

IL PIACERE DELLA VITA

COLLANA DI CHIMICA DEGLI ALIMENTI
MONOGRAFIE

Direttore

Lydia FERRARA

Università degli Studi di Napoli "Federico II"

Comitato scientifico

Daniele NAVIGLIO

Università degli Studi di Napoli "Federico II"

Arturo ARMONE CARUSO

Associazione Italiana Assistenza Svantaggiati

IL PIACERE DELLA VITA

COLLANA DI CHIMICA DEGLI ALIMENTI

MONOGRAFIE



Non c'è uomo che non possa bere o mangiare, ma sono in pochi in grado di capire che cosa abbia sapore.

CONFUCIO

Una corretta alimentazione è fondamentale per garantire una buona qualità di vita ed una serena vecchiaia. Il mangiar sano ed in giuste proporzioni è il segreto per mantenere l'organismo in buona salute senza gravare sul funzionamento degli organi: dai vari alimenti è possibile, infatti, fornire al corpo tutti i principi nutrizionali necessari per svolgere le diverse attività, mantenerlo in buona salute senza ricorso a medici o farmaci. Un controllo ed un intervento specifico sull'alimentazione sono spesso indispensabili per prevenire o attenuare alcuni sintomi indotti da molte malattie. Questa collana si rivolge ad un pubblico vasto, a tutti coloro che vogliono conoscere gli alimenti e migliorare la propria alimentazione, ai professionisti del settore alimentare e agli studenti. La sezione *Monografie* ospita opere che hanno come oggetto di studio un singolo alimento e che sono basate su ricerche originali e vasta documentazione bibliografica, senza trascurare l'inserimento di lavori scientifici già pubblicati o in fase di pubblicazione su importanti riviste, a testimonianza di un continuo studio e di continui progressi nella conoscenza del campo alimentare.

Lydia Ferrara
Arturo Armone Caruso
Monica Gallo
Daniele Naviglio

Chitosano

Applicazioni nel settore agroalimentare





Aracne editrice

www.aracneeditrice.it
info@aracneeditrice.it

Copyright © MMXVII
Gioacchino Onorati editore S.r.l. – unipersonale

www.gioacchinoonoratieditore.it
info@gioacchinoonoratieditore.it

via Vittorio Veneto, 20
00020 Canterano (RM)
(06) 45551463

ISBN 978-88-255-0944-1

*I diritti di traduzione, di memorizzazione elettronica,
di riproduzione e di adattamento anche parziale,
con qualsiasi mezzo, sono riservati per tutti i Paesi.*

*Non sono assolutamente consentite le fotocopie
senza il permesso scritto dell'Editore.*

I edizione: dicembre 2017

Indice

9	<i>Introduzione</i>
13	1. <i>Il chitosano. Un polimero naturale straordinario</i>
15	2. <i>Applicazioni industriali del chitosano</i>
19	3. <i>Attività antibatterica e antimicotica del chitosano</i>
23	4. <i>Chimica del chitosano e formazione di pellicole</i>
25	5. <i>Chitosano e lieviti</i>
27	6. <i>Applicazioni ambientali del chitosano</i>
33	7. <i>Chitosano nella cosmesi</i>
35	8. <i>Chitosano nella conservazione dei prodotti alimentari</i>
37	9. <i>Chitosano nella conservazione di frutta e verdura</i>
47	10. <i>Il chitosano come integratore alimentare</i>
51	<i>Conclusioni</i>
53	<i>Bibliografia</i>

Introduzione

Il chitosano è un sottoprodotto dell'industria del pesce a costo zero il cui riutilizzo è molto importante per ridurre l'impatto ambientale. Lo smaltimento di materiali di scarto dai molluschi, dai gamberi e dai pesci è diventato un grave problema nelle zone costiere di tutto il mondo.

Il chitosano è un biopolimero naturale dalle applicazioni infinite, anche se in realtà la variabilità del peso molecolare e del grado di acetilazione non permettono la produzione di un composto sempre riproducibile. La sua applicazione è molto aumentata negli ultimi 20 anni soprattutto per la sua applicazione come biomateriale nelle nanotecnologie.

L'isolamento selettivo di un materiale bioattivo come la chitina o altri polimeri da rifiuti industriali sono il modo più semplice non solo per ridurre l'inquinamento ambientale, ma anche per aumentare la produzione di prodotti bioinnovativi. Inoltre, a causa delle sue particolari caratteristiche chimiche, il chitosano può essere utilizzato nelle attività industriali che richiedono una specifica purificazione, resistenza e attività antibatterica; è notevole il suo utilizzo come agente antimicrobico e antimicotico, sia nell'agricoltura che nella conservazione degli alimenti a causa della sua biodegradabilità e della capacità di formare film di rivestimento. Il primario meccanismo di azione del chitosano risiede nella sua capacità di legarsi alle sostanze grasse grazie alla sua composizione chimica, favorendo la loro eliminazione, e quindi può essere utilizzato per diverse preparazioni di sostanze chimico-farmaceutiche. Infatti il chitosano è ampiamente sfruttato per la preparazione di integratori progettati per promuovere la perdita di peso, per la sua capacità di ridurre l'assorbimento del grasso. Questa sostanza ha la capacità di legarsi ai grassi formando una sorta di involucro gelatinoso fino a quando diventano parzialmente indigesti e vengono eliminati con le feci. L'accumulo del tessuto adiposo è quindi limitato, la qual cosa è molto utile per combattere l'obesità. L'uso, poi, di integratori contenente questa sostanza può anche diminuire il senso di fame. Non esiste alcuna conferma scientifica

circa la funzione dimagrante del chitosano, e non vi è un giudizio unanime da parte dei ricercatori, ma questo tipo di sostanza derivata dalla chitina è ritenuta efficace solo se accompagnata da una dieta a basso contenuto calorico e regolare attività fisica. Anche se molti effetti del suo utilizzo sono controversi e/o ancora da verificare, è stato dimostrato che il chitosano è una sostanza multifunzionale con possibilità di applicazione in molti settori

Il precursore del chitosano: la chitina. Caratteristiche chimico-fisiche

Il chitosano è un polimero naturale derivato dalla deacetilazione della chitina, principale componente dell'esoscheletro degli insetti, dei gusci dei crostacei e della parete cellulare dei funghi (Fig. 1).

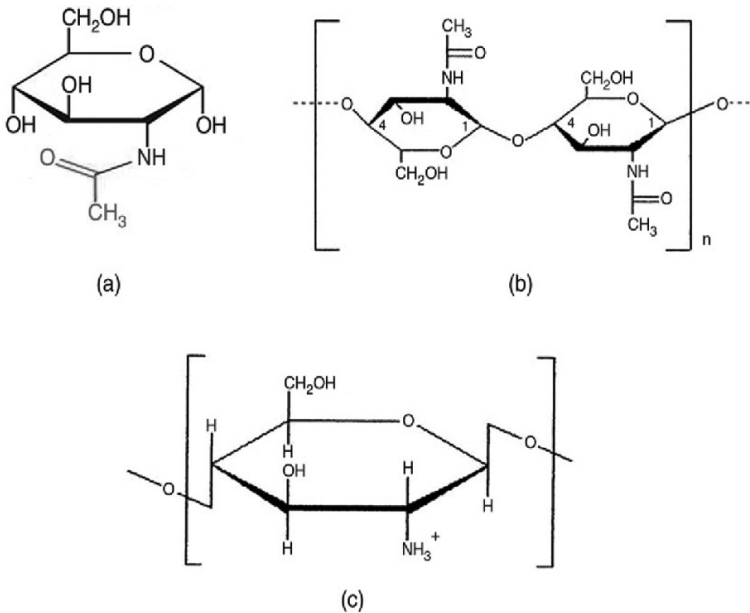


Figura 1. a) Principale unità della chitina: b-D-N-acetilglucosammina (NAG); b) struttura chitina; c) struttura chitosano.

La chitina, il più abbondante biopolimero naturale dopo la cellulosa, fu scoperta nei funghi dallo studioso francese Henry Braconnot (1811). La scoperta della chitina avvenne in seguito ad alcune reazioni condotte su materiale grezzo isolato da diverse specie di funghi: *Agaricus volvaceus*, *Agaricus acris*, *Agaricus Cantarellus*, *Agaricus piperatus*, *Hydnum repandum*, *Hydnum Hybridum* e *Boletus viscidus*. Dal materiale fungino parzialmente purificato mediante ebollizione con idrossido di potassio diluito per la rimozione di proteine e pigmenti si otteneva un composto, il chitina-glucano. Per distillazione della soluzione alcalina contenente il materiale fungino, si sviluppava ammoniacca, a dimostrare la presenza di azoto nella molecola; l'aggiunta di acido solforico, poi, liberava acido acetico, evidenziando in tal modo la presenza di gruppi acetilati. Pochi anni dopo la chitina fu scoperta anche nelle corazze di alcuni insetti.

La chitina è un polimero costituito da unità di D-N-acetil-glucosammina legate fra loro da legami alfa 1-4 glicosidici. Ledderhose nel 1878 determinò la struttura della chitina e dimostrò che poteva essere sintetizzata a partire da molecole di glucosammina e acido acetico. Nella chitina le varie unità formano lunghe catene che si aggregano in lamine attraverso il legame idrogeno: i vari modi in cui tali lamine si possono aggregare tra loro determinano le tre forme cristalline note della chitina denominate α , β e γ . I legami a idrogeno che si formano tra le catene polimeri che adiacenti garantiscono alla sostanza una notevole durezza e flessibilità; tali caratteristiche, unite alla sua degradabilità da parte degli enzimi endogeni, rendono la chitina un ottimo materiale per la produzione di fili per suture chirurgiche, bende, pelle sintetica; essa presenta, inoltre, la proprietà di accelerare la rimarginazione delle ferite superficiali negli esseri umani. La chitina viene oggi ottenuta principalmente dai gusci dei crostacei, soprattutto gamberi, per un ammontare di 50.000 tonnellate annue, e, essendo la sua biodegradabilità molto lenta, il suo smaltimento ha rappresentato per molto tempo un serio problema per l'industria ittica, fino a quando è stata scoperta la possibilità di trasformazione in prodotti di elevato valore aggiunto quali il chitosano. In tal modo la chitina si è trasformata da prodotto di scarto a materia prima, disponibile, a basso costo diventando così un prodotto di grande utilità per le sue numerose applicazioni (Shahidi, 1999).

I. Il chitosano

Un polimero naturale straordinario

Il chitosano fu scoperto nel 1859 in modo casuale dal prof. Rouget, mentre cercava di produrre un sapone naturale bollendo la chitina in alcali; mediante ebollizione, infatti, si liberano per deacetilazione i gruppi amminici ottenendo in tal modo il chitosano.

Il chitosano è un polimero lineare di formula chimica $(C_6H_{11}O_4N)_n$ e possiede configurazione tridimensionale ad alfa elica stabilizzata da legami idrogeno intramolecolari; a seconda della lunghezza della catena presenta diverso peso molecolare (tra 50 Kda e 200 Kda) e differente grado di deacetilazione, dal 40% al 98%. Oggigiorno, per ottenere il chitosano, i prodotti di scarto dei gamberi sono sottoposti a un processo di demineralizzazione con HCl 0,25 N a temperatura ambiente in rapporto 1:40 p/v che si completa in circa 15 minuti. Segue la deproteinizzazione con NaOH N a 70°C per 24 ore, al termine della quale si ottiene la chitina che viene sottoposta a deacetilazione per trattamento a temperature elevate, 100°C–120°C con una soluzione di NaOH al 60% (p/v) (Juang *et al.*, 2002).

Il chitosano grezzo ottenuto nel modo sopra descritto deve subire complessi trattamenti di purificazione per eliminare le sostanze presenti nel materiale di partenza: proteine, lipidi, sali minerali (in particolare carbonato di calcio) e pigmenti, per cui questo tradizionale metodo chimico di estrazione risulta poco economico e ad alto impatto ambientale. In alternativa, è stato proposto un metodo di fermentazione con batteri lattici (Rao *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 2002) che è stato ottimizzato considerando vari fattori, quali la scelta del microrganismo più attivo, del terreno di cultura, dell'aggiunta di nutrienti al terreno di cultura (Khanafari *et al.*, 2008), al fine di ottenere un prodotto ad alte rese, economicamente vantaggioso e a basso impatto ambientale. *Lactobacillus plantarum* (PTTC 1058), inoculato su MRS Broth mescolato ad agar per solidificare il mezzo di cultura e incubato a 35–37°C in presenza di CO₂ per 48–72 ore, si è dimostrato il più efficiente tra i lattobacilli considerati, per estrarre il chitosano dai gamberetti, con resa maggiore di quella ottenuta con metodo

chimico e inoltre senza danno per l'ambiente (Khanafari *et al.*, 2008.). In aggiunta, l'impiego degli acidi organici per la demineralizzazione è stata una importante modifica del processo di purificazione che ha portato a numerosi vantaggi: l'acido lattico viene prodotto a basso costo dai batteri stessi; i sali risultanti dal processo possono essere impiegati come prodotti antigelo o come conservanti alimentari; le sostanze proteiche vengono precipitate e recuperate per l'utilizzo come mangimi.

Le caratteristiche fisiche del chitosano ottenuto attraverso i due metodi sopra riportati non differiscono apprezzabilmente: esso si presenta sottoforma di polvere fine o in scaglie di colore variabile dal giallastro al bianco, insapore e con un leggero caratteristico odore. Il chitosano è insolubile in acqua a pH neutro e alcalino e in alcuni solventi organici, mentre è solubile negli acidi, in conseguenza della protonazione del gruppo amminico che porta alla formazione di sale con l'anione dell'acido utilizzato (acido glutammico, cloridrico, acetico, lattico). La forma salificata più comunemente usata è quella con acido glutammico o acido cloridrico: i sali sono solubili in acqua, anche se il grado di solubilizzazione dipende dal grado di deacetilazione del chitosano e dal pH della soluzione. Nell'intervallo di pH dei sistemi acquosi naturali (pH=6–8), i gruppi amminici del chitosano si presentano in forma protonata e il composto assume le caratteristiche di un acido di Lewis capace, quindi di interagire con gruppi leganti basici. Il chitosano con un basso grado di deacetilazione, intorno al 40%, è solubile anche a valori di pH inferiori a 9, mentre il chitosano con un grado di deacetilazione intorno all'85%, è solubile solo a valori di pH inferiori a 6,5. Il grado di deacetilazione, inoltre, influenzando la viscosità della soluzione ne determina anche la configurazione, passando da una forma allungata, molto flessibile in relazione a un alto grado di deacetilazione alla forma ad alfa elica per una deacetilazione di grado inferiore. Infine, la solubilità del chitosano è influenzata dalla presenza di sali alla soluzione in quanto, maggiore è la forza ionica della soluzione, minore è la sua solubilità. Il comportamento del chitosano come poliacidone in ambiente acido spiega la sua abilità a formare complessi con molecole cariche negativamente, quali lipidi e proteine, presenti in soluzione od allo stato colloidale provocandone la flocculazione (Muzzarelli, 1985; Shahidi *et al.*, 1999) e di conseguenza l'allontanamento dalla soluzione.

2. Applicazioni industriali del chitosano

Oggigiorno il chitosano viene prodotto in diversi paesi utilizzando principalmente il metodo chimico e l'interesse principale per questo prodotto deriva soprattutto dalle sue caratteristiche biologiche che ne permettono l'uso in una vasta gamma di applicazioni. Esso viene impiegato perfino nel settore alimentare in quanto possiede una tossicità molto bassa: nei topi è stata valutata la DL_{50} superiore a 16 g/giorno/kg peso corporeo. Come già accennato sopra, le difficoltà legate al processo di estrazione che, anche se non complesso, richiede comunque accurati livelli di controllo per ottenere un prodotto finale con determinate caratteristiche di purezza e funzionalità, ha impedito una maggiore diffusione del chitosano a livello industriale. È possibile affermare che, soltanto negli ultimi decenni, il chitosano ha assunto la giusta importanza come biomateriale largamente utilizzato in applicazioni ambientali, quali il trattamento delle acque reflue per la rimozione dei metalli pesanti o nei processi di potabilizzazione dell'acqua, nell'industria tessile come antibatterico o come fibra naturale, nell'industria cosmetica come additivo, nell'industria farmaceutica nei processi di rilascio controllato dei farmaci, nell'industria alimentare come integratore coadiuvante la perdita del peso corporeo.

Il chitosano come biomateriale

Per biomateriale si intende una sostanza che presenti affinità con i sistemi biologici, al fine di trattare, accrescere, sostituire tessuti e parti di organi o migliorare alcune funzioni: la biocompatibilità è fondamentale per l'impiego del materiale impiegato (Ratner *et al.*, 1996) nelle applicazioni di natura medica e farmaceutica. Le interazioni tra il materiale impiegato e l'organismo vivente avvengono a diversi livelli: fisico, chimico, molecolare e inducendo uno stato di "azione-reazione". Il biomateriale può provocare una risposta biologica nell'organismo che può reagire attraverso un processo di

degradazione del biomateriale o di rigetto dello stesso. I materiali impiegati nel settore della medicina possono essere di origine biologica o sintetica e costituiscono i componenti principali delle protesi: già nei tempi antichi si usava sostituire parti del corpo umano danneggiate per permettere una vita migliore. Nelle antiche tombe egizie sono state scoperte mummie con protesi costituite da vari metalli, principalmente ferro; anche presso i Fenici era pratica usuale legare denti artificiali a quelli naturali con fili d'oro. Hieronimus Fabricius d'Acquapendente (1628), professore di anatomia a Padova, nella sua "Opera chirurgica", precisamente nel capitolo "De eruto e ammisso oculo", tratta della sostituzione con un occhio artificiale di vario materiale, vetro, pietra, argento da sostituire per correggere la deformità derivante dalla perdita dell'occhio. Una mummia trovata a Luxor, appartenente a una donna, risalente alla XVIII dinastia (circa 3000 anni fa), presentava al piede destro la sostituzione di un alluce fatto di legno e pelle, con evidenti segni di usura a testimonianza del suo effettivo impiego funzionale. Il legno ha rappresentato il primo biomateriale per la sostituzione degli arti artificiali inferiori e superiori, sostituito poi dai metalli. Durante la guerra civile americana (1861-65) sul campo di battaglia furono adoperati chiodi da carpentiere per bloccare le fratture del femore dei soldati feriti. La tendenza alla corrosione dei metalli comuni come il ferro, il piombo ecc. ha portato la loro sostituzione con leghe soprattutto di platino e titanio che presentano sia grande stabilità chimica che elevata resistenza meccanica e possono essere applicate in una sconfinata varietà di formati. L'introduzione delle materie plastiche ha portato un notevole miglioramento delle protesi data la loro leggerezza: il polimetilmetacrilato è stato impiegato come materiale per le lenti intraoculari senza che i pazienti presentassero reazioni a causa di un corpo estraneo. Poiché il rigetto è un fenomeno frequente, diventa necessario sia purificare il più possibile i polimeri già disponibili riducendo al minimo le contaminazioni, che ricercare e sintetizzare nuovi e innovativi biomateriali per applicazioni specifiche che risolvano i problemi derivanti dal contatto con le diverse parti dell'organismo umano o animale. Perciò sono stati così sviluppati materiali per protesi ossee con capacità osteointegrative; *stent* aorto-coronarici ricoperti da materiali che impediscono il restringimento dell'arteria; sistemi di rilascio controllato di farmaci nel circolo sanguigno; costruzione di una nuova pelle, combinando polimeri con cellule del paziente per ricostruire tessuti che hanno subito bruciature. Oggigiorno, l'inge-

gneria tissutale rappresenta un campo interdisciplinare emergente che applica i principi della natura biologica, chimica e scienze ingegneristiche, utilizzando biomateriali da soli o in combinazione per ripristinare, mantenere o migliorare la funzione dei tessuti (Langer *et al.*, 1993).

Il principio di questa disciplina consiste nell'isolamento di cellule sane da un individuo, seguita dalla loro espansione *in vitro*; successivamente queste cellule espanse sono seminate su di una impalcatura (*scaffold*) tridimensionale composta da biomateriale che funge sia da supporto che come fattore di crescita e degrada lentamente nel tempo per essere sostituito dal tessuto formato dalle cellule seminate. I materiali impiegati per queste applicazioni sono di diverso tipo; polimeri naturali come il chitosano, il collagene, la gelatina, l'acido ialuronico; polimeri sintetici: come i derivati dell'acido lattico, poliuretani, polivinil etilene acetato, policaprolattidi che mediante la tecnica di *elettrospinning* vengono ridotti in nanofibre per costituire impalcature a diverso grado di porosità.

La possibilità di ottenere elettrofilati di chitosano a diverso spessore e la possibilità di ottenere dei tessuti ha indicato la strada per ulteriori applicazioni del chitosano, non solo in campo medico, ma anche nel settore alimentare, agricolo, farmaceutico, cosmetico.

3. Attività antibatterica e antimicotica del chitosano

Negli ultimi anni, il chitosano e i suoi derivati hanno ottenuto molta attenzione come agenti antimicrobici contro funghi, batteri e virus e come attivatori biochimici del sistema di difesa delle piante (Chirkov, 2002, Didenko *et al.*, 2005; Je, 2006). Il chitosano ha trovato impieghi in molti settori, da quello agro-alimentare a quello farmaceutico e al cosmetico, fino a quello merceologico proprio grazie alla sua spiccata attività antimicrobica. Molte ricerche sono state condotte per comprendere come questo polimero eserciti la sua attività antibatterica e quale sia il suo meccanismo di azione. Una delle ipotesi più accreditate prese in considerazione è legata alla sua struttura. Infatti, la natura cationica del chitosano, per la presenza di azoto ammoniacale (N^+) nella molecola di glucosammina, rappresenterebbe un fattore fondamentale alla sua interazione con la superficie cellulare microbica carica negativamente, inducendo il blocco dell'attività batterica vitale. Alcuni ricercatori hanno approfondito alcune caratteristiche del chitosano, quali la sua capacità a legare l'acqua, a chelare metalli in tracce e la capacità ad interagire con il DNA, per poter spiegare il meccanismo dell'azione antimicrobica. L'attività antimicrobica è influenzata da diversi fattori, come è stato accertato dal trattamento con chitosano sulle cellule di *Staphylococcus simulans* 22. Essa infatti dipende sia dal peso molecolare del polimero di chitosano che dal suo grado di acetilazione e l'inibizione della crescita batterica è dose dipendente. Infatti l'aumento della permeabilità della membrana cellulare accoppiato a una significativa depolarizzazione della membrana stessa costituiscono un sistema complesso che deve essere valutato attentamente caso per caso per raggiungere l'effetto antibatterico. È stato anche osservato che il trattamento con chitosano comporta numerosi cambiamenti nel profilo genetico del *Staphylococcus aureus* SG511, coinvolto nella regolazione delle condizioni di stress e di autolisi, nonché dei geni associati con il metabolismo energetico.

Meccanismo chimico di azione del chitosano per l'attività antimicrobica

Dai risultati sperimentali riportati in letteratura risulta chiaramente che l'attività antimicrobica non può essere concentrata su un unico bersaglio; tuttavia, non essendo ancora chiaro quale sia il meccanismo di azione, si è inclini a dare maggiore risalto alla principale caratteristica del chitosano, la sua elettropositività. Nei batteri Gram positivi sono presenti gli acidi teicoici, polimeri di alcoli polivalenti legati tra loro da gruppi fosforici, con residui di alanina, componenti importanti della membrana citoplasmatica.

A causa della loro carica negativa, gli acidi teicoici sono in parte responsabili della carica complessiva negativa della superficie cellulare e possono contribuire al passaggio di ioni attraverso la parete cellulare. Gli acidi teicoici legano anche i cationi bivalenti, come Ca^{2+} e Mg^{2+} , trasportandone una parte di essi all'interno della cellula. Nei batteri Gram-positivi alcuni acidi teicoici contenenti glicerolo sono strettamente legati ai lipidi della membrana formando acidi lipoteicoici. Il chitosano carico positivamente verrebbe attratto dalla carica negativa della membrana citoplasmatica del batterio, legandosi agli acidi lipoteicoici e, per estrazione dei lipidi di membrana, causerebbe la morte della cellula batterica. Alcuni autori hanno dimostrato che vi sono notevoli interazioni elettrostatiche e idrofobiche, nonché legami idrogeno tra lipidi e chitosano che possono avvalorare questa teoria (Wydro *et al.*, 2003; Raafat *et al.*, 2008). Secondo altri autori, il chitosano o alcuni suoi derivati potrebbero essere assorbiti dalle cellule batteriche, perché carichi positivamente e interagire con il DNA inibendo la trascrizione non solo del DNA, ma anche dell'RNA e di conseguenza la sintesi proteica (Tarsi *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2001). La potenzialità antimicrobica del chitosano risulta di grande importanza nella progettazione di sistemi antimicrobici nel settore industriale, sia per quanto riguarda la conservazione degli alimenti sia nel settore farmaceutico per la protezione dei farmaci (Roller, 2003). È stato dimostrato, infatti, che il chitosano con basso peso molecolare medio (< 10 kDa) possiede maggiore attività antimicrobica del chitosano ad elevato peso molecolare: questo comportamento può essere messo in relazione con una maggiore solubilità in mezzo acquoso, condizione importante per poter interagire con i microrganismi. Per incrementare l'attività antibatterica è necessario, inoltre, che il polimero sia costituito da almeno sette unità di glucosammi-