



# UNIVERSITY OF SALERNO

*DEPARTMENT OF INDUSTRIAL ENGINEERING*

*Ph.D. Course in Industrial Engineering  
Curriculum in Chemical Engineering - XXXV Cycle*

**Development of edible coating functionalized with hydroxyapatite, complexed with bioactive compounds for the shelf-life extension of food products**

**Ph.D. student**

**Angela Michela Immacolata Montone**

Matr. n. 8800500098

## Ph.D. Abstract: English version

The main goal of food packaging is to protect the food from physical, chemical and biological contaminations. The environmental impact of conventional food packaging directed research towards new packaging strategies based on environmentally friendly and biodegradable natural polymers. The nature of biopolymers influences the physicochemical and mechanical properties of films and coatings such as mechanical stability, transparency, moisture and gas barrier. Generally, polysaccharides are employed to avoid gas permeability, lipids limit water vapour transmission, and proteins improve the mechanical stability of the structure.

A novel way to preserve the safety of food products and prolong their shelf life is represented by the incorporation into edible coatings of active compounds, such as nutrients, antioxidants, antimicrobials, colorants, and flavorings, which are mainly used to improve the functional properties of coatings. However, the poor stability of these bioactive compounds under processing conditions and during storage makes it necessary to use a carrier system for the release of the compound from the coating to the product surface.

Among several carrier systems adopted to protect active compounds, hydroxyapatite crystals seem to be attractive candidates for this application.

Hydroxyapatite is a calcium phosphate similar to that present in the human hard tissues as regard morphology and composition. It is used especially for the fabrication of inorganic scaffolds for bone replacement and tissue engineering. Thanks to its structure and composition, this mineral is able to chemically interact with different organic molecules such as proteins and antimicrobial peptides, representing a potential carrier for the delivery of bioactive compounds in the development of active systems.

On the basis of the above considerations, my research project has been focused on the development and optimization of an alginate-based edible coating enriched with hydroxyapatite crystals complexed with active compounds, for the shelf life extension of food products.

Among active compounds, the flavonoid quercetin has been already used in different active systems mainly for its antioxidant capacity. However, my interest was also focused on its potential antimicrobial activity. The results on antimicrobial activity of quercetin glycoside compounds against *Pseudomonas fluorescens*, one of the most abundant Gram negative bacteria responsible for meat and meat products spoilage, showed a total bacterial reduction at 1000 mg/L and 500 mg/L of quercetin. Similar results were obtained when quercetin was loaded into hydroxyapatite structure, at the same quercetin amount.

Hydroxyapatite/quercetin complexes were preliminarily analysed by SEM, FTIR and zeta potential analysis, confirming the adsorption of quercetin into hydroxyapatite crystals that showed a micro-size dimension. Then, alginate-based coatings, developed under optimized conditions, were characterized for their ability to release quercetin in an aqueous medium, which represents the base condition during the development of active edible food packaging. The results showed a very fast release of the active compound, highlighting the ability of the developed coating to be really used in food applications, where the release of the active compounds should occur in the first hours of contact, to avoid or slow down the starting of spoilage and extend the shelf life.

Thus, the effectiveness of alginate-based edible coating enriched with hydroxyapatite/quercetin complexes was evaluated on fresh chicken fillets and fresh-cut papaya.

The microbiological analysis performed during the cold storage of coated chicken fillets highlighted the capability of alginate coating with hydroxyapatite/quercetin complexes to significantly inhibit the growth of spoilage bacteria, as well as the total volatile basic nitrogen. Moreover, the comparison among the coated samples pointed out a positive effect of hydroxyapatite to slow down the changes in hardness during the storage time of 11 days. Finally, the outcomes of colour, odour and taste evaluation both in raw and cooked fillets demonstrated that the coating with hydroxyapatite/quercetin complexes was able to preserve the sensory attributes of fresh poultry meat until the 11th day of storage.

Also in the case of fresh-cut papaya, the microbial analysis carried out during the storage period pointed out the positive effect of hydroxyapatite charged with quercetin to inhibit the growth of spoilage bacteria, as well as to slow down the respiration rate of fresh-cut papaya, preserving the antioxidant compounds naturally present in papaya, including carotenoid compounds.

With the aim to increase the antimicrobial activity of quercetin glycoside compounds, lactoferrin was added to hydroxyapatite/quercetin complexes considering its well-known antimicrobial activity versus *Pseudomonas fluorescens*. Thus, the synergistic effect of lactoferrin and quercetin loaded into hydroxyapatite structure was evaluated. The results highlighted that the antimicrobial activity depends both on the lactoferrin and quercetin concentration and on which molecule is adsorbed first into hydroxyapatite structure. In particular, the highest inhibition versus *Pseudomonas fluorescens* was obtained when the hydroxyapatite was first incubated with lactoferrin and then with quercetin, at concentration of 100 ppm (w/v) for both compounds.

The kinetic release of quercetin and lactoferrin from alginate-based coating in an aqueous medium pointed out a faster release of lactoferrin than quercetin due to the different solubility of the active compounds in the aqueous medium indicating that the different interactions of the active compounds could show with hydroxyapatite structure. However, the equilibrium was reached in 70 h and 30 h for quercetin and lactoferrin respectively. Finally, the effectiveness of alginate-based coating loaded with hydroxyapatite/lactoferrin/quercetin complexes on fresh-pork meat was evaluated.

The activated alginate-based coating with hydroxyapatite/lactoferrin/quercetin complexes showed a high capability to slow down the growth of spoilage bacteria during the storage of 15 days at 4°C, as well as the production of the total volatile basic nitrogen. The activated coating showed also high efficacy in preserving the colour and texture parameters of pork meat. Finally, according to sensory results, fresh pork meat samples coated with alginate-based coating loaded with hydroxyapatite/lactoferrin/quercetin complexes still showed, at the end of the storage period, suitable sensory attributes for commercial purposes.

## Ph.D. Abstract: Versione italiano

L'obiettivo principale del confezionamento alimentare è quello di proteggere il cibo da contaminazioni fisiche, chimiche e biologiche. L'impatto ambientale degli imballaggi alimentari convenzionali ha orientato la ricerca verso nuove strategie di imballaggio basate su polimeri naturali ecocompatibili e biodegradabili. La natura dei biopolimeri influenza le proprietà fisico-chimiche e meccaniche di pellicole e rivestimenti come stabilità meccanica, trasparenza, umidità e barriera al gas. Generalmente, i polisaccaridi sono impiegati per evitare la permeabilità del gas, i lipidi limitano la trasmissione del vapore acqueo e le proteine migliorano la stabilità meccanica della struttura. Un nuovo modo per preservare la sicurezza dei prodotti alimentari e prolungarne la durata di conservazione è rappresentato dall'incorporazione in rivestimenti commestibili di composti attivi, come nutrienti, antiossidanti, antimicrobici, coloranti, e aromi, che vengono utilizzati principalmente per migliorare le proprietà funzionali dei rivestimenti. Tuttavia, la scarsa stabilità di questi composti bioattivi in condizioni di lavorazione e durante lo stoccaggio rende necessario utilizzare un sistema di supporto per il rilascio del composto dal rivestimento alla superficie del prodotto. Tra i diversi sistemi di supporto adottati per proteggere i composti attivi, i cristalli di idrossiapatite sembrano essere candidati attraenti per questa applicazione. L'idrossiapatite è un fosfato di calcio simile a quello presente nei tessuti duri umani per quanto riguarda la morfologia e la composizione. Viene utilizzato soprattutto per la fabbricazione di ponteggi inorganici per la sostituzione ossea e l'ingegneria dei tessuti. Grazie alla sua struttura e composizione, questo minerale è in grado di interagire chimicamente con diverse molecole organiche come proteine e peptidi antimicrobici, rappresentando un potenziale vettore per la consegna di composti bioattivi nello sviluppo di sistemi attivi. Sulla base delle considerazioni di cui sopra, il mio progetto di ricerca è stato focalizzato sullo sviluppo e l'ottimizzazione di un rivestimento commestibile a base di alginato arricchito con cristalli di idrossiapatite complessi con composti attivi, per l'estensione della shelf- life dei prodotti alimentari. Tra i composti attivi, il flavonoide quercetina è già stato utilizzato in diversi sistemi attivi principalmente per la sua capacità antiossidante. Tuttavia, il mio interesse è stato focalizzato anche sulla sua potenziale attività antimicrobica. I risultati sull'attività antimicrobica dei composti glicosidici della quercetina contro *Pseudomonas fluorescens*, uno dei batteri Gram negativi più abbondanti, responsabili del deterioramento della carne e dei prodotti a base di carne ha mostrato una riduzione batterica totale a 1000 mg/L e 500 mg/L di quercetina. Risultati simili sono stati ottenuti quando la quercetina è stata caricata nella struttura dell'idrossiapatite, alla stessa quantità di quercetina. I complessi di idrossiapatite/quercetina sono stati analizzati preliminarmente da SEM, FTIR e analisi del potenziale zeta, confermando l'adsorbimento della quercetina nei cristalli di idrossiapatite che hanno mostrato una dimensione micro dimensionale. Poi, i rivestimenti a base di alginato, sviluppati in condizioni ottimizzate, sono stati caratterizzati per la loro capacità di rilasciare quercetina in un mezzo acquoso, che rappresenta la condizione di base durante lo sviluppo di imballaggi alimentari attivi. I risultati hanno mostrato un rilascio molto rapido del composto attivo, evidenziando la capacità del rivestimento sviluppato di essere realmente utilizzato nelle applicazioni alimentari, dove il rilascio dei composti attivi dovrebbe avvenire nelle prime ore di contatto, per evitare o rallentare l'inizio del deterioramento e prolungare la durata di conservazione. Pertanto, l'efficacia del rivestimento commestibile a base di

alginato arricchito con complessi di idrossiapatite/ quercetina è stata valutata su filetti di pollo freschi e papaia fresca. L'analisi microbiologica eseguita durante la conservazione frigorifera dei filetti di pollo rivestiti ha evidenziato la capacità del rivestimento di alginato con complessi di idrossiapatite/quercetina di inibire significativamente la crescita dei batteri del deterioramento e l'azoto basico volatile totale. Inoltre, il confronto tra i campioni rivestiti ha evidenziato un effetto positivo dell'idrossiapatite per rallentare i cambiamenti di durezza durante il tempo di conservazione di 11 giorni. Infine, i risultati della valutazione del colore, dell'odore e del gusto nei filetti crudi e cotti hanno dimostrato che il rivestimento con complessi di idrossiapatite/quercetina è stato in grado di preservare le caratteristiche sensoriali della carne di pollame fresco fino all'undicesimo giorno di stoccaggio. Anche nel caso della papaia fresca, l'analisi microbica effettuata durante il periodo di conservazione ha evidenziato l'effetto positivo dell'idrossiapatite caricata con quercetina per inibire la crescita dei batteri di deterioramento, nonché per rallentare il tasso di respirazione della papaia fresca tagliata, conservando i composti antiossidanti naturalmente presenti nella papaia, compresi i composti carotenoidi. Con l'obiettivo di aumentare l'attività antimicrobica dei composti glicosidici della quercetina, la lattoferrina è stata aggiunta ai complessi di idrossiapatite/quercetina considerando la sua ben nota attività antimicrobica rispetto a *Pseudomonas fluorescens*. È stato quindi valutato l'effetto sinergico della lattoferrina e della quercetina caricate nella struttura dell'idrossiapatite. I risultati hanno evidenziato che l'attività antimicrobica dipende sia dalla concentrazione di lattoferrina e quercetina e da quale molecola viene adsorbita prima nella struttura dell'idrossiapatite. In particolare, la più alta inibizione rispetto a *Pseudomonas fluorescens* è stata ottenuta quando l'idrossiapatite è stata prima incubata con lattoferrina e poi con quercetina, alla concentrazione di 100 ppm (w/v) per entrambi i composti. Il rilascio cinetico di quercetina e lattoferrina da rivestimenti a base di alginato, in un mezzo acquoso, ha evidenziato un rilascio più rapido di lattoferrina rispetto alla quercetina a causa della diversa solubilità dei composti attivi nel mezzo acquoso, indicando che le diverse interazioni dei composti attivi potrebbero manifestarsi con la struttura dell'idrossiapatite. Tuttavia, l'equilibrio è stato raggiunto in 70 h e 30 h per quercetina e lattoferrina rispettivamente. Infine, è stata valutata l'efficacia del rivestimento a base di alginato caricato con complessi di idrossiapatite/lattoferrina/quercetina sulla carne suina fresca. Il rivestimento a base di alginato attivato con idrossiapatite/lattoferrina/quercetina ha mostrato un'elevata capacità di rallentare la crescita dei batteri di deterioramento durante lo stoccaggio di 15 giorni a 4 ° C, nonché la produzione dell'azoto basico volatile totale. Il rivestimento attivato ha mostrato anche un'elevata efficacia nel preservare i parametri di colore e consistenza della carne di maiale. Infine, secondo i risultati sensoriali, campioni di carne suina fresca rivestiti con rivestimento a base di alginato caricato con complessi di idrossiapatite/ lattoferrina/ quercetina hanno ancora mostrato, alla fine del periodo di conservazione, attributi sensoriali adatti per scopi commerciali.