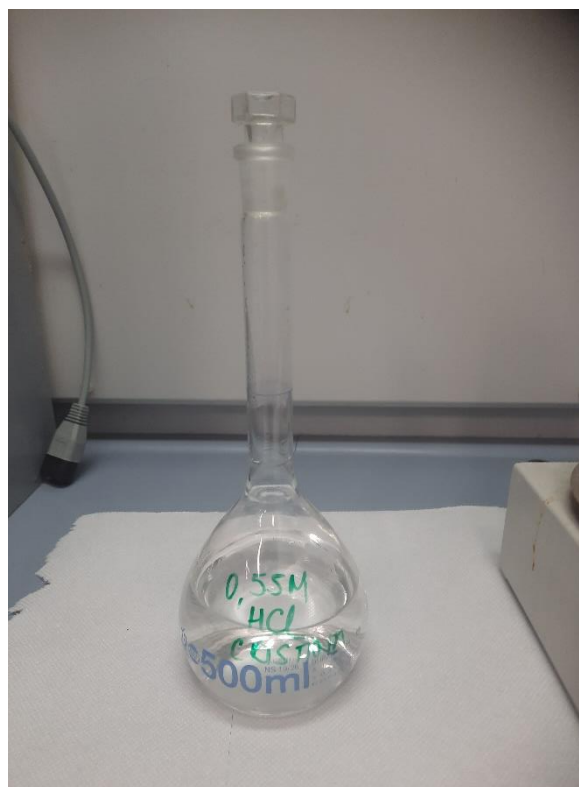
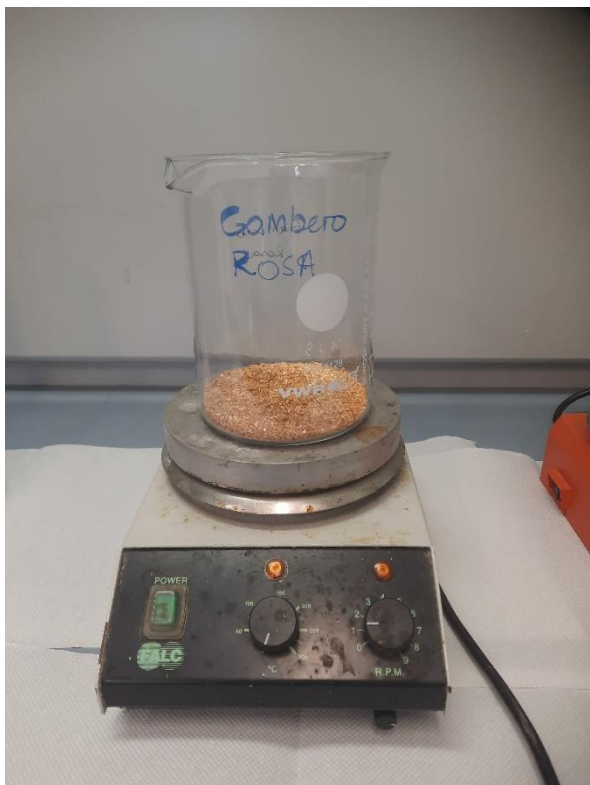


Figura 17. Becker con 50g di gusci di gamberi + soluzione di HCl 0,55 M.



Figura 18. Filtrazione sottovuoto

Il composto è stato sottoposto nuovamente in un becker da 500 ml con l'aggiunta di 500 ml di HCl 0,55 M e collocato un'altra volta sull'agitatore magnetico sempre per 15 minuti. Dopo di che, è stata eseguita un'altra filtrazione. Nell'ultimo passaggio, il composto sempre con l'aggiunto di 500 ml di HCl 0,55 M, è stato posto sull'agitatore magnetico ma questa volta per 1 h. Trascorso questo tempo ed effettuata la filtrazione, sono stati eseguiti diversi lavaggi del composto con acqua distillata fino ad ottenere un valore di pH di circa 7.0.

5.3.3 DEPROTEINIZZAZIONE

La fase di deproteinizzazione è stata eseguita ponendo i gusci demineralizzati in un becker da 800 ml aggiungendo 400 ml di soluzione NaOH 0,3 M. La miscela è stata posta in agitazione a 80°C per 1 h tramite l'utilizzo di agitatore magnetico riscaldante (**Figura 19**). Per ogni tipologia di campione non trattato e trattati con HPP alle tre diverse pressioni, 400, 500 e 600 MPa, sono state eseguite due repliche. Trascorsi i 60 minuti, la miscela è stata sottoposta a filtrazione tramite filtrazione sottovuoto per eliminare residui di soluzione basica. A questo punto, la procedura è stata nuovamente ripetuta, eseguendola per un totale di tre bagni.



Figura 19. Trattamento con soluzione NaOH 0,3 M a 80°C per la deproteinizzazione.

Dopo i bagni, il composto è stato sottoposto ad una serie di lavaggi fino al raggiungimento di pH di circa 8.0. A questo punto, il composto è stato posto in una piastra di Petri ad essiccare in stufa per una notte a 50°C.

5.4 DEACETILAZIONE DELLA CHITINA

Successivamente alle fasi di demineralizzazione, deproteinizzazione, per ottenere la conversione da chitina a chitosano è stato eseguito il processo di deacetilazione. È stato seguito il metodo chimico tradizionale, il quale prevede l'utilizzo di una soluzione concentrata di idrossido di sodio.

5.4.1 SOLUZIONI

La soluzione adoperata per il processo di deacetilazione della chitina è stata preparata come descritto di seguito:

- NaOH 50 %: per ottenere 200 mL di soluzione sono stati pesati 100g di NaOH e miscelati a 200mL di acqua distillata.

5.4.2 PROCEDURA

Per il processo di deacetilazione della chitina, sono stati posti in un becker da 400 ml 2 g di chitina al quale sono stati aggiunti 200 ml della soluzione di NaOH 50 %. La miscela è stata posta in agitazione a una temperatura di 80°C per 18 ore. A questo punto, la miscela è stata filtrata tramite filtrazione sottovuoto utilizzando una beuta Büchner dotato di un filtro di carta e sottoposto a lavaggi con acqua distillata fino al raggiungere un pH di circa 7.0.

5.5 CARACTERIZZAZIONE DELLA CHITINA E DEL CHITOSANO

5.5.1 RESE DI ESTRAZIONE

Per il calcolo della percentuale resa di estrazione della chitina è stata presa in esame la seguente equazione (Eq.1). Ovvero, è stato posto in relazione il peso secco totale dei gusci delle due specie di gamberi dopo trattamento con HPP e non trattati, prima del trattamento di estrazione (P1), con il peso secco della chitina estratta al termine del processo (P2). Per ogni tipologia di campione sono state condotte due repliche.

Eq.1.

$$R(\%) = \frac{P2}{P1} * 100$$

Per il calcolo della percentuale di resa di estrazione del chitosano, tramite deacetilazione della chitina, è stata presa in esame la seguente equazione (Eq.2). Ovvero, è stato posto in relazione il peso secco della chitina(P2) con il peso secco del chitosano estratto al termine del processo (P3).

Eq.2.

$$R(\%) = \frac{P3}{P2} * 100$$

5.5.2 SOSTANZA SECCA CHITINA

Per la determinazione della sostanza secca sia dei gusci che della chitina, sono stati pesati esattamente circa 3 g (m_i) di gusci tritati o di chitina per ogni tipologia di campione sia trattato che non trattato con HPP. I campioni sono stati posti all'interno di contenitori e posti ad essiccare in stufa a 105°C per 24 ore fino al raggiungimento di peso costante. Successivamente, sono stati nuovamente pesati (m_f) ed è stata calcolata la percentuale di sostanza secca (%s.s) tramite la seguente equazione(Eq3):

Eq.3.

$$\%s. s. = \frac{m_f}{m_i} * 100$$

Sono state condotte tre repliche sia per i gusci che per la chitina, e per ogni tipologia differente di trattamento con HPP e non.

5.5.3 CONTENUTO DI CENERI

Il contenuto di cenere è stato calcolato tramite analisi gravimetrica. Sono stati pesati esattamente circa 0,5 g di chitina o di gusci per ogni tipologia di campione trattato con HPP e non e posti all'interno di crogioli. Per ogni tipologia di campione sono state condotte tre repliche.

I crogioli, inseriti in muffola modello serie Z ad una temperatura di 550°C, sono rimasti lì per almeno 4 ore. Il valore delle ceneri è stato calcolato come rapporto tra il peso del residuo (P_2) e quello del campione (P_1) utilizzando la seguente equazione (Eq.4):

Eq. 4.

$$\% \text{ cenere} = \frac{(P_2)}{(P_1)} \times 100$$

5.5.4 CONTENUTO DI AZOTO TOTALE

Per la determinazione del contenuto di azoto totale è stato utilizzato il metodo tradizionale Kjeldhal (AOAC 981.10,1990). L'analisi si divide principalmente in 3 fasi:

- Mineralizzazione → in questa fase si trasforma tutto il materiale organico in anidride carbonica e acqua, e per la presenza dell'acido solforico (H_2SO_4) i sali vengono trasformati in solfati e azoto proteico ($-NH_2$) in solfato di ammonio $(NH_4)_2SO_4$.
- Distillazione → dopo aver neutralizzato l'acido solforico in eccesso con una soluzione concentrata di idrossido di sodio (32%), gli ioni ammonio sono trasformati in ammoniaca libera (NH_3) che viene distillata e raccolta in quantità nota di acido in eccesso.
- Titolazione → la quantità di ammoniaca prodotta verrà determinata tramite titolazione acido base.

Il valore è espresso come contenuto di proteine grezze in quanto si mineralizza non solo l'azoto dei gruppi amminici delle proteine, ma anche da altre fonti, come l'urea e l'azoto ammoniacale.

5.5.4.1 Procedimento

Direttamente su carta filtrante tipo Wathman 541 (ashless- N.free) è stato pesato esattamente circa 0,5 g di campione (gusci o chitina). Richiuso il campione nella carta, è stato inserito nel tubo da 250 ml per la mineralizzazione insieme a 2-3 palline di vetro (per facilitare i moti convettivi ed evitare forti reazioni), 15 ml di acido solforico concentrato (96%), 3 ml di acqua ossigenata (H_2O_2) e il catalizzatore (la quantità di catalizzatore varia in rapporto al prodotto usato; con le Kjeltabs AA16, contenenti 3,5 g di K_2SO_4 e 0,175g HgO per pastiglie, ne servono 2). Per ogni campione sono state realizzate tre repliche.

Un tubo, in cui verranno messi tutti i reagenti e la carta Wathman tranne il campione, è stato utilizzato per determinare il "bianco".

I tubi sono stati inseriti nel mineralizzatore portando prima la temperatura a 380 °C e poi, quando i tubi hanno terminato di "fumare", a 420°C. di solito il processo di mineralizzazione dura 45-60 m, ma comunque un'indicazione dell'avvenuta mineralizzazione si può ottenere dal colore della soluzione che dal nero passa ad un azzurro acceso una volta mineralizzata.

Nel mineralizzatore è presente una soluzione basica (p.e. NaOH al 16%) in cui è stata aggiunta della fenoftaleina (viola con pH superiore a 8,3, incolore con pH inferiore) che serve per tamponare i fumi acidi prodotti dalla mineralizzazione.

Terminata la mineralizzazione, i tubi sono stati lasciati raffreddare prima della demineralizzazione. Successivamente, sono stati aggiunti 10 ml di idrato di sodio al 32 % e 10 ml di acqua demineralizzata. L'ammoniaca, distillata tramite flusso di vapore, è stata raccolta in una beuta dove

sono stati aggiunti 20 ml di una soluzione di acido borico (H_3BO_3) al 4% con indicatore ammoniacale (Merks, Mix Indicator 5).

A questo punto, si è effettuata la titolazione con acido solforico 0.1 N misurando attentamente con una beuta graduata gli ml necessari (il colore della soluzione da verde vira al viola). Il “bianco” è stato titolato con la stessa procedura.

Il distillatore in automatico effettua anche la titolazione dell'eccesso di acido rimasto (non consumato dall'ammoniaca liberata) e percepisce il viraggio grazie ad un sensore. In questo modo il sistema elabora il dato analitico.

I grammi di azoto (P_1) nel campione si calcolano moltiplicando gli ml di acido usati per la titolazione del campione (A) a cui si sottraggono gli ml di acido per la titolazione del bianco (B) moltiplicati per 0.1401 (g di N titolati da 1 ml di acido solforico 0.1 N).

5.5.5 COLORE

Per la determinazione dell'analisi colorimetrica è stato utilizzato uno strumento spettrofotocolorimetro tristimolo modello Colorflex EZ (Hunterlab, Reston, VA) equipaggiato con un porta campione (diametro 64 mm) (**Figura 20**). La determinazione del colore dei diversi campioni di chitina e chitosano è stata effettuata utilizzando la scala di colore CIE-Lab, con gli indici L, a^* , b^* e l'illuminante D65. I risultati cromatici sono stati espressi nello spazio di colore attraverso i valori numerici corrispondenti alle seguenti coordinate cromatiche (**Figura 21**):

- L^* (luminosità) → indica la coordinata luminosità dove 0 corrisponde al nero, assenza di luminosità, e 100 corrisponde al bianco, massima luminosità);
- a^* (indice di rosso/ verde) → $+a^*$ corrispondente all'asse dei valori positivi e quindi colori con componente rossa, $-a^*$ corrispondente all'asse dei valori negativi e quindi colori con componente verde;
- b^* (indice di giallo/blu) → $+b^*$ corrispondente all'asse dei valori positivi e quindi colori con componente giallo, $-b^*$ corrispondente all'asse dei valori negativi e quindi colori con componente blu.



Figura 20. Colorimetro tristimolo Hunterlab USA mod. Colorflex EZ

Inoltre, il centro del piano è acromatico, la distanza dall'asse centrale rappresenta la saturazione del colore (C^*), mentre l'angolo tra gli assi di cromaticità rappresenta la tonalità (hue).

Prima della determinazione colorimetrica, lo strumento è stato calibrato con una mattonella di colore bianco ed una mattonella di colore nero, successivamente la calibrazione è stata validata utilizzando una mattonella di colore verde. Per ogni campione sono state effettuate 3 repliche da cui si è ricavata una media.

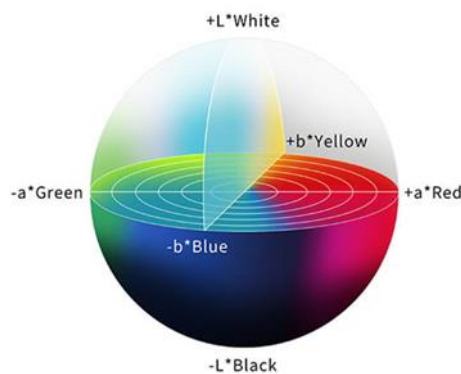


Figura 21. Spazio-colore CIE $L^*a^*b^*$ (CIE, Commission Internationale de l'Eclairage).

5.5.6 CALORIMETRIA DEFFERENZIALE A SCANSIONE

La calorimetria differenziale a scansione (DSC) è la tecnica analitica maggiormente impiegata per la caratterizzazione termica di polimeri e materiali polimerici. Un calorimetro DSC misura i flussi di calore associati alle transizioni termiche che si verificano in un campione quando questo è riscaldato o raffreddato quindi in condizioni dinamiche o mantenuto a temperatura costante quindi in condizioni isotermitiche. Per poter misurare un flusso di calore, dato che non si tratta di una grandezza assoluta,

si necessita di un riferimento che, sollecitato termicamente in modo analogo al campione in esame, ci permetta di ottenere un segnale differenziale.

Per effettuare l'analisi, è stato utilizzato un calorimetro differenziale a scansione DSC Q20 (TA Instrument, Germany), dotato di un'unità di raffreddamento (TA-Refrigerated Cooling System90). I campioni sono stati inseriti in capsule di alluminio di 50 μ l, in un quantitativo di esattamente circa 3 mg, e chiusi ermeticamente (**Figura 22**). Prima delle misurazioni calorimetriche lo strumento è stato calibrato, le temperature e le entalpie di fusione sono state calibrate con acqua distillata (p.f. 0,0°C), indio (p.f. 156,60°C) e zinco (p.f. 419,47°C); il flusso di calore è stato calibrato usando il calore di fusione dell'indio ($\Delta H=28,71$ J/g). Per la velocità di riscaldamento, utilizzata successivamente anche per la misurazione dei campioni, è stata calibrata tramite un n flusso di azoto secco 50 mL/min.

Per ogni tipologia di campione sono state condotte tre repliche, utilizzando una capsula vuota come riferimento. Per l'ottenimento delle curve calorimetriche, i campioni sono stati scaldati seguendo un programma prestabilito da 15 a 450°C con una velocità di scansione di 5°C/min.



Figura 22. Esempio capsule di alluminio di 50 μ l con chitina

5.5.7 SPETTROSCOPIA INFRAROSSA A TRASFORMATATA DI FOURIER (FTIR-ATR)

La spettroscopia in trasformata di Fourier, è una tecnica analitica utilizzata per l'identificazione di materiali organici e polimerici. Nel nostro caso, lo strumento utilizzato per l'analisi è il Perkin Elmer (Perkin-Elmer-1725- X spectrophotometer), con accessorio ATR. Lo strumento FTIR invia una radiazione infrarossa compresa tra circa 10.000 e 100 cm^{-1} attraverso un campione, con una parte della radiazione assorbita e una parte attraversata. La radiazione assorbita viene convertita in energia rotazionale e/o vibrazionale dalle molecole del campione. Il segnale risultante al detector si presenta

come uno spettro, tipicamente da 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} , che rappresenta un'impronta molecolare del campione. Ogni molecola o struttura chimica produrrà un'impronta spettrale unica, rendendo l'analisi FTIR un ottimo strumento per l'identificazione chimica.

Quando si cerca di focalizzare il raggio su piccole aree di interesse, come nel nostro caso, viene utilizzato un accessorio micro-ATR sul banco FTIR per focalizzare il raggio su un singolo cristallo ATR di rimbalzo. Con la capacità di osservazione ottica attraverso la cella ATR è possibile posizionare il campione in modo che entri in stretto contatto con il cristallo ATR con l'area irradiante che occupa circa 0,2 mm di diametro.

Il campione da analizzare viene posto sotto la punta dello strumento e viene eseguita una leggera pressione girando la manopola pressione, è lo stesso strumento a fornire l'indicazione di quando la pressione eseguita è sufficiente. Per ogni tipologia di campione sono state eseguite cinque repliche, effettuato per confermarne la riproducibilità, dalle quali sono state eseguite, successivamente, le medie per l'interpretazione dei risultati.

È necessaria una interpretazione dello spettro IR, e per poterlo fare è necessario rispettare dei pre-requisiti, anche se non vi sono delle specifiche regole:

- è necessaria una calibrazione dello strumento con degli standard come il polistirene,
- lo spettro deve essere sufficientemente risolto
- bisognerebbe analizzare spettri di campioni puri.

Lo spettro IR viene interpretato mettendolo a confronto con spettri di molecole note presenti in letteratura. Le due zone più importanti per un'analisi preliminare di uno spettro sono le regioni comprese tra 4000 e 1300 e tra 900 e 650 cm^{-1} (**Figura 23**).

Nella regione 4000 e 1300 cm^{-1} si osservano tutte le caratteristiche vibrazioni di stretching per i gruppi funzionali più importanti, come l'OH, l'NH, il C=O e il C=C. L'assenza di osservazione di bande di assorbimento in questa zona risulta essere di grande importanza, in quanto limita fortemente i tipi di composti che possono essere presi in considerazione per assegnare la struttura del composto di cui si sta analizzando lo spettro. Ma, in alcuni casi, alcune caratteristiche strutturali possono far sì che una banda diventi talmente larga da passare inosservata.

Nella regione attorno ai 300 cm^{-1} si osservano le caratteristiche vibrazioni di stretching per gli idrogeni legati a carboni insaturi. Se presenti queste indicazioni è necessario stabilire il tipo di insaturazione utilizzando altre informazioni dello spettro.

Per evidenziare altri gruppi funzionali, quali eteri o alogeni, si esamina lo spettro tra 1500 e 600 cm^{-1} , ciò risulta essere particolarmente importante se lo studio iniziale dello spettro non ha rilevato la presenza dei gruppi funzionali più usuali.

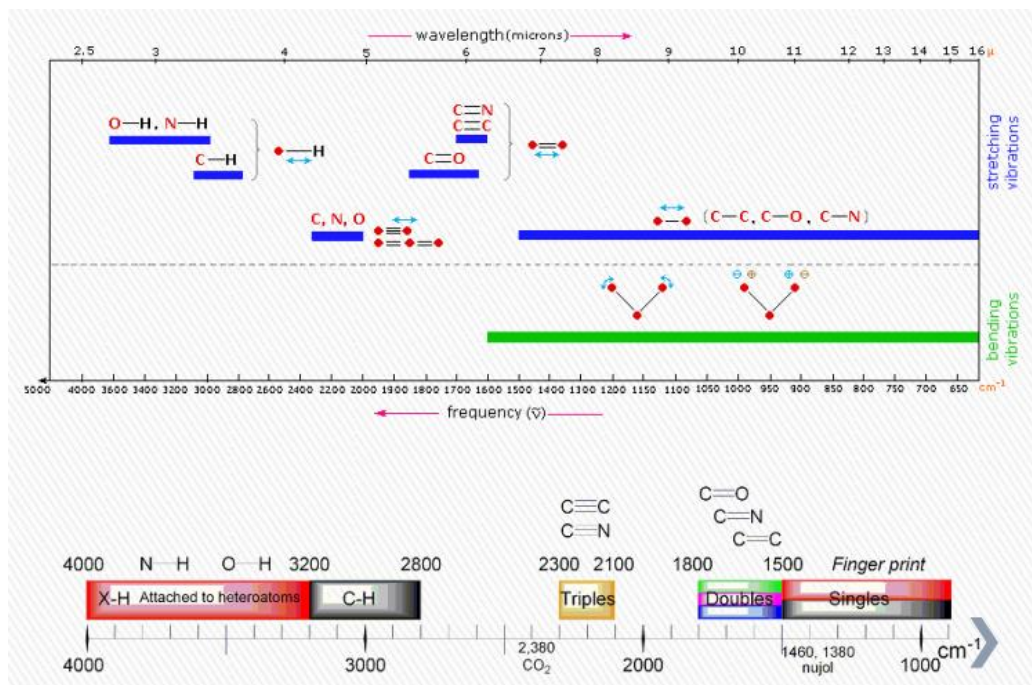


Figura 23. Frequenze di assorbimento infrarosso caratteristiche dei gruppi funzionali

5.5.8 GRADO DI DEACETILAZIONE

L'analisi spettroscopica ha permesso di determinare il grado di deacetilazione dei campioni di chitina e chitosano. Il grado di acetilazione (DA%) è stato determinato utilizzando l'equazione proposta da Moore and Robert, 1978 (Eq. 4). Utilizzando i valori di assorbanza delle lunghezze d'onda 1655 (A_{1655}) e 3450 (A_{3450}) di ogni campione.

Eq. 5.

$$DA (\%) = \frac{[(A_{1655} \div A_{3450})]}{1.33} \times 100$$

Dove il fattore 1.33 rappresenta il rapporto A_{1655}/A_{3450} per il chitosano completamente N-acetilato (Moore et al.,2023)

5.4.9 CAPACITÀ DI LEGARE L'ACQUA

Per la determinazione della capacità di legare l'acqua della chitina sono stati pesati esattamente circa 0,5 g di chitina ed inseriti all'interno di una provetta eppendorf da centrifuga al quale sono stati aggiunti esattamente circa 3 g di acqua. Le diverse eppendorf sono state chiuse, tramite apposito tappo a vite, e inserite all'interno di una centrifuga, modello Ettich Zentrifugen Rotofix 32 A, per 25 min a 32 mila giri. Successivamente, dopo aver prelevato le eppendorf dalla centrifuga sono state lasciate a riposo per 15 min prima della determinazione della capacità di legare l'acqua della chitina. Trascorso questo tempo, dalle eppendorf è stata rimossa l'acqua che non si era legata alla chitina, ponendo attenzione a non toccare il pellet che si era formato, ed effettuando una pesatura del pellet.

Per le diverse tipologie di campione sono state eseguite tre repliche delle quali successivamente si è determinata la capacità di legare l'acqua tramite la seguente equazione (Eq.6)

Eq. 6.

$$WBC(\%) = \frac{P_2}{P_1} \times 100$$

P_2 = peso dell'acqua legata

P_1 = peso del campione di chitina

5.4.10 CAPACITÀ DI LEGARE L'OLIO

Per la determinazione della capacità di legare l'olio della chitina sono stati pesati esattamente circa 0,5 g di chitina ed inseriti all'interno di una provetta eppendorf da centrifuga da 15ml al quale sono stati aggiunti esattamente circa 3 g di olio. Le diverse eppendorf sono state chiuse, tramite apposito tappo a vite, e inserite all'interno di una centrifuga, modello Ettich Zentrifugen Rotofix 32 A, per 25 min a 32 mila giri. Successivamente, dopo aver prelevato le eppendorf dalla centrifuga sono state lasciate a riposo per 15 min prima della determinazione della capacità di legare l'olio della chitina. Trascorso questo tempo, dalle eppendorf è stato rimosso l'olio in eccesso, ponendo attenzione a non toccare il pellet che si era formato, ed effettuando una pesatura del pellet.

Per le diverse tipologie di campione sono state eseguite tre repliche delle quali successivamente si è determinata capacità di legare l'olio tramite la seguente equazione (**Eq.7**). Successivamente per ogni replica è stata calcolata la media e la deviazione standard.

Eq. 7.

$$FBC(\%) = \frac{P_2}{P_1} \times 100$$

P_2 = peso dell'olio legato

P_1 = peso del campione di chitina

5.4.11 DETERMINAZIONE VISCOSIMETRICA DEL PESO MOLECOLARE DEL CHITOSANO

Al fine di ottenere indicazioni sul peso molecolare dei campioni di chitosano ottenuti, ne è stata calcolata la viscosità inerente tramite misure di viscosità in soluzione.

La strumentazione consiste in un viscosimetro a caduta Schott Geräte di tipo Ubbelodhe 531 13/Ic (d.i. 0,84 mm), un apparato per la misurazione automatica del tempo di efflusso con l'ausilio di fotocellule, un bagno termostato mantenuto alla temperatura di 25 °C ed un termometro analogico per il controllo della temperatura del bagno.

Una soluzione di chitosano a 0,5 g/L è stata preparata in 0.3M di acido acetico e 0.2 M di acetato di sodio, la soluzione è stata omogenizzata per facilitare la dissoluzione del chitosano e filtrata con filtri siringa in acetato di cellulosa da 0,45 µm. Il tempo di flusso sia del solvente (t_s) che delle soluzioni di chitosano (t) è stato misurato a 25 °C per ciascuna con 5 repliche.

Il peso molecolare viscosimetrico $[M]$ è stato calcolato secondo l'equazione di Mark-Houwink-Sakurada (**Eq. 8**).

Eq.8

$$[\eta] = KM^a$$

dove $[\eta]$ = viscosità intrinseca, $K = 0,074 \text{ mL/g}$ e $a = 0,79$.

I valori dei parametri K e a dipendono sia dal sistema polimero-solvente sia dalla temperatura. L'esponente a è un parametro di conformazione del polimero che diminuisce con l'aumentare della compattezza molecolare. Pertanto, in questo studio sono stati utilizzati i valori $K = 0,0474 \text{ mL/g}$ e $\alpha = 0,723$ per i campioni di chitosano (Rinaudo et al., 1993) Il peso molecolare medio è stato espresso in g/mol o KDa (1 KDa = 1000 g/mol).

5.4.12 ANALISI STATISTICA

Sui dati risultanti dalle analisi condotte sui campioni di gusci, chitina e chitosano non trattati e trattati alle tre diverse pressioni idrostatiche, è stata eseguita l'analisi della varianza (ANOVA) ad una via al fine di evidenziare eventuali differenze statisticamente significative tra i gruppi di campioni per il parametro analizzato. Il livello di significatività è stato impostato a $P \leq 0.05$ con un intervallo di confidenza al 95%. L'analisi statistica dei dati è stata condotta utilizzando il software STATISTICA 8.0 (Statsoft, Tulsa, USA).

6. RISULTATI E DISCUSSIONE

6.1 RESE DI PROCESSO

Le rese di estrazione di chitina e chitosano per entrambe le specie di gambero, in relazione alle tre diverse pressioni di trattamento con HPP, sono rappresentate nella **figura 24**. Dai risultati ottenuti, si osserva che sia nel gambero rosa che in quello rosso il pretrattamento con HPP a 400 MPa e 500 MPa ha determinato un notevole incremento nella resa di estrazione della chitina, ad eccezione del trattamento a 600 MPa, dove si è registrato un aumento solo nel gambero rosso.

Nel gambero rosa non trattato con HPP, la resa di estrazione è stata del 12,02%, mentre con il pretrattamento a 400 MPa è salita al 20,82%. Il trattamento più efficiente è stato a 500 MPa, con una resa del 23,56%. Il trattamento a 600 MPa ha registrato la minore resa tra quelli sottoposti a pretrattamento con HPP (15,47%), tuttavia, è comunque superiore rispetto ai campioni non trattati, sebbene la differenza non sia statisticamente significativa.

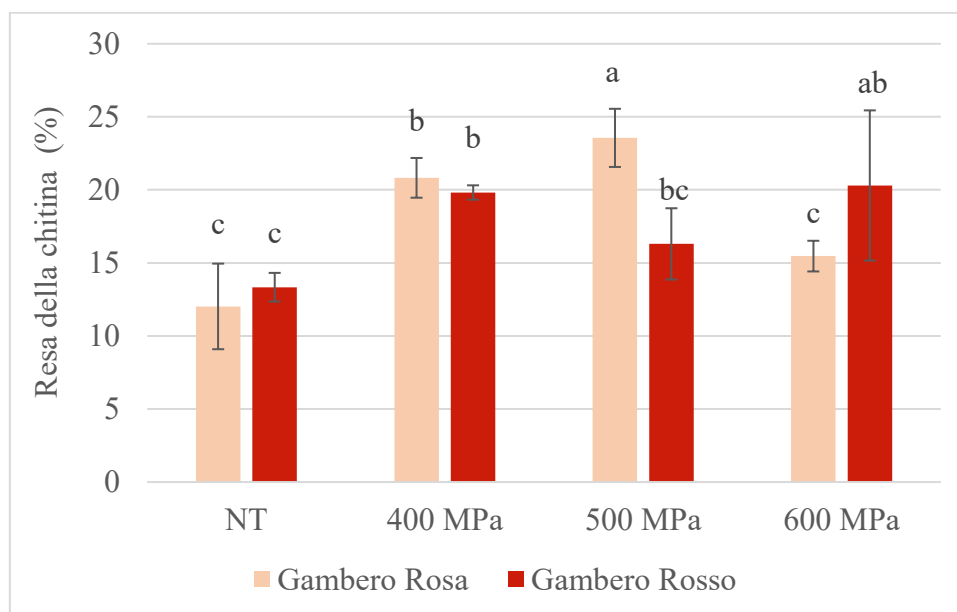


Figura 24: Rese di estrazione della chitina.

Lettere diverse indicano differenze significative con $p < 0,05$.

Per quanto riguarda il gambero rosso, si è osservato un aumento nella resa di estrazione sia nei trattamenti a 400 che a 600 MPa. La resa da gusci non trattati è stata del 13,34%, mentre con il trattamento a 400 MPa si è ottenuta una resa del 19,82%, seguita da una resa del 20,30% con il

trattamento a 600 MPa. In particolare, il pretrattamento con HPP a 600 MPa ha determinato la migliore resa di estrazione.

La chitina è stata convertita in chitosano e la resa di estrazione del chitosano è stata calcolata sulla base del peso secco dei gusci. Dai dati ottenuti delle rese del processo di deacetilazione della chitina del gambero rosa e rosso (**Figura 25**), il trattamento con HPP non ha apportato differenze significative nelle rese del chitosano trattato e non trattato con HPP.

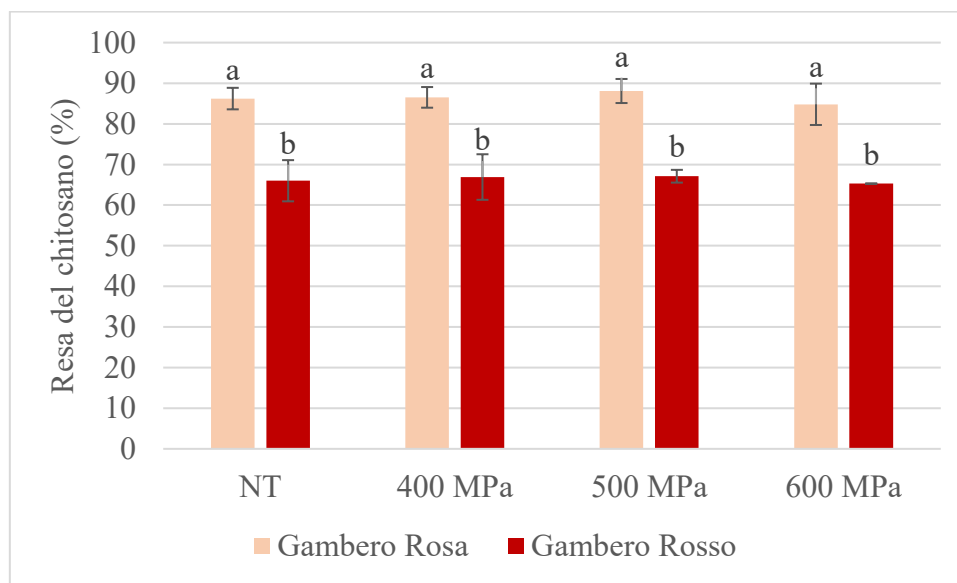


Figura 25. Rese di estrazione del chitosano.

Lettere diverse indicano differenze significative con $p < 0,05$.

Il rendimento dei processi di estrazione di chitina e chitosano varia in base a fattori come la specie, il metodo di estrazione, la dimensione delle particelle, la purezza e la scelta di solventi e sostanze chimiche (Hajji et al., 2014). In questo studio, si è notato che la specie di gambero rosa ha mostrato una maggiore efficienza di estrazione di chitina e chitosano, indipendentemente dai trattamenti, in confronto con il gambero rosso.

6.2 SOSTANZA SECCA

Il contenuto di sostanza secca sia dei gusci che della chitina è riportata nella **Tabella 5**.

Nei gusci dei gamberi rosa il trattamento con HPP alle tre diverse pressioni ha determinato un aumento della percentuale di sostanza secca estratta rispetto ai gusci non trattati. Al contrario, nei gusci di gambero rosso il trattamento con HPP alle tre diverse pressioni ha determinato una diminuzione della percentuale di sostanza secca estratta rispetto ai gusci non trattati con HPP.

Per quanto riguarda la percentuale di sostanza secca della chitina nel gambero rosa, si è avuto una diminuzione nei campioni trattati a 400 MPa e 500 MPa, mentre nel campione trattato a 600 MPa si è avuto un aumento dell'estrazione di sostanza secca.

Anche la percentuale di sostanza secca della chitina del gambero rosso segue uno stesso trend molto simile, determinando una leggera diminuzione nel campione trattato a 400 MPa e un aumento nel campione trattato a 600 MPa.

Tabella 5. Percentuale di sostanza secca dei gusci e della chitina, di gambero rosa e gambero rosso non trattati e trattati con HPP a 400 MPa. 500MPa e 600 MPa.

Specie	Sostanza secca gusci (%)			
	NT	400 MPa	500MPa	600MPa
Gambero Rosa	96.53 ± 1.04 ^a	96.76 ± 1.83 ^a	96.56 ± 1.39 ^a	96.02 ± 2.37 ^a
Gambero Rosso	84.70 ± 0.08 ^c	93.14 ± 2.77 ^b	95.31 ± 0.17 ^a	93.31 ± 2.25 ^b
Specie	Sostanza secca chitina (%)			
	NT	400 MPa	500MPa	600MPa
Gambero Rosa	98.00 ± 0.39 ^b	99.08 ± 0.27 ^a	99.08 ± 0.30 ^a	97.62 ± 1.56 ^b
Gambero Rosso	97.74 ± 0.3 ^a	97.75 ± 0.17 ^a	96.56 ± 0.26 ^{ab}	96.06 ± 0.91 ^b

**Lettere diverse nella stessa linea mostrano le differenze significative ($p < 0.05$) tra i campioni.*

6.3 CONTENUTO DI CENERI

Il contenuto di ceneri nella chitina e chitosano è un indicatore importante della fase di demineralizzazione e dell'efficacia della rimozione del carbonato di calcio. Alla fine del processo di estrazione un chitosano di alta qualità dovrebbe avere un contenuto di ceneri inferiore all'1% (Jahan et al., 2010) .Il contenuto di cenere nei gusci e nella chitina del gambero rosa e del gambero rosso, sono riportati nella **Tabella 6.**

Tabella 6. Contenuto di ceneri (%) nei gusci e nella chitina di gambero rosa e gambero rosso non trattati e trattati con HPP.

Specie	Ceneri gusci (%)			
	NT	400 MPa	500MPa	600MPa
Gambero Rosa	35.74 ± 2.00 ^a	33.60 ± 1.00 ^b	30.06 ± 0.05 ^c	31.98 ± 0.24 ^b
Gambero Rosso	27.18 ± 0.65 ^a	25.86 ± 0.37 ^b	25.45 ± 0.04 ^b	24.92 ± 0.44 ^b
Specie	Ceneri chitina (%)			
	NT	400 MPa	500MPa	600MPa
Gambero Rosa	0.28 ± 0.06 ^b	0.29 ± 0.05 ^b	0.42 ± 0.66 ^a	0.41 ± 0.57 ^a
Gambero Rosso	0.03 ± 0.01 ^b	0.10 ± 0.09 ^a	0.00	0.00

**Lettere diverse nella stessa linea mostrano le differenze significative ($p < 0.05$) tra i campioni.*

Osservando i valori di ceneri ottenuti dai gusci si evince una significativa diminuzione del contenuto di ceneri in entrambe le specie dopo il processo di demineralizzazione, sia nei campioni trattati con HPP che in quelli non trattati. La percentuale di ceneri presente nei gusci del gambero rosa è stata in media del 35,74%, mentre nel gambero rosso è stata significativamente inferiore, registrando una media del 27,18%. Per il gambero con un maggiore percentuale di ceneri (Gambero rosa), il trattamento con HPP ha significativamente diminuito il contenuto di ceneri. Infatti, si passa da un valore percentuale di 35,74%, a un valore di 30,06% nei gusci campione trattati a 500 MPa.

Il contenuto di ceneri nei campioni di chitina estratta da entrambe le specie di gambero diminuisce drasticamente, raggiungendo quasi lo zero alla fine del processo di estrazione, in particolare nei campioni di chitina del gambero rosso trattati a 500 MPa e 600 MPa.

6.4 CONTENUTO DI AZOTO

Il contenuto di azoto nei gusci e nella chitina del gambero rosa e del gambero rosso, sono riportati nella **Tabella 7**. Il trattamento con HPP ha determinato una variazione nell'estrazione del contenuto di azoto dai gusci del gambero rosa. Infatti, dai dati ottenuti vediamo che mentre un trattamento a 400 e 500 MPa dei gusci ha determinato una diminuzione della percentuale di azoto contenuta nei gusci, i gusci trattati a 600 MPa presentano un maggiore contenuto di azoto.

Anche nel caso dei gusci di gambero rosso trattamento con HPP ha determinato una variazione del contenuto di azoto. Infatti, sia nei gusci trattati a 400, 500 e 600 MPa si è determinato un aumento del contenuto di azoto, registrando un maggiore contenuto di azoto i gusci trattati a 500 MPa.

Uguualmente, è stato determinato il contenuto di azoto nella chitina di gambero rosa e gambero rosso non trattati e trattati con HPP. Nel caso del gambero rosa il trattamento con HPP alle tre diverse pressioni idrostatiche ha avuto come conseguenza una diminuzione del contenuto di azoto nella chitina.

Nel gambero rosso, il trattamento con HPP a 400, 500 e 600 MPa ha determinato nei primi due casi, 400 e 500 MPa, una riduzione del contenuto di azoto totale, mentre dalla chitina estratta da campione trattato con HPP a 600 MPa si è registrato un aumento del contenuto di azoto totale.

Tabella 7. Contenuto % di azoto in gusci e chitina di gambero rosa e gambero rosso non trattati e trattati con HPP.

Specie	Contenuto di azoto gusci (%)			
	NT	400 MPa	500MPa	600MPa
Gambero Rosa	6.66 ± 0.12 ^b	6.36 ± 0.20 ^c	6.45 ± 0.11 ^c	7.04 ± 0.01 ^a
Gambero Rosso	6.11 ± 0.07 ^b	6.60 ± 0.14 ^a	7.05 ± 0.08 ^a	6.76 ± 0.08 ^a

Specie	Contenuto di azoto chitina (%)			
	NT	400 MPa	500MPa	600MPa
Gambero Rosa	6.38 ± 0.03 ^a	6.05 ± 0.10 ^b	6.23 ± 0.07 ^b	6.20 ± 0.05 ^b
Gambero Rosso	5.28 ± 0.07 ^a	5.06 ± 0.06 ^b	5.14 ± 0.11 ^{ab}	5.28 ± 0.07 ^a

**Lettere diverse nella stessa linea mostrano le differenze significative ($p < 0.05$) tra i campioni.*

6.5 COLORE

Come si può osservare nella **Figura 26 (A)** e **Figura 27 (A)**, il trattamento con HPP ha causato un notevole aumento di inscurimento dei gusci del gambero rosa, mentre lo stesso trattamento non ha influenzato la colorazione dei gusci del gambero rosso.

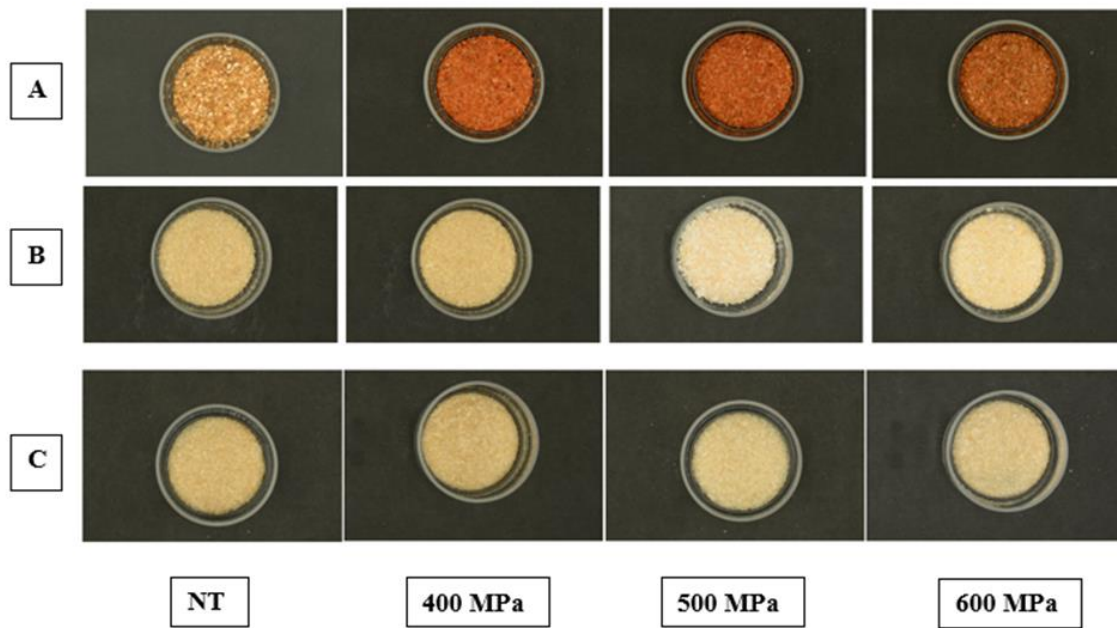


Figura 26. Immagine della polvere di gusci (A), chitina (B) e chitosano (C) estratti dai gamberi rosa, non-trattati (NT) e trattati con HPP a 400, 500 e 600 MPa.

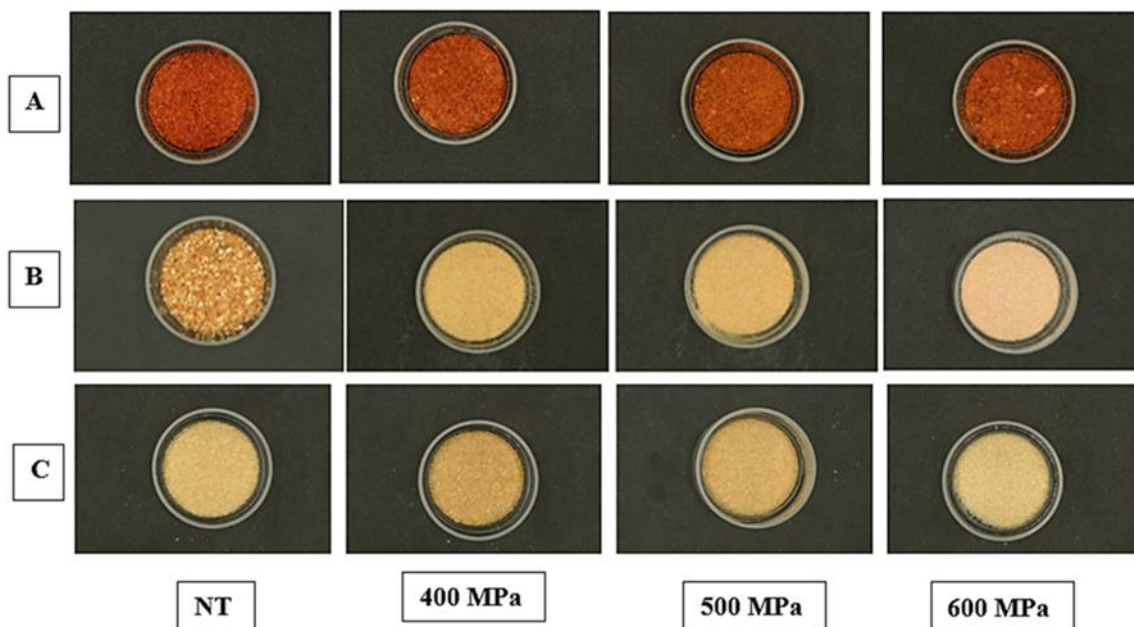


Figura 27. Immagine della polvere di gusci (A), chitina (B) e chitosano (C) estratti dai gamberi rossi, non-trattati (NT) e trattati con HPP a 400, 500 e 600 MPa.

I risultati dei valori dei parametri L^* , a^* , b^* ottenuti dall'analisi colorimetrica dei campioni di gusci, sono riportate nelle **Figure 28, 29 e 30**.

L'indice di luminosità (L^*) dei gusci del gambero rosa subisce una riduzione in tutti e tre i campioni trattati con HPP a 400 MPa, 500 MPa e 600 MPa rispetto ai non trattati con HPP. Al contrario, i gusci del gambero rosso mostrano un aumento dell'indice di luminosità (L^*) nei campioni trattati con HPP a tutti i diversi livelli di pressione (400 MPa, 500 MPa e 600 MPa) (**Figura 28**).

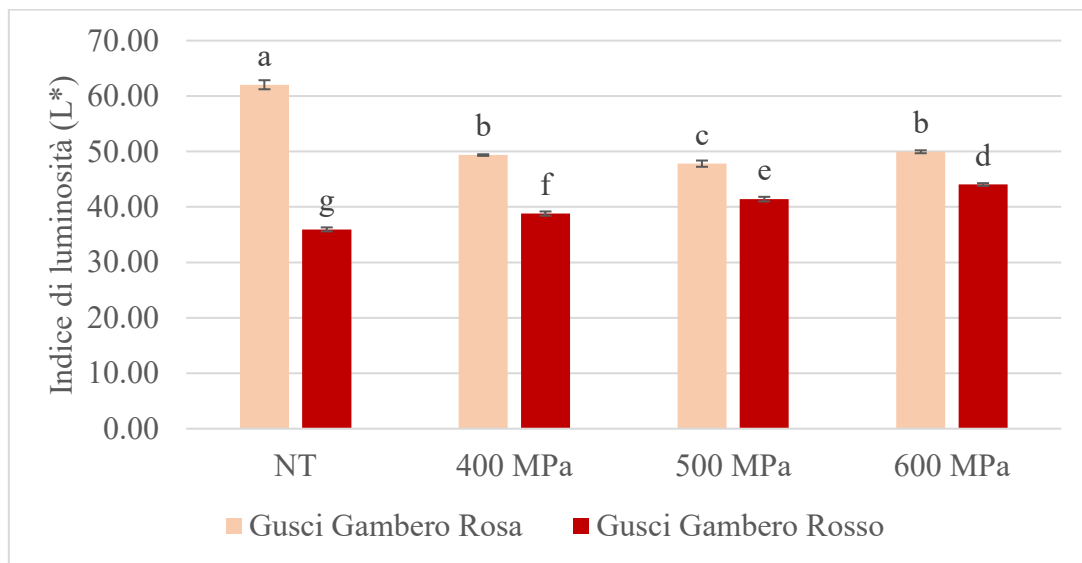


Figura 28. Indice di Luminosità dei gusci del gambero rosa (a) e del gambero rosso (b). *Lettere diverse mostrano le differenze significative ($p < 0.05$) tra i campioni.

I risultati dei valori di indice di rosso dei gusci di gambero rosa trattati con HPP, rispettivamente a 400 MPa, 500 MPa e 600 MPa, mostrano differenze statisticamente significative rispetto ai gusci non trattati con HPP. In particolare, i gusci di gambero rosa che risultano avere l'indice di rosso più alto sono quelli trattati con HPP a 400 e 500 MPa. Al contrario, i gusci di gambero rosso trattati con HPP mostrano un indice di rosso significativamente inferiore rispetto ai gusci non trattati con HPP.

Inversamente ai gamberi rosa e i gusci di gambero rosso trattati con HPP a 400 MPa, 500 MPa e 600 MPa mostrano un indice di rosso significativamente inferiore rispetto ai gusci non trattati con HPP (**Figura 29**).

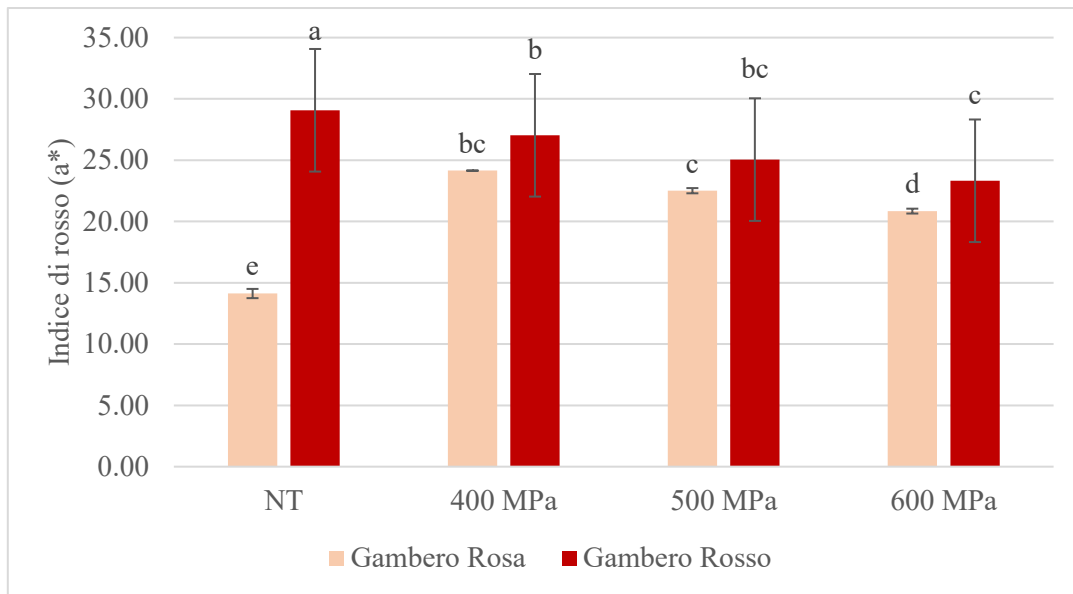


Figura 29. Indice di rosso dei gusci del gambero rosa e del gambero rosso. *Lettere diverse mostrano le differenze significative ($p < 0.05$) tra i campioni.

I risultati dei valori di indice di giallo dei gusci di gambero rosa trattati con HPP, rispettivamente a 400 MPa, 500 MPa e 600 MPa, mostrano differenze statisticamente significative rispetto ai gusci non trattati con HPP (**Figura 30**). In particolare, i gusci di gambero rosa che risultano avere l'indice di giallo più alto sono quelli trattati con HPP a 400 MPa, seguito poi da quelli trattati a 600 MPa e infine a 500 Mpa.

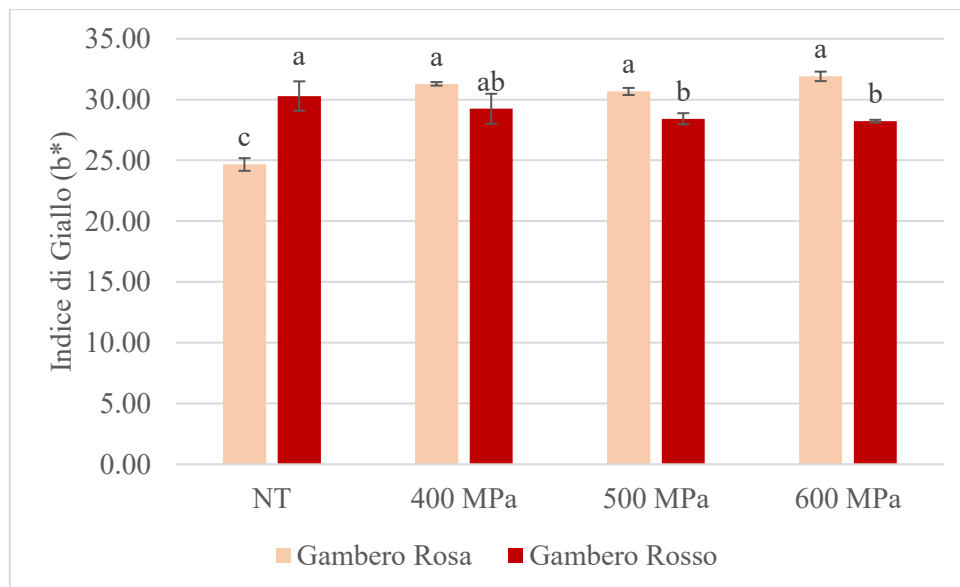


Figura 30. Indice di giallo dei gusci del gambero rosa e del gambero rosso. *Lettere diverse mostrano le differenze significative ($p < 0.05$) tra i campioni.

I gusci di gambero rosso trattati con HPP a 500 e 600MPa, presentano un indice di giallo minore rispetto ai gusci non trattati con HPP (**Figura 30**).

I risultati dei valori dei parametri L*, a*, b* ottenuti dall'analisi colorimetrica dei campioni chitina sono riportate nelle **Figure 31, 32 e 33**.

Dalla **Figura 31(a)** possiamo notare come l'indice di luminosità della chitina estratta del gambero rosa aumenta con il trattamento a 500 e 600MPa. Invece, il campione trattato con HPP a 400 MPa risulta avere un indice di luminosità simile rispetto alla chitina derivante dal campione non trattato con HPP.

Per quanto riguarda il gambero rosso, tutti i campioni di chitina estratti da campioni trattati con HPP, risultavo avere un indice di luminosità più elevato. Il trattamento a 500 MPa ha prodotto una chitina con una tonalità più chiara rispetto a tutte le altre condizioni di trattamento (**Figura 31 b**).

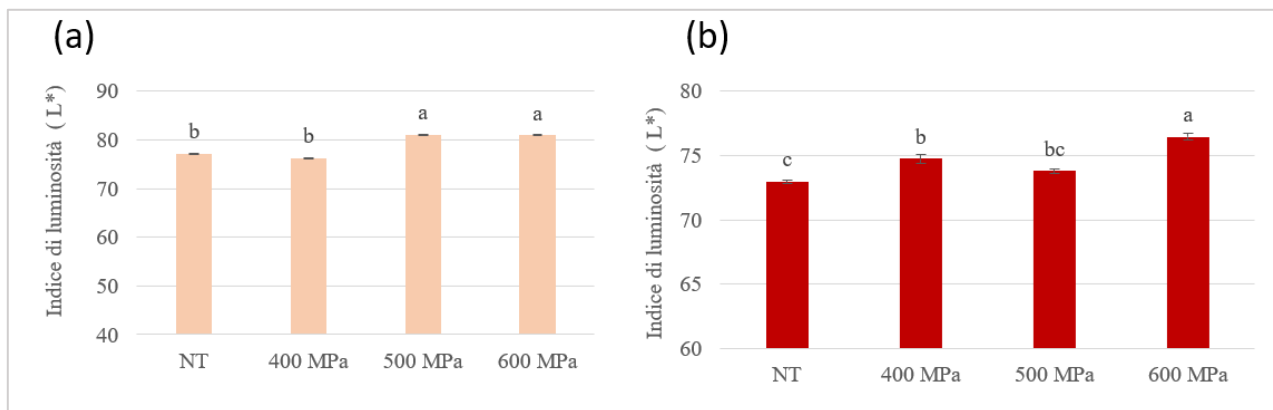


Figura 31. Indice di luminosità della chitina del gambero rosa (a) e del gambero rosso (b). *Lettere diverse mostrano le differenze significative ($p < 0.05$) tra i campioni.

Il trattamento dei campioni con HPP non ha influenzato l'indice di rosso della chitina estratta dal gambero rosa (**Figura 32a**).

L'indice di rosso della chitina estratta dal gambero rosso (**Figura 32b**) risulta essere differente in tutti e tre i campioni trattati con HPP. Infatti, la chitina estratta dal campione trattato a 400 MPa e 500 MPa presenta un indice di rosso inferiore rispetto alla chitina non trattata con HPP, mentre la chitina estratta dal campione trattato a 600 MPa presenta un indice di rosso più elevato.

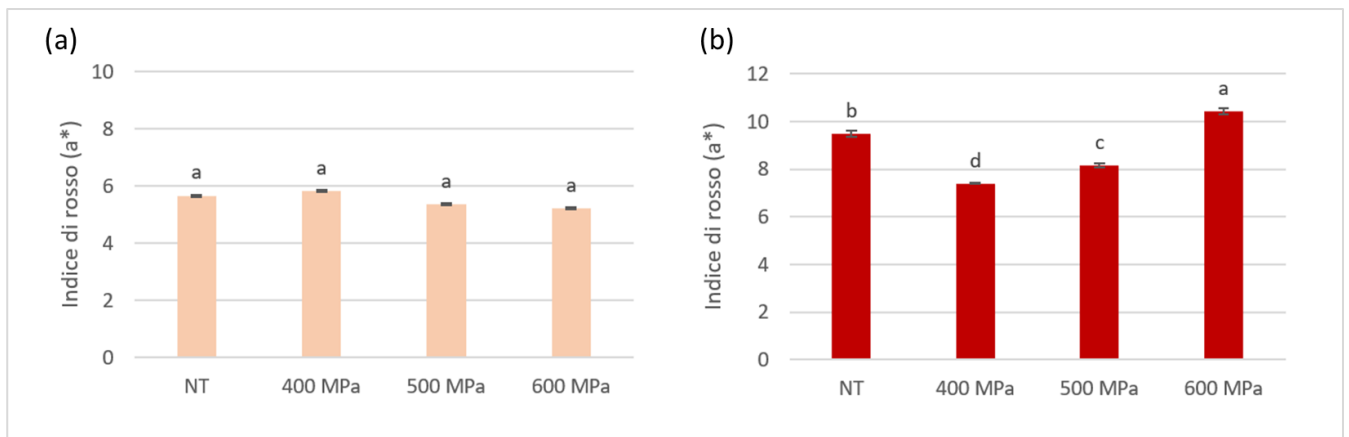


Figura 32. Indice di rosso della chitina del gambero (a) rosa e del gambero rosso (b). *Lettere diverse mostrano le differenze significative ($p < 0.05$) tra i campioni.

I risultati dei valori dell'indice di giallo della chitina di gambero rosa trattati con HPP, mostrano differenze statisticamente significative rispetto ai gusci non trattati con HPP (**Figura 33a**). In particolare, la chitina di gambero rosa che risultano avere l'indice di giallo più alto è quello trattato con HPP a 400 MPa, mentre, quelli trattati a 500 MPa e infine a 600 MPa risultano avere un indice di giallo inferiore.

I campioni di chitina estratti del gambero rosso trattata con HPP a 500 e 600 MPa, presentano un indice di giallo minore rispetto ai gusci non trattati con HPP (**Figura 33b**).

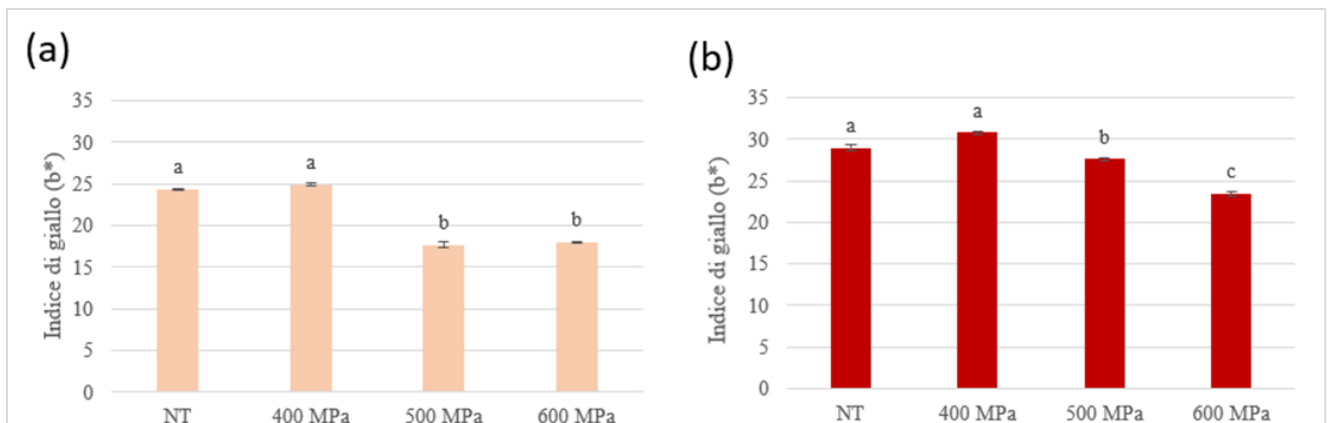


Figura 33. Indice di giallo della chitina del gambero rosa (a) e del gambero rosso (b). *Lettere diverse mostrano le differenze significative ($p < 0.05$) tra i campioni.

I risultati dei valori di luminosità del chitosano di gambero rosa trattati con HPP, mostrano differenze statisticamente significative rispetto ai gusci non trattati con HPP (**Figura 34a**). In particolare, il chitosano di gambero rosa che risultano avere l'indice di luminosità più alto è quello trattato con HPP

a 500 MPa, seguito dal chitosano trattato a 600 MPa. Mentre, il chitosano derivante dal gambero rosa trattato a 400 MPa ha un indice di luminosità più basso rispetto al chitosano non trattato con HPP.

Il chitosano di gambero rosso trattato con HPP, presentano un indice di luminosità differente rispetto ai gusci non trattati con HPP (**Figura 34b**). In particolare, il chitosano trattato con HPP a 400 MPa e 500 MPa presentano un indice di luminosità più basso, mentre il chitosano trattato 600 MPa presentano un indice di luminosità più elevato.

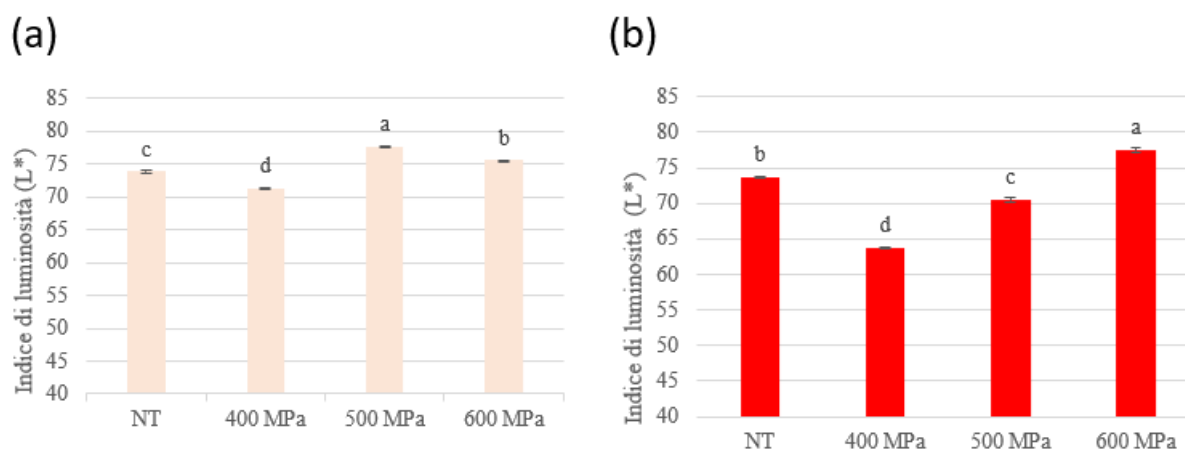


Figura 34. Indice di luminosità del chitosano del gambero rosa (a) e del gambero rosso (b).

**Lettere diverse mostrano le differenze significative ($p < 0.05$) tra i campioni.*

Come previsto, per entrambe le specie di gambero, dopo il processo di deacetilazione della chitina, il chitosano risultante presentava un colore meno rosso, indipendentemente dal trattamento, questo è dovuto alla estrazione dei pigmenti durante processo.

I campioni di gambero rosa, trattati con HPP a 400 e 500 MPa risultano avere un indice di rosso inferiore rispetto al chitosano non trattato, mentre il chitosano derivante dal campione trattato a 600 MPa presentano un indice di rosso leggermente superiore rispetto al chitosano non trattato (**Figura 35a**).

L'indice di rosso del chitosano estratto dal gambero rosso (**Figura 35b**) risulta essere differente in tutti e tre i campioni trattati con HPP. Infatti, il chitosano estratto dal campione trattato a 400 MPa e 500 MPa presenta un indice di rosso superiore rispetto al chitosano non trattato con HPP, mentre il chitosano derivante dal campione trattato a 600 MPa presenta un indice di rosso più basso.

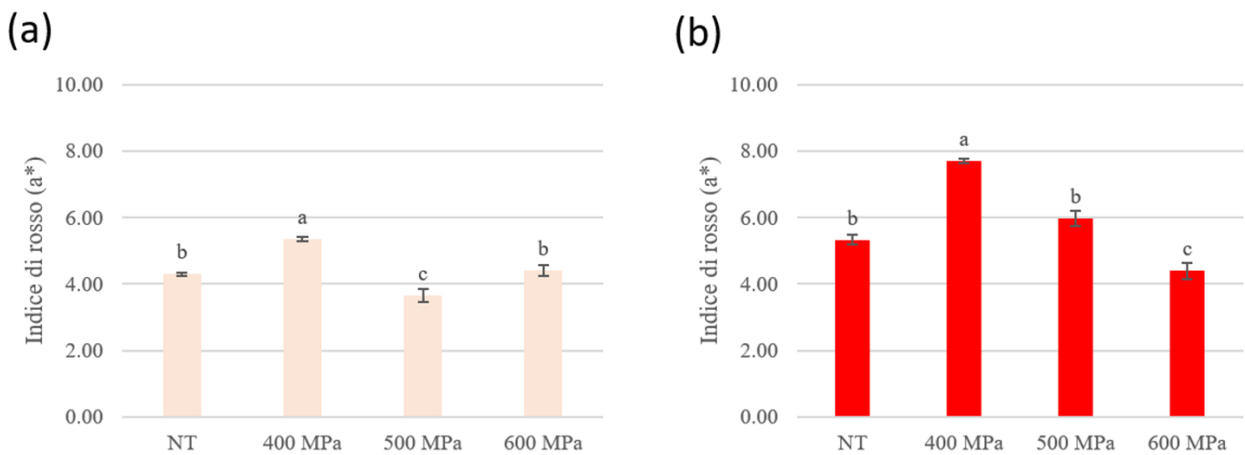


Figura 35. Indice di rosso del chitosano del gambero rosa (a) e del gambero rosso (b). *Lettere diverse mostrano le differenze significative ($p < 0.05$) tra i campioni.

Il chitosano di gambero rosa trattati a 500 e 600 MPa, hanno mostrato un indice di giallo inferiore rispetto ai campioni non trattati e trattati a 400MPa (**Figura 36a**). In particolare, il chitosano di gambero rosa con l'indice di giallo più alto è stato quello trattato a 400 MPa.

Il chitosano derivato dal gambero rosso trattato a 400 e 500 MPa non ha mostrato un indice di giallo diverso rispetto al chitosano non trattato con HPP (**Figura 36b**). In particolare, il chitosano proveniente dai gusci di gambero rosso trattati a 600 MPa presenta un indice di giallo più basso in confronto a tutti gli altri campioni di chitina.

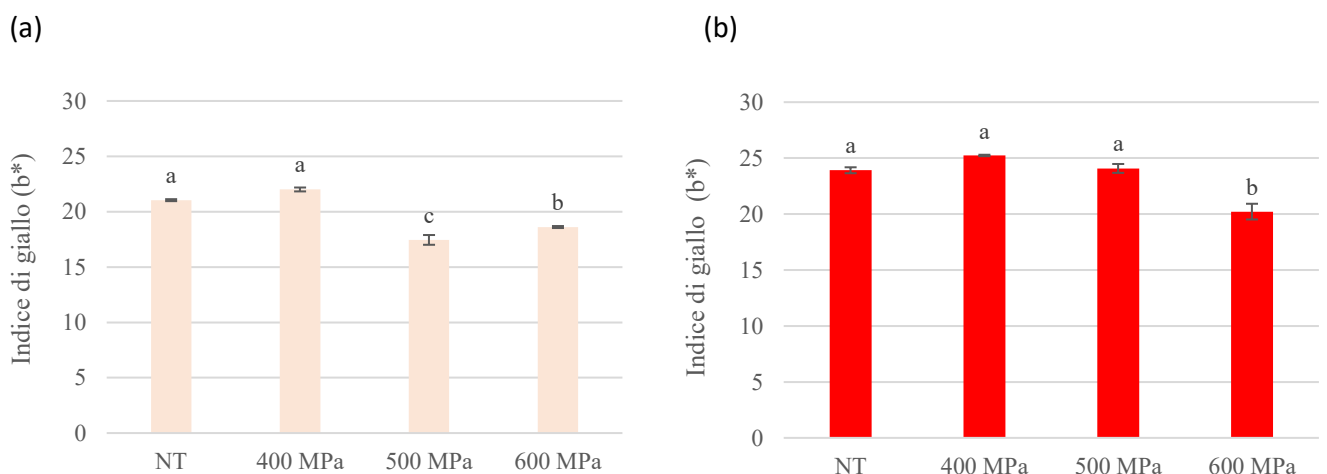


Figura 36. Indice di giallo del chitosano del gambero rosa (a) e del gambero rosso (b). *Lettere diverse mostrano le differenze significative ($p < 0.05$) tra i campioni.

6.6 CALORIMETRIA DIFFERENZIALE A SCANSIONE

Nella **Figura 37** è riportato il termogramma dell'analisi dei campioni di chitina commerciale (sigma) e dei campioni di chitina di Gambero Rosa non trattato e trattato con HPP alle tre diverse pressioni. Per tutti i campioni si può osservare il picco esotermico a 400°C relativo alla decomposizione e delle unità di N-acetilglucosammina (GlcNAc) che predominano nella struttura della chitina, mentre per tutti i campioni risulta assente il picco esotermico a 295 °C corrispondente alla decomposizione delle unità di glucosammina (GlcN), tipico del chitosano.

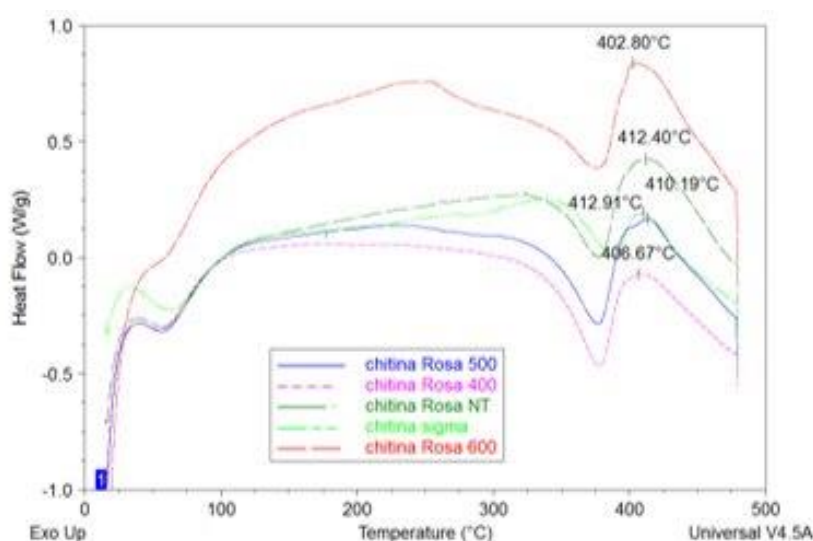


Figura 37. Curve DSC dei campioni di chitina sigma e chitina di Gambero Rosa non trattato e trattato con HPP alle tre diverse pressioni

Nella **Tabella 9** sono riportati i valori estrapolati dalle curve DSC dei campioni di chitina. L'area risulta essere maggiore in tutti i campioni rispetto a quella della chitina sigma, suggerendo che questa fosse maggiormente acetilata rispetto a quella commerciale. In particolare, l'area della chitina del gambero rosa trattato a 400 MPa risulta essere maggiore rispetto all'area della chitina estratta dal gambero rosa non trattato.

Anche nel caso del gambero rosso si evidenzia una maggiore area per la chitina estratta dal gambero rosso trattato a 400 MPa rispetto alla chitina non trattati con HPP.

Tabella 9. Valori delle medie e deviazione standard estrapolati dalle curve DSC per i campioni di chitina commerciale (sigma) e chitina derivata del gambero rosso e rosa non trattato con HPP.

Chitina	Onset temperature (°C)	Peak temperature (°C)	Peak area (J/g)	Peak height (W/g)
Commerciale	391.27 ± 0.76	419.38 ± 8.24	182.23 ± 103.56	0.25 ± 0.05
G. Rosa NT	383.58 ± 0.68	415.41 ± 3.26	349.47 ± 52.18	0.58 ± 0.09
G. Rosa 400 MPa	374.93 ± 1.06	425.79 ± 2.49	472.80 ± 88.28	0.65 ± 0.09
G. Rosa 500 MPa	390.33 ± 1.88	409.14 ± 6.08	294.30 ± 62.70	0.49 ± 0.08
G. Rosa 600 MPa	388.55 ± 2.10	412.12 ± 9.70	329.23 ± 16.32	0.66 ± 0.16
G. Rosso NT	368.34 ± 0.47	420.09 ± 7.07	412.87 ± 48.71	0.49 ± 0.13
G. Rosso 400 MPa	367.62 ± 0.98	401.88 ± 4.82	449.30 ± 46.24	0.65 ± 0.03
G. Rosso 500 MPa	382.77 ± 1.01	404.44 ± 0.54	424.07 ± 39.65	0.58 ± 0.16
G. Rosso 600 MPa	381.85 ± 3.33	404.13 ± 6.87	312.83 ± 20.99	0.18 ± 0.17

6.7 SPETTRI FTIR- ATR

I campioni di chitina e chitosano sono stati analizzati tramite la tecnica della spettroscopia infrarossa a trasformata di Fourier con accessorio ATR (FTIR-ATR) al fine di ottenere gli spettri IR caratteristici nella regione dello spettro compresa tra 4000 e 400 cm^{-1} . Nella **Figura 38** è riportato lo spettro IR del campione di chitina estratta dal Gambero Rosso non trattato.

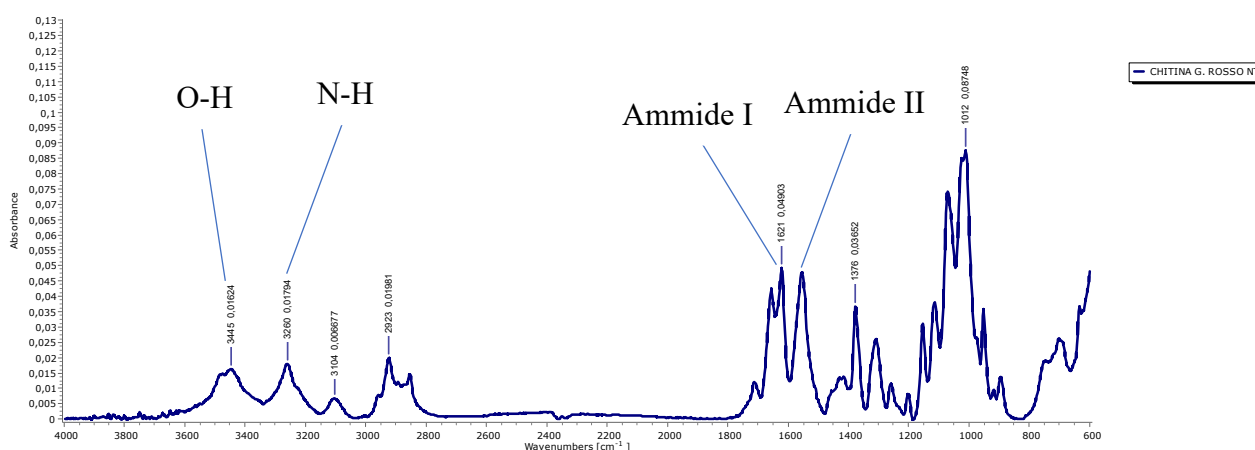


Figura 38. Spettro IR del campione di chitina di Gambero Rosso non trattato con HPP.

Si può osservare un picco di assorbimento a 3446 e 3443 cm^{-1} corrispondente allo stretching del gruppo O-H. mentre il picco di assorbimento a 3260 cm^{-1} corrisponde allo stretching del gruppo N-

H. I picchi più importanti nello spettro della chitina sono i picchi di assorbimento a 1621, 1554 e 1556 cm^{-1} . Il picco a 1621 cm^{-1} corrisponde alla vibrazione dell'amide I, in particolare allo stretching del gruppo funzionale carbonile C=O. Mentre i picchi 1554 - 1556 cm^{-1} corrispondono alla deformazione dell'amide II. Per quanto riguarda il picco di assorbimento a 1376 cm^{-1} è riconducibile alla flessione C-H e deformazione simmetrica del CH_3 .

Nella **Figura 39** sono stati posti a confronto gli spettri IR dei campioni di chitina del Gambero Rosso non trattato e trattato con HPP a 400, 500 e 600 MPa. Come si può osservare non risultano esserci differenze significative tra lo spettro IR della chitina non trattata e gli spettri di chitina trattata con HPP alle tre diverse pressioni, però si è osservato una riduzione dei picchi di assorbimento 2924 e 2876 cm^{-1} .

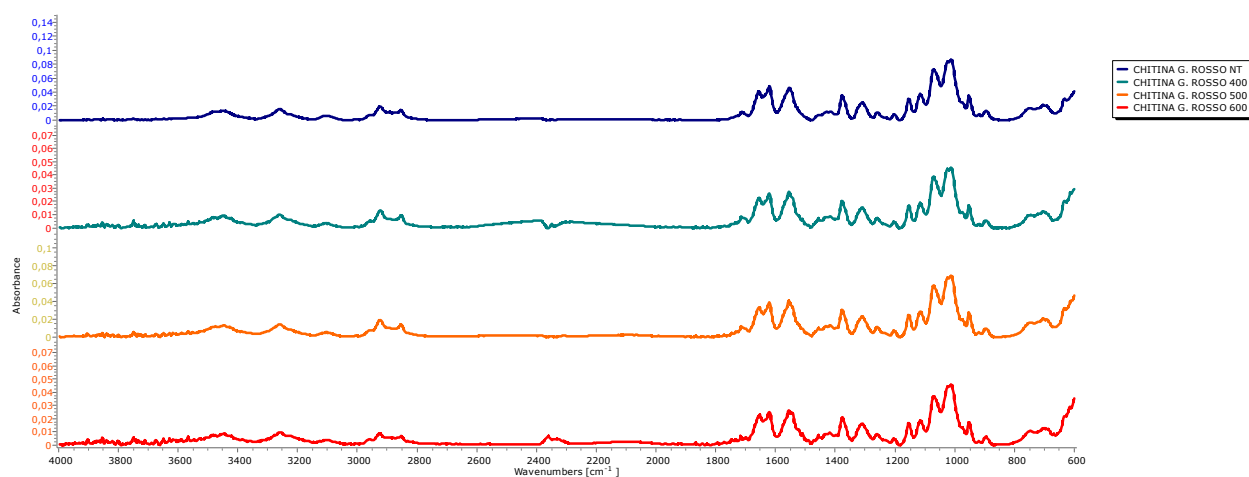


Figura 39. Confronto tra gli spettri IR del Gambero Rosso non trattato e trattato con HPP alle diverse pressioni

Nella **Figura 40** è riportato lo spettro IR del campione di chitina estratta dal Gambero Rosa non trattato. Si può osservare un picco di assorbimento a 34464 e 3441 cm^{-1} corrispondente allo stretching dei gruppi O-H, mentre il picco di assorbimento a 3260 e 3258 cm^{-1} corrisponde allo stretching del gruppo N-H. I picchi di assorbimento a 2924 e 2876 cm^{-1} corrispondono rispettivamente allo stretching simmetrico del CH_3 e stretching asimmetrico del CH_2 , mentre l'altro corrisponde all'allungamento del C-H. I picchi più importanti nello spettro della chitina sono i picchi di assorbimento a 1621, 1554 e 1555 cm^{-1} . Il picco a 1621 cm^{-1} corrisponde alla vibrazione dell'amide I, in particolare allo stretching del gruppo funzionale carbonile C=O. Mentre i picchi 1554 - 1555 cm^{-1} corrispondono alla deformazione dell'amide II. Per quanto riguarda il picco di assorbimento a 1376 cm^{-1} è riconducibile alla flessione C-H e deformazione simmetrica del CH_3 .

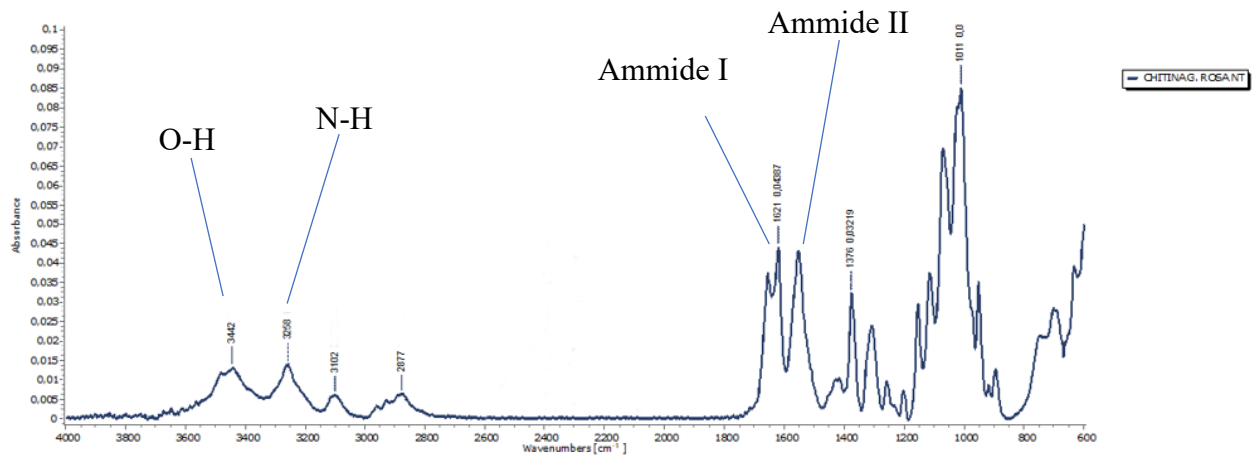


Figura 40. Spettro IR del campione di chitina di Gambero Rosa non trattato con HPP.

Nella **Figura 41** sono stati posti a confronto gli spettri IR dei campioni di chitina del Gambero Rosa non trattato e trattato con HPP a 400, 500 e 600 MPa. Come si può osservare non risultano esserci differenze significative tra gli spettri, tranne per un aumento dei picchi di assorbimento 2924 e 2876 cm^{-1} .

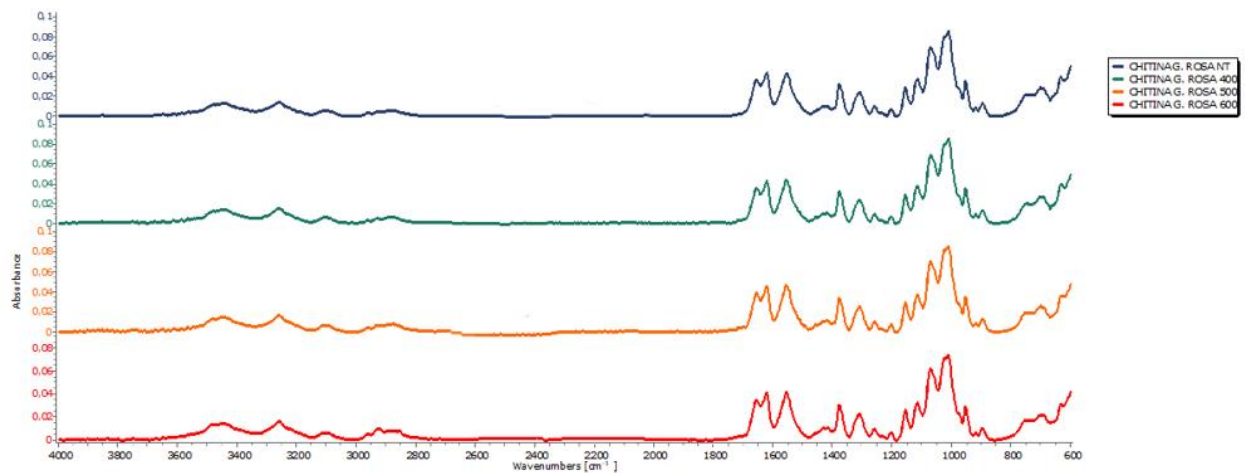


Figura 41. Confronto tra gli spettri IR del Gambero Rosa non trattato e trattato con HPP alle diverse pressioni

6.8 GRADO DI ACETILAZIONE (DA%)

L'analisi spettroscopica ha permesso di determinare il grado di acetilazione dei campioni di chitina. Nella **Tabella 10** sono riportati i valori del grado di acetilazione (DA%) calcolato per i campioni di chitina del gambero rosso e rosa trattati e non trattati con HPP.

Tabella 10. Grado di acetilazione dei campioni di chitina trattate e non con HPP.

Specie	Grado di acetilazione (DA%)			
	NT	400 MPa	500MPa	600MPa
Gambero Rosa	98.56 ± 9.50 ^a	98.26 ± 3.89 ^a	94.07 ± 1.82 ^b	87.34 ± 1.34 ^c
Gambero Rosso	97.57 ± 2.81 ^a	82.55 ± 3.03 ^b	83.59 ± 0.98 ^b	80.36 ± 2.86 ^c

Il grado di deacetilazione del chitosano è una caratteristica fondamentale che influisce sulle sue proprietà e applicazioni. Si tratta della percentuale di gruppi acetilici rimossi dalla chitina durante il processo di deacetilazione. Questo parametro è cruciale perché determina la quantità di gruppi amminici liberi nel polimero, influenzando così le sue proprietà chimiche e fisiche (Kasaai, 2009).

Il pretrattamento con HPP dei gusci di entrambi specie gambero ha comportato una riduzione del DA% della chitina, con un effetto più pronunciato all'aumentare della pressione. Nel caso del gambero rosa, questa modifica è evidente soprattutto a pressioni più elevate, come 500 e 600 MPa. Per il gambero rosso, invece, tutte e tre le pressioni testate hanno determinato una significativa diminuzione del grado di acetilazione, passando dal 97,57% (non trattato) al 80,36% a 600 MPa.

La diminuzione del grado di deacetilazione può essere attribuita alla degradazione delle catene di chitina durante il processo ad alta pressione. Questo processo probabilmente ha favorito la diffusione di una concentrazione più elevata di soluzione di idrossido di sodio nei siti di reazione e di conseguenza, ha aumentato l'efficienza di rompere i legami amino-glicosidici, determinando un aumento del grado di deacetilazione.

6.9 CAPACITÀ DI LEGARE L'ACQUA

La capacità di legame con l'acqua è la tendenza dell'acqua ad associarsi a sostanze idrofile ed è un parametro di qualità estremamente importante nell'industria alimentare (Moham et al., 2020).

La capacità di legare l'acqua della chitina è stata calcolata tramite l'equazione 4 riportata nel paragrafo 5.4.6.

Non sono state riscontrate differenze significative nella capacità di legare l'acqua tra i campioni di chitina derivati del gambero rosa trattato e non trattato con HPP. I valori della capacità di legare l'acqua della chitina nel caso del gambero rosa (**Figura 42**) variano da un minimo del 538% a un massimo del 578%.

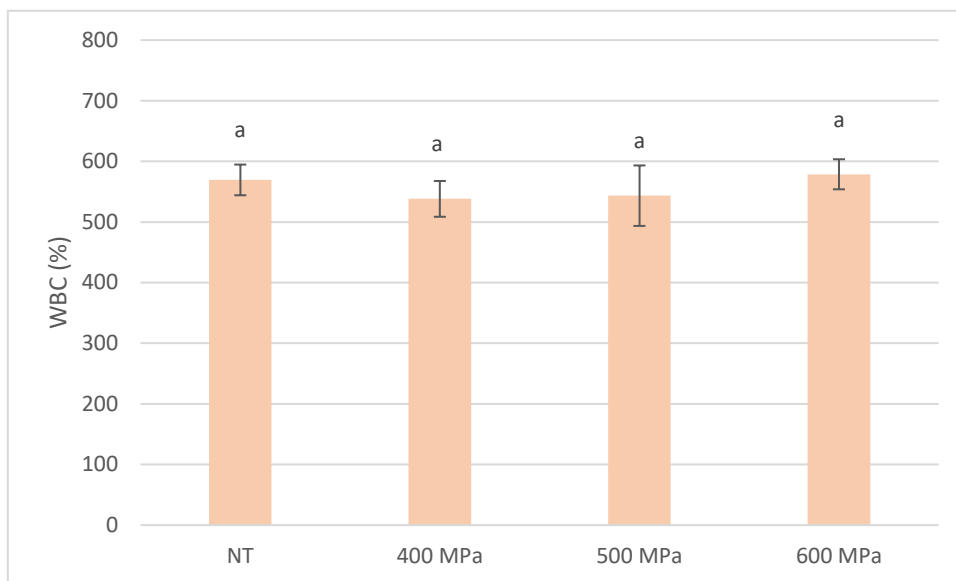


Figura 42. Capacità di legare l'acqua (WBC %) della chitina di gambero rosa non trattato e trattato con HPP. *Lettere diverse mostrano le differenze significative ($p < 0.05$) tra i campioni.

I valori della capacità di legare l'acqua della chitina nel caso del gambero rosso (**Figura 43**) variano in un range da un minimo di 728 % a un massimo di 862 %. Si evidenzia un aumento della capacità di legare l'acqua della chitina nel gambero rosso in tutte e tre i campioni trattati con HPP.

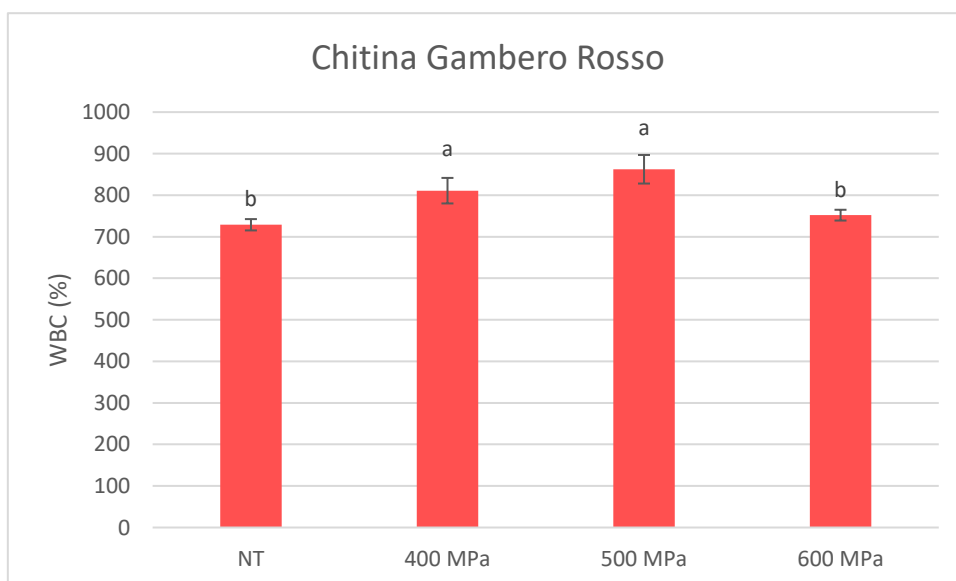


Figura 43. Capacità di legare l'acqua (WBC %) della chitina di gambero rosso non trattato e trattato con HPP. *Lettere diverse mostrano le differenze significative ($p < 0.05$) tra i campioni.

6.10 CAPACITÀ DI LEGARE L'OLIO

La capacità di legare l'olio della chitina è stata calcolata tramite l'equazione 5 riportata nel paragrafo 5.4.7. Osservando i valori della capacità di legare l'olio della chitina sia nel caso del gambero rosa (**Figura 44**) che nel caso del gambero rosso (**Figura 45**) si evidenzia che in entrambe le specie, la chitina estratta dai campioni trattati con HPP a 400 MPa, 500 MPa e 600 MPa presentano una maggiore capacità di legare l'olio rispetto alla chitina estratta dal campione non trattato (NT).

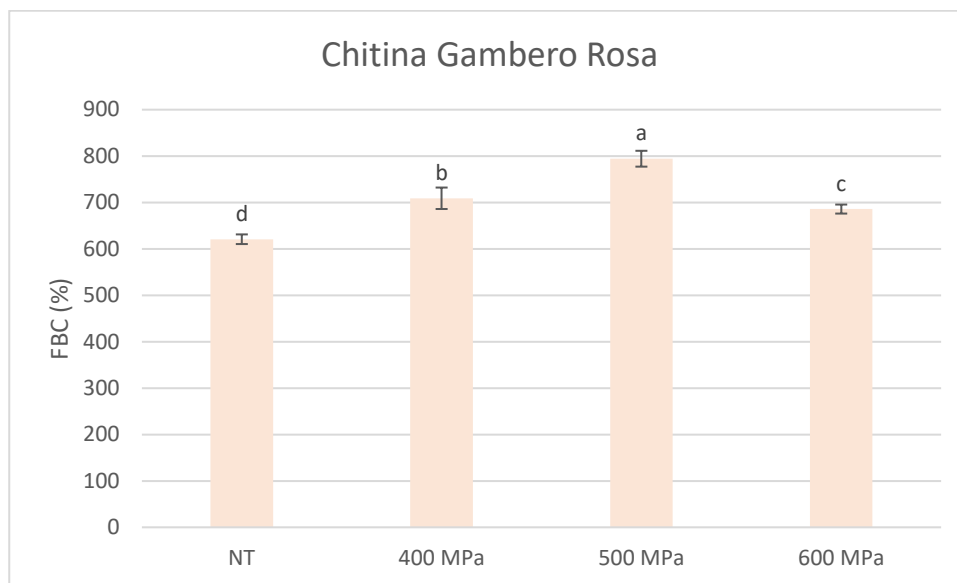


Figura 44. Capacità di legare l'olio (FBC %) della chitina di gambero rosa non trattato e trattato con HPP. *Lettere diverse mostrano le differenze significative ($p < 0.05$) tra i campioni.

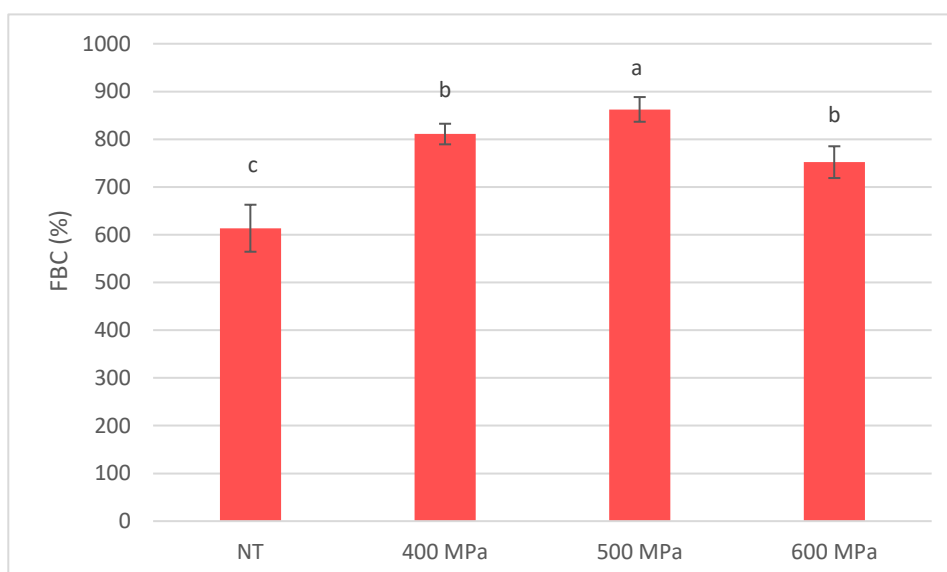


Figura 45. Capacità di legare l'olio (FBC %) della chitina di gambero rosso non trattato e trattato con HPP. *Lettere diverse mostrano le differenze significative ($p < 0.05$) tra i campioni.

6.11 DETERMINAZIONE VISCOSIMETRICA DEL PESO MOLECOLARE DEL CHITOSANO

Il chitosano nativo derivato dal gambero rosa ha mostrato un peso molecolare maggiore (169,65 KDa) rispetto al chitosano nativo derivato dal gambero rosso (144,30 KDa). Tra i campioni di chitosano trattati (**Tabella 11**), l'effetto del trattamento HPP ha manifestato risultati opposti in base alla specie di gambero. Il chitosano derivato dal gambero rosa ha mostrato un aumento del peso molecolare dopo il trattamento ad alta pressione, mentre quello derivato dal gambero rosso ha evidenziato l'effetto opposto. Ad eccezione per il trattamento a 600MPa che ha aumentato il peso molecolare di entrambi le specie. Gli autori Huang e Tsai, 2020 (Huang & Tsai, 2020) hanno riscontrato una diminuzione del peso molecolare del chitosano estratto dall'osso di seppia tramite trattamenti a 300MPa. Secondo gli autori, la riduzione del peso molecolare è stata probabilmente dovuta alla depolimerizzazione della catena polimerica dei chitosani. Nel caso dei gamberi rossi la depolimerizzazione occorre solamente nei campioni di gambero rosso trattati a 400 e 500MPa.

Tabella 11. Peso molecolare dei campioni di chitosano trattato e non con HPP.

Specie di gambero	Peso molecolare chitosano Mw (KDa)			
	NT	400 MPa	500MPa	600MPa
Gambero Rosa	169.65 ^c	198.253 ^b	304.268 ^a	304.570 ^a
Gambero Rosso	144.630 ^b	127.729 ^c	121.052 ^c	177.870 ^a

Il trattamento a 500 MPa è stato il più efficace nel ridurre il peso molecolare del chitosano derivato dai gamberi rossi.

La specie di origine e il metodo di estrazione hanno un effetto significativo sulle proprietà fisico-chimiche della chitina e del chitosano (Pohling et al., 2022). Il pretrattamento con le alte pressioni, a causato delle modificazioni nella struttura del polimero. Tale modificazione può avere conseguenze significative sulle proprietà chimiche e fisiche del chitosano estratto, rendendolo adatta a diverse applicazioni in base alle esigenze specifiche.

Probabilmente il trattamento ad alta pressione dei campioni di gambero rosa e a 600MPa hanno probabilmente intensificato le reazioni di polimerizzazione del chitosano, portando a catene polimeriche più lunghe e a un peso molecolare più elevato di questi campioni.

7. CONCLUSIONI

Nell'ambito del lavoro di ricerca presentato in questo elaborato gli obiettivi principali erano quelli di caratterizzare chitina e chitosano estratti da scarti di lavorazione di gambero rosa e gambero rosso dopo applicazione di un pretrattamento con HPP a tre differenti pressioni idrostatiche.

Dai dati ottenuti è emerso che il pretrattamento con HPP ha favorito un aumento delle rese di estrazione di chitina e chitosano rispetto ai campioni non sottoposti a trattamento con HPP.

In particolare, è emerso che già un primo trattamento con HPP con una pressione relativamente bassa a 400 MPa possa apportare un notevole aumento della resa di estrazione dallo stesso quantitativo di sottoprodotto di gamberi, favorendo quindi una maggiore valorizzazione del sottoprodotto stesso. La maggiore resa di estrazione potrebbe essere dovuta all'applicazione della pressione che può favorire la migrazione dei polisaccaridi dalla matrice biologica al solvente di estrazione, aumentando così l'efficienza complessiva del processo di estrazione.

Il trattamento con HPP ha apportato un miglioramento non soltanto nella resa di estrazione di chitina e chitosano in entrambe le specie, gambero rosa e gambero rosso, ma anche un miglioramento delle proprietà fisico-chimiche. Nello specifico, tutti i tre trattamenti con pressioni idrostatiche a 400. 500 e 600 MPa, hanno apportato un miglioramento nella capacità di legare l'acqua e l'olio e del grado di acetilazione. Il trattamento con alte pressioni ha permesso anche di modificare i pesi molecolari dei chitosani, rendendo tale tecnologia adatta a diverse applicazioni in accordo con le esigenze specifiche del polimero.

Inoltre, per approfondire i risultati ottenuti nella presente sperimentazione sarebbe interessante valutare l'attività antimicrobica e antiossidante dei vari composti in relazione ai trattamenti innovativi applicati.

Infine, al fine di ottenere indicazioni utili per l'eventuale applicazione industriale, è necessaria la valutazione della sostenibilità dei processi proposti in relazione a costi, rese e tempi di trattamento e alla riduzione nell'utilizzo di solventi.

8. BIBLIOGRAFIA

- Agulló, E., Rodríguez, M. S., Ramos, V., & Albertengo, L. (2003). Present and Future Role of Chitin and Chitosan in Food. *Macromolecular Bioscience*, 3(10), 521–530.
<https://doi.org/10.1002/mabi.200300010>
- Ahmadkelayeh, S., & Hawboldt, K. (2020). Extraction of lipids and astaxanthin from crustacean by-products: A review on supercritical CO₂ extraction. *Trends in Food Science & Technology*, 103, 94–108. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.016>
- Al Khawli, F., Pateiro, M., Domínguez, R., Lorenzo, J. M., Gullón, P., Kousoulaki, K., Ferrer, E., Berrada, H., & Barba, F. J. (2019). Innovative Green Technologies of Intensification for Valorization of Seafood and Their By-Products. *Marine Drugs*, 17(12), Artículo 12.
<https://doi.org/10.3390/md17120689>
- Albalat, A., Nadler, L. E., Foo, N., Dick, J. R., Watts, A. J. R., Philp, H., Neil, D. M., & Monroig, O. (2016). Lipid Composition of Oil Extracted from Wasted Norway Lobster (*Nephrops norvegicus*) Heads and Comparison with Oil Extracted from Antarctic Krill (*Euphasia superba*). *Marine Drugs*, 14(12), Artículo 12. <https://doi.org/10.3390/md14120219>
- Ambati, R. R., Phang, S.-M., Ravi, S., & Aswathanarayana, R. G. (2014). Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications—A Review. *Marine Drugs*, 12(1), Artículo 1. <https://doi.org/10.3390/md12010128>
- Azelee, N. I. W., Dahiya, D., Ayothiraman, S., Noor, N. M., Rasid, Z. I. A., Ramli, A. N. M., Ravindran, B., Iwuchukwu, F. U., & Selvasembian, R. (2023). Sustainable valorization approaches on crustacean wastes for the extraction of chitin, bioactive compounds and their applications—A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253, 126492.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126492>

- Bhat, Z., Morton, J., Mason, S., & Bekhit, A. (2018). Current and Future Prospects for The Use of Pulsed Electric Field in The Meat Industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1425825>
- Cabanillas-Bojórquez, L. A., Uranga-Soto, M. A., Gutiérrez-Grijalva, E. P., & Heredia, J. B. (2022). Enzyme-aimed extraction of bioactive compounds from crustaceans by-products. In *Value-Addition in Food Products and Processing Through Enzyme Technology* (pp. 321–332). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89929-1.00007-X>
- Clarke, A., & Holmes, L. J. (1986). Lipid content and composition of some midwater crustaceans from the Southern Ocean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 104(1–3), 31–51. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(86\)90096-1](https://doi.org/10.1016/0022-0981(86)90096-1)
- Crini, G. (2022). Chitin and chitosan: Production, properties, and applications. In *Chitin and Chitosan* (pp. 149–207). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-96119-6.00004-9>
- De Aguiar Saldanha Pinheiro, A. C., Martí-Quijal, F. J., Barba, F. J., Tappi, S., & Rocculi, P. (2021). Innovative Non-Thermal Technologies for Recovery and Valorization of Value-Added Products from Crustacean Processing By-Products—An Opportunity for a Circular Economy Approach. *Foods*, 10(9), Articolo 9. <https://doi.org/10.3390/foods10092030>
- Gulzar, S., Raju, N., Chandragiri Nagarajarao, R., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.005>
- Hajji, S., Younes, I., Ghorbel-Bellaaj, O., Hajji, R., Rinaudo, M., Nasri, M., & Jellouli, K. (2014). Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources. *International Journal of Biological Macromolecules*, 65, 298–306. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.01.045>

- Hamed, I., Özogul, F., & Regenstein, J. M. (2016). Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.11.007>
- Harish Prashanth, K. V., & Tharanathan, R. N. (2007). Chitin/chitosan: Modifications and their unlimited application potential—an overview. *Trends in Food Science & Technology*, 18(3), 117–131. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.10.022>
- Huang, Y.-L., & Tsai, Y.-H. (2020). Extraction of chitosan from squid pen waste by high hydrostatic pressure: Effects on physicochemical properties and antioxidant activities of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 160, 677–687. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.252>
- Jahan, M., F, N., Masum, S., M, A., SK, R., & Hossain, M. (2010). A process of preparation of chitin and chitosan from prawn shell waste. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 45, 323–330. <https://doi.org/10.3329/bjsir.v45i4.7330>
- Kasaai, M. R. (2009). Various Methods for Determination of the Degree of N-Acetylation of Chitin and Chitosan: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1667–1676. <https://doi.org/10.1021/jf803001m>
- Kim, S.-K. (2010). *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications*. CRC Press.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.12.042>
- Mohan, K., Ganesan, A. R., Ezhilarasi, P. N., Kondamareddy, K. K., Rajan, D. K., Sathishkumar, P., Rajarajeswaran, J., & Conterno, L. (2022). Green and eco-friendly approaches for the extraction of chitin and chitosan: A review. *Carbohydrate Polymers*, 287, 119349. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119349>

- 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*, *103*, 20–35. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.07.001>
- Pakizeh, M., Moradi, A., & Ghassemi, T. (2021). Chemical extraction and modification of chitin and chitosan from shrimp shells. *European Polymer Journal*, *159*, 110709. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110709>
- Rinaudo, M., Milas, M., & Dung, P. L. (1993). Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *International Journal of Biological Macromolecules*, *15*(5), 281–285. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(93\)90027-J](https://doi.org/10.1016/0141-8130(93)90027-J)
- Sachindra, N. M., & Mahendrakar, N. S. (2005). Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with vegetable oils. *Bioresource Technology*, *96*(10), 1195–1200. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.09.018>
- Shouqin, Z., Junjie, Z., & Changzhen, W. (2004). Novel high pressure extraction technology. *International Journal of Pharmaceutics*, *278*(2), 471–474. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.02.029>
- Sixto-Berrocal, A. M., Vázquez-Aldana, M., Miranda-Castro, S. P., Martínez-Trujillo, M. A., & Cruz-Díaz, M. R. (2023). Chitin/chitosan extraction from shrimp shell waste by a completely biotechnological process. *International Journal of Biological Macromolecules*, *230*, 123204. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123204>
- The State of World Fisheries and Aquaculture 2020*. (2020). FAO. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- Tolaimate, A., Desbrieres, J., Rhazi, M., & Alagui, A. (2003). Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. *Polymer*, *44*(26), 7939–7952. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2003.10.025>
- Yan, N., & Chen, X. (2015). Sustainability: Don't waste seafood waste. *Nature*, *524*(7564), Articolo 7564. <https://doi.org/10.1038/524155a>

Younes, I., Hajji, S., Frachet, V., Rinaudo, M., Jellouli, K., & Nasri, M. (2014). Chitin extraction from shrimp shell using enzymatic treatment. Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 69, 489–498.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.013>

Younes, I., & Rinaudo, M. (2015). Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Marine Drugs*, 13(3), Articolo 3.
<https://doi.org/10.3390/md13031133>

“La sottoscritta Sabrina Maria Carbone dichiara che il presente testo è stato redatto dalla sottoscritta personalmente e con parole proprie. Citazioni e altri riferimenti a fonti esterne sono chiaramente segnalati come tali. La sottoscritta è consapevole che l’uso improprio di materiale pubblicato in altri lavori o la parafrasi di materiale di questo tipo senza riferimento alla fonte verrà considerato plagio e, di conseguenza, verranno applicate le procedure previste della normativa vigente nonché dalla legge sui diritti d’autore (Legge 22 aprile 1941 n. 633 e s.m.i.). La fonte di qualsiasi immagine, mappa o altro tipo di illustrazione (pubblicati o trovati in lavori non pubblicati) è stata indicata.”