

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA  
CAMPUS DI CESENA

---

SCUOLA DI AGRARIA E MEDICINA VETERINARIA  
*DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGRO-ALIMENTARI*  
*CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN SCIENZE E TECNOLOGIE*  
*ALIMENTARI*

**TESI**

in

Tecnologie Alimentari

**Applicazione dell'acqua attivata al plasma (PAW) ed  
implementazione di un sistema di visione computerizzata  
(CVS) per il controllo e la valutazione della melanosì nei  
crostacei**

CANDIDATO

Federico Drudi

RELATORE

Chiar.mo Prof. Pietro Rocculi

CORRELATRICE

Dott.ssa Jessica Genovese

Anno accademico 2020/2021

Sessione unica



# Riassunto

I crostacei sono da sempre considerati prodotti ittici d'elevato valore economico (FAO 2020) soggetti ad un'alta deperibilità a causa dello sviluppo di colorazioni brune nella zona cefalotoracica ed addominale del carapace (Gonçalves et al. 2016).

Nell'ottica di una riduzione degli sprechi alimentari e vista la crescente sensibilità dei consumatori verso alimenti *clean-label*, questo studio valuta l'effetto dell'acqua attivata al plasma (PAW) nel ritardare la comparsa di melanosi su mazzancolle (*P. kerathurus*) e gamberi rosa (*P. longirostris*), confrontandone l'effetto con i più comuni trattamenti (solforosa e 4-esilresorcinolo). La valutazione della melanosi si è svolta per mezzo di un sistema di visione computerizzata (CVS) e successiva analisi delle immagini digitalizzate.

Dalle prove sulle mazzancolle è emerso un effetto protettivo dell'acqua attivata al plasma per i primi 5 giorni di conservazione, mentre per i gamberi rosa non si sono ottenute differenze significative ( $p < 0.05$ ) rispetto ai campioni trattati con sola acqua.

I migliori risultati nel contenimento della melanosi si sono ottenuti dai campioni trattati con 4-esilresorcinolo, tuttavia si è anche sviluppata una colorazione rossa sul carapace giudicabile, secondo altri studi, come sgradevole (Pilar Montero et al. 2001).



# Indice

<b>1</b>	<b>Introduzione</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Parte generale</b>	<b>5</b>
2.1	I Crostacei Decapodi . . . . .	5
2.1.1	Gambero Rosa ( <i>Parapenaeus longirostris</i> ) . . . . .	6
2.1.2	Mazzancolla ( <i>Melicertus kerathurus</i> ) . . . . .	8
2.2	La melanosi nei crostacei . . . . .	9
2.2.1	Le fasi della reazione di imbrunimento . . . . .	10
2.2.2	Le polifenolossidasi (PPO) . . . . .	11
2.3	Strategie di controllo della melanosi . . . . .	14
2.3.1	Additivi per il controllo della melanosi . . . . .	15
2.3.2	Acqua attivata al plasma (PAW) . . . . .	19
2.4	Sistemi di visione computerizzata (CVS) . . . . .	22
2.4.1	Strumentazione . . . . .	22
2.4.2	Elaborazione delle immagini . . . . .	24
2.4.3	L'utilizzo di CSV per la valutazione della melanosi . . . . .	27
<b>3</b>	<b>Materiali e metodi</b>	<b>31</b>
3.1	Preparazione dei campioni . . . . .	31
3.1.1	Provenienza e stoccaggio dei campioni . . . . .	31
3.1.2	Trattamenti . . . . .	31
3.2	Analisi d'immagine . . . . .	32
3.2.1	Acquisizione delle immagini . . . . .	32
3.2.2	Pre-elaborazione . . . . .	33
3.2.3	Analisi . . . . .	33

3.3	Analisi statistica . . . . .	35
<b>4</b>	<b>Risultati e discussione</b>	<b>37</b>
4.1	Valutazione melanosi . . . . .	37
4.2	Valutazione arrossamento . . . . .	41
4.2.1	Tinta (H) . . . . .	42
4.2.2	Indice rosso-verde ( $a^*$ ) . . . . .	43
4.3	Valutazione degli istogrammi . . . . .	44
<b>5</b>	<b>Conclusioni</b>	<b>49</b>
	<b>Bibliografia</b>	<b>50</b>

# Capitolo 1

## Introduzione

Il gruppo dei crostacei è un'insieme specie di artropodi marini molto diversificati fra loro e di elevato interesse sia alimentare che economico. Alcune specie sono caratterizzate da un valore economico elevato rispetto ad altri prodotti ittici e pertanto, seppur il consumo pro-capite mondiale sia solo di 2 Kg/anno (di peso vivo) rispetto ai 9,2Kg/anno per i pesci, lo stesso rapporto risulta essere ben differente considerando il valore economico (FAO 2020).

Il pesce e i prodotti ittici in generale sono alcuni fra i prodotti più scambiati e commercializzati a livello mondiale. Nonostante i quantitativi del pescato siano rimasti tendenzialmente stabili dalla fine degli anni ottanta si è visto un costante e consistente aumento dei prodotti ottenuti dall'acquacoltura (FAO 2020).

In questo quadro i crostacei hanno raggiunto una produzione da acquacoltura di 9.4 milioni di tonnellate nel 2018 (concentrata principalmente in pochi paesi asiatici) contro 6.5 milioni di tonnellate per le catture in mare, rappresentando assieme il 22% del valore totale dei prodotti ittici commercializzati a livello globale (FAO 2020).

Nonostante la produzione da acquacoltura abbia abbondantemente superato la produzione dovuta alla pesca è doveroso notare come l'acquacoltura si concentri soltanto su poche specie di crostacei, principalmente Mazzancolla tropicale (*Penaeus vannamei*), Gambero della Luisiana (*Procambarus clarkii*), Gambero gigante (*Penaeus monodon*) e Granchio cinese (*Eriocheir sinensis*) le quali da sole ricoprono l'87,2% dei crostacei d'acquacoltura mentre con la pesca in mare si ha una varietà di specie catturate molto maggiore (FAO 2020).

Sebbene siano molto diversificate fra di loro, le varie specie di crostacei sono qua-

si tutte caratterizzate da un problema ricorrente, ovvero l'elevata deperibilità del prodotto fresco e l'alta suscettibilità a problematiche qualitative. Una delle principali degradazioni di carattere qualitativo è la comparsa di melanosi, che comporta la presenza di macchie scure sul prodotto deprezzandone notevolmente il valore (Gonçalves et al. 2016; Nirmal, Benjakul et al. 2015).

La melanosi, nonostante non porti direttamente a problematiche sanitarie (in genere compare con tempistiche più celeri), risulta esservi spesso correlata in quanto indice di una cattiva conservazione (Gonçalves et al. 2016). A livello industriale risulta essere una problematica di spiccato interesse in quanto si presenta già dopo poche ore in presenza d'ossigeno e porta ad un'alterazione irreversibile del prodotto e quindi ad ingenti danni economici (Pilar Montero et al. 2001; Haard et al. 2000).

Nell'ottica di ridurre i danni economici e gli sprechi lungo la filiera sono innumerevoli gli studi svolti che cercano, attraverso l'implementazione delle più disparate tecnologie, di allungare la *shelf-life* di prodotti sia freschi che lavorati. Per quanto riguarda la melanosi sono state studiate differenti tecniche anche se la più in uso ad oggi rimane l'aggiunta di solfiti (Haard et al. 2000). Questi, seppur causando reazioni allergiche in soggetti sensibili (Nirmal, Benjakul et al. 2015), hanno il vantaggio d'essere economici, di semplice impiego ed estremamente efficaci. Recentemente però, la forte richiesta da parte dei consumatori verso prodotti *clean label* ha spinto a ricercare metodi innovativi che vedono l'utilizzo di additivi alternativi, oltre che a tecniche e pratiche industriali specifiche (Gonçalves et al. 2016). Tra gli additivi alternativi troviamo l'uso di 4-esilresorcinolo (4-HR), polifenoli naturali, chitosano e molti altri. Anche l'uso di atmosfere modificate (MAP) o *slurry-ice* sono state oggetto di studi (Gonçalves et al. 2016; Nirmal, Benjakul et al. 2015). In questo quadro potrebbe trovare un'applicazione anche l'acqua attivata al plasma (PAW) che, grazie all'attività dei composti chimici che la caratterizzano, potrebbe utilizzarsi come alternativa ai più comuni solfiti (Esua et al. 2021; Herianto et al. 2021).

In generale, la quantificazione dell'imbrunimento dei crostacei si basa sulla valutazione visiva da parte di un gruppo di esperti, i quali esprimono un giudizio su una scala da 1 a 10 sfruttando una procedura definita ma comunque soggettiva, risultando essere quindi poco standardizzabile e automatizzabile. Vista tale criticità negli

ultimi anni si è cercato di sviluppare dei sistemi in grado di eseguire la valutazione dell'aspetto visivo dei prodotti in modo automatizzato e maggiormente ripetibile, al fine di rendere la valutazione applicabile anche in linea. Una soluzione potrebbe essere rappresentata dall'utilizzo di sistemi di visione computerizzata (CVS) per l'analisi di immagini digitalizzate.

In questo quadro il presente lavoro cerca di valutare l'eventuale effetto antime-lanotico dell'acqua plasmata. Questa nuova tecnologia infatti vede la creazione di varie molecole all'interno dell'acqua le quali potrebbero avere un effetto nelle fasi di formazione dei pigmenti scuri simile a quello dei più comuni additivi utilizzati. Pertanto si cerca di valutare l'effetto di tale tecnica confrontandolo con metodi convenzionali come l'uso di solfiti e 4-HR.



# Capitolo 2

## Parte generale

### 2.1 I Crostacei Decapodi

I Decapodi rappresentano l'ordine più ampio della classe Crustacea. Vi sono raggruppati organismi molto vari (come gamberi, granchi e aragoste) sia nelle forme che nelle abitudini di vita (alcune specie anche terrestri). Nonostante l'ampia variabilità vi sono alcuni caratteri comuni che ne permettono l'identificazione e la distinzione rispetto agli altri crostacei (Falciai et al. 1992). Il carattere principale che si nota è la presenza di una lamina sclerificata detta carapace che ricopre il capo, il torace e, lateralmente, le camere branchiali (cafalotorace). Inoltre i decapodi presentano le prime 3 appendici toraciche trasformate in appendici boccali (massillipedi) mentre le restanti 5 paia sono vere e proprie zampe (pleopodi) (Falciai et al. 1992).

Ad oggi vi è ancora molto dibattito riguardante la tassonomia dei crostacei in generale e dei decapodi e, pertanto, la presente descrizione ha solo lo scopo di identificare e posizionare le specie più conosciute a livello commerciale. A questo scopo ci si rifà alla classificazione proposta da Alvarez (1968).

I Decapodi si suddividono in 2 sottordini, Natantia e Reptantia. I primi sono animali ben adattati al nuoto, con il corpo compresso lateralmente e gli pleopodi (zampe) utilizzati per nuotare. L'addome è molto sviluppato e l'esoscheletro non troppo calcificato permette l'elasticità necessaria per il nuoto (D'Agaro et al. 2012). In questo gruppo, comprendente tutte quelle specie volgarmente chiamate gamberi, ritroviamo 4 superfamiglie fra cui citiamo Penaeidea la quale comprende entrambe le specie studiate in questo elaborato *P. longirostris* e *M. kerathurus*.

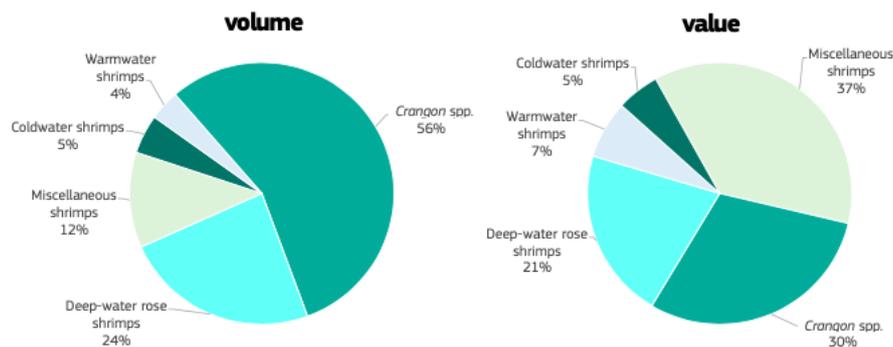


Figura 2.1: Ripartizione fra le principali tipologie di gamberi per valore e volumi degli sbarchi in Europa nel 2018 (EUMOFA 2020).

Il sottordine Reptantia è invece più variegato, comprendente varie superfamiglie le quali si raggruppano in 3 gruppi: Macrura, Brachyura e Anomura. Il primo gruppo raccoglie specie generalmente di grandi dimensioni e importanti economicamente (aragoste, scampi e astici), caratterizzate da un'addome sviluppato che a riposo si ritrova ripiegato sotto al cefalotorace, il telson (coda) è ampio e le zampe adattate a camminare (D'Agaro et al. 2012). Il gruppo Brachyura, altrettanto importante economicamente, comprende tutte le specie di granchi ovvero animali caratterizzati da un cefalotorace appiattito ed ingrandito sotto al quale si ritrova l'addome ripiegato e nascosto. Questi animali sono estremamente adattati a camminare sul fondale e spesso sono anche anfibi. Il gruppo degli Anomura è quello di minor interesse economico, e comprende specie molto diversificate morfologicamente (Falciai et al. 1992).

### 2.1.1 Gambero Rosa (*Parapenaeus longirostris*)

*Parapenaeus longirostris* (Lucas, 1846), noto in Italia con il nome di gambero rosa (*deep water pink shrimp* in inglese) è un crostaceo di medie dimensioni (14-16cm) dalla colorazione rosa-arancio tenue (quando presenti le uova hanno colorazione verde) e si distingue dalle altre specie per la presenza di un caratteristico "dente" sul carapace (Mipaaft 2019).

Lo si ritrova nell'intero bacino del mediterraneo, sulle coste est-atlantiche dal Portogallo all'Angola e sulle coste ovest dell'atlantico dal Massachusetts alla Guinea francese (FAO FishFinder). Vive sui fondali sabbiosi fino a profondità di 500 m e, nonostante la sua ampia diffusione, riveste un importante ruolo economico quasi solo

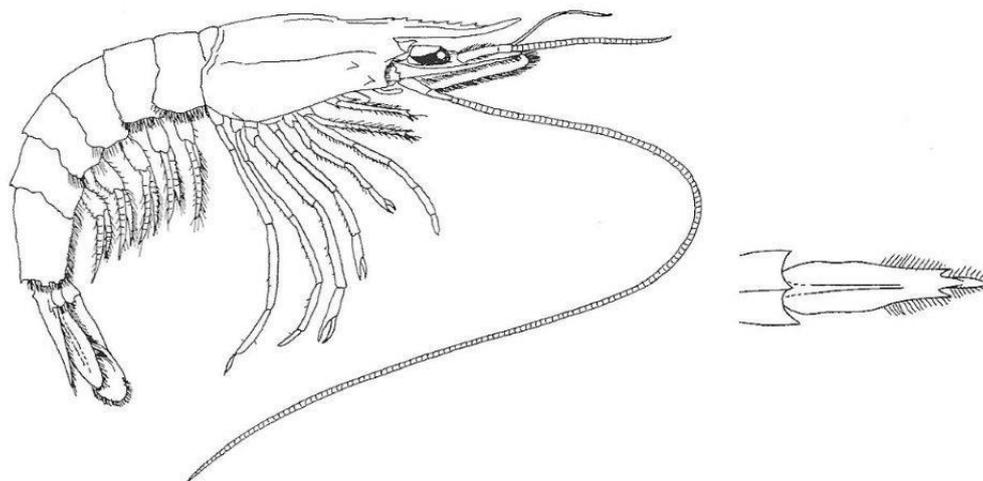


Figura 2.2: *P. longirostris* con particolare del telson (Falciai et al. 1992).

nel bacino del mediterraneo da dove proviene gran parte della produzione mondiale. In figura 2.1 si nota come questa specie rappresenti il 24% della produzione Europea per un valore totale di 57 milioni di euro. Il prezzo alla prima vendita si attesta intorno ai 6 € in Italia e 8, 5€ (nel 2018) in Spagna con una tendenza costantemente a ribasso negli ultimi 5 anni (EUMOFA 2020).

Ad oggi la produzione proviene solo dalla pesca la quale si svolge principalmente con reti da traino e da fondo. Nello specifico la tab.2.1 mostra come l'Italia sia il principale paese produttore con circa 9 mila tonnellate pescate nel 2019, contribuendo a circa il 30% della produzione mondiale.

	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
<b>Italia</b>	10 029	8 267	8 311	7 675	9 090	8 833	9 210	9 831	9 012
<b>Spagna</b>	4 735	2 979	2 997	3 576	3 349	2 285	3 940	4 496	4 850
<b>Grecia</b>	0**	0**	0**	0**	0**	1 983	3 264	3 555	3 387
<b>Turchia</b>	1 482	1 601	1 620	2 502	1 764	1 810	2 357	3 213	3 852
<b>Tunisia</b>	1 840	2 745	3 528	2 821	2 762	2 801	3 606	3 729	3 375*
<b>Algeria</b>	925	1 115	893	986	946	1 044	1 229	1 090	1 019
<b>Albania</b>	209	1 170	1 210	1 430	1 290	1 460	1 473	1 275	962
<b>Mondo</b>	21 640	21 136	24 068	24 512	22 350	24 636	30 855	32 074	29 223

Tabella 2.1: Tonnellate di gamberi rosa sbarcate nei principali paesi produttori a livello mondiale nel periodo 2011-2019. Elaborazione *database* FAO. I valori contrassegnati da \*\* indicano una mancanza di dati mentre \* una stima da parte della FAO.

### 2.1.2 Mazzancolla (*Melicertus kerathurus*)

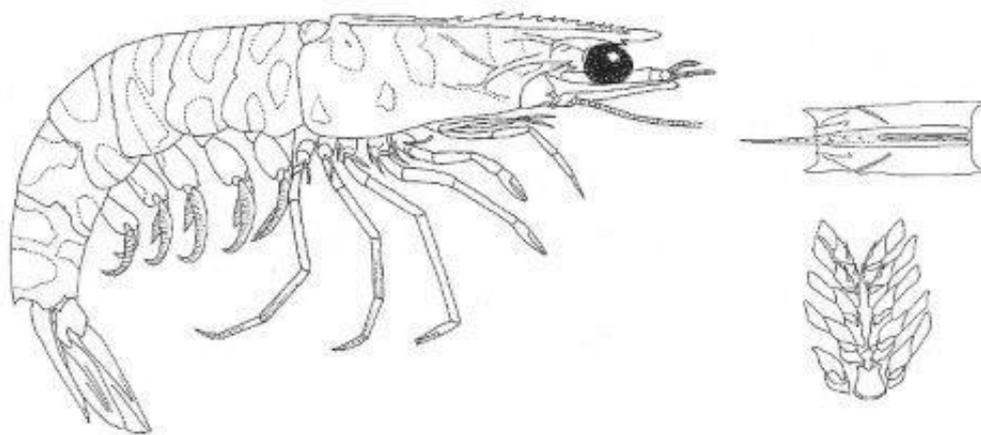


Figura 2.3: *P. karathurus* con particolari del carapace visto dal dorso e del telycum (Falciai et al. 1992)

*Melicertus kerathurus* (Forsk. 1775) noto in Italia con il nome di mazzancolla è un crostaceo decapode della famiglia Penaeidae. Comune nel Mar Mediterraneo, ed in alcune porzioni della costa atlantica, predilige fondali sabbiosi e fangosi di basse profondità (0-90m) dove si rifugia nelle ore diurne (FAO FishFinder). Presenta una colorazione biancastra tendente al rosa-grigio ed alterna bande marroni-rossastre sul carapace e segmenti addominali a macchie scure (Mipaaf 2019). Raggiunge delle dimensioni di 20-22 cm ed essendo una specie eurialina si stà cercando di allevarla. La sua disponibilità sui fondali di pesca, associata al suo elevato valore economico, contribuiscono all'attività e all'economia di molte marinerie mediterranee (Prato et al. 2011).

A livello mondiale la produzione di *M. kerathurus* oscilla molto di anno in anno, come si vede dalla tab. 2.2. Il principale paese produttore a livello mondiale è la Tunisia, mentre in Europa è l'Italia con 1676 tonnellate sbarcate nel 2018 per un valore di 25 milioni di Euro seguito da Grecia e Spagna (EUMOFA 2020). Rapporato alla categoria gamberi gli sbarchi in Europa di questa specie (indicata in fig.2.1 sotto alla voce "*warmwater shrimps*") rappresentano il 7% del valore totale a fronte di un 4% del volume complessivo, fattore indicante l'elevato valore economico di questa tipologia di prodotti. Il costo medio di questo prodotto in Italia (alla prima

	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
<b>Libia</b>	760*	450*	520*	520*	360*	375*	430*	515*	515*	515*
<b>Tunisia</b>	1 358	2 289	2 721	3 487	3 701	3 328	3 611	2 138	76	1 940*
<b>Turchia</b>	951	643	384	354	272	279	252	208	219	204
<b>Albania</b>	228	9	19	24	33	22	34	33	38	43
<b>Grecia</b>	1 918	2 225	1 602	1 853	1 492	2 860	1 404	448	512	438
<b>Italia</b>	852	747	577	638	864	1 078	1 126	1 597	1 676	1 302
<b>Spagna</b>	135	110	84	226	274	168	423	434	285	186
<b>Mondo</b>	6 205	6 476	5 911	7 104	6 998	8 111	7 285	5 374	3 322	4 631*

Tabella 2.2: Tonnellate di mazzancolle sbarcate nei principali paesi produttori a livello mondiale nel periodo 2010-2019. Elaborazione *database* FAO . I valori contrassegnati da \* indicano una stima da parte della FAO.

vendita) si attesta intorno ai 15-16 € al chilo ma con ampissime oscillazioni dovute alla reperibilità in specifici periodi dell'anno.

## 2.2 La melanosi nei crostacei

La commissione del Codex Alimentarius definisce il fenomeno della melanosi (*black spot*) come la comparsa di una pigmentazione scura nelle giunzioni e nelle zone danneggiate dei segmenti nei crostacei, dovuta a reazioni ossidative enzimatiche seguite da autossidazioni e polimerizzazioni non enzimatiche dei composti prima ottenuti (Codex Alimentarius 2012).

Queste colorazioni brunastre difatti insorgono grazie all'accumulo di melanine, composti a lunga catena insolubili e di colorazione scura che tendono ad accumularsi sotto al carapace dei crostacei. Le melanine derivano da una serie di reazioni spontanee in cui incorrono i chinoni, composti altamente reattivi i quali a loro volta sono il risultato dell'azione di enzimi specifici (polifenolossidasi o PPO) sui fenoli normalmente presenti nel prodotto (Nirmal e Benjakul 2011).

L'impatto visivo di queste colorazioni è tanto sgradito che una sua quantificazione rientra anche come parametro di giudizio sulla freschezza per i crostacei all'interno della metodologia d'analisi standardizzata QIM (*Quality Index Method*) e del regolamento CE 2406/96 sulla standardizzazione dell'analisi sensoriale nei prodotti ittici.

Generalmente l'imbrunimento comincia già dopo poche ore dalla cattura del cro-



Figura 2.4: Particolare dell'evoluzione dell'imbrunimento nel cefalotorace di *Melicertus kerathurus* conservato a secco a 4°C per 7 gg.

staceo ed è estremamente veloce in mancanza di una corretta refrigerazione ed in presenza d'ossigeno (Gonçalves et al. 2016). Il fenomeno inizia a manifestarsi principalmente nella zona del cefalotorace, nella parte terminale (uropodi e pigidio) e nella zona addominale. Generalmente le zone più sensibili sono le giunzioni fra i vari segmenti del carapace (Pilar Montero et al. 2001). Con il procedere dell'invecchiamento quelle che prima erano macchie separate si allargano coprendo l'intera parte addominale e craniale per poi estendersi verso il resto del corpo (Gonçalves et al. 2016). Nell'immagine 2.4 si può notare l'evoluzione dell'imbrunimento avvenuta in 9 giorni di conservazione a 5 °C per *Melicertus kerathurus* durante le nostre prove in laboratorio.

### 2.2.1 Le fasi della reazione di imbrunimento

Come mostrato in fig. 2.5 la formazione dei pigmenti melaninici si può suddividere in due fasi distinte, la prima enzimatica e la seconda autocatalitica. La prima fase è più studiata in quanto risulta essere più semplice, comprendente soltanto due reazioni mentre la fase non enzimatica è più complessa in quanto vede un più elevato numero di possibilità e interazioni fra i composti che si ottengono e altre molecole presenti nel mezzo (Davidek et al. 1999).

Il primo passaggio della reazione consiste nell'ottenimento di un difenolo a par-

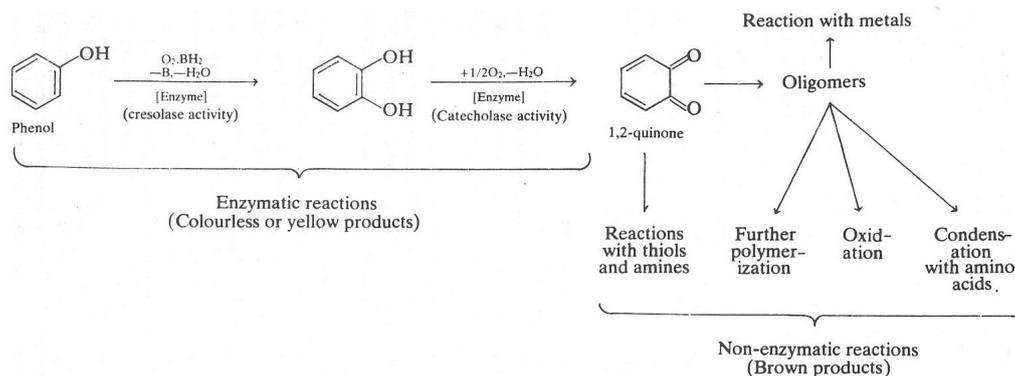


Figura 2.5: Schematizzazione del processo d'ossidazione dei fenoli in chinoni e composti a lunga catena. Si noti la suddivisione fra processi enzimatici e non (Davidek et al. 1999).

tire da una molecola monofenolica. Nello specifico si ha l'aggiunta di un gruppo idrossilico ( $-\text{OH}$ ) in posizione orto rispetto all'idrossile già presente. Questa reazione si definisce come attività monofenolica e viene mediata dalle polifenolossidasi. Il principale substrato su cui le PPO lavorano nei crostacei è l'amminoacido tirosina (fig. 2.6), da qui il nome tirosinasi per le polifenolossidasi d'origine animale (Haard et al. 2000).

Questo primo passaggio risulta essere estremamente più lento rispetto al successivo, sempre mediato da una PPO, il quale porta ad ottenere un chinone mediante l'ossidazione dei gruppi idrossilici in gruppi carbonilici ( $\text{C}=\text{O}$ ) (Nirmal, Benjakul et al. 2015). Viene indicata come attività difenolica ed è il passaggio maggiormente studiato in letteratura in quanto più rapido e direttamente correlato all'ottenimento degli o-chinoni, precursori delle melanine (Haard et al. 2000).

La seconda fase della reazione, che vede il passaggio da o-chinoni a melanine, non è così univoca in quanto i chinoni ottenuti sono molecole estremamente reattive in grado di interagire con svariati composti. In genere per ottenere le melanine i chinoni attraversano una fase di autossidazione e polimerizzazione nella quale possono partecipare anche amminoacidi e proteine (Nirmal, Benjakul et al. 2015; Haard et al. 2000).

## 2.2.2 Le polifenolossidasi (PPO)

Gli enzimi chiave di questo processo sono le polifenolossidasi (PPO), ovvero metalloenzimi contenenti rame che dopo essere stati attivati catalizzano la trasformazione dei fenoli normalmente presenti nei crostacei in chinoni. Le PPO sono un gruppo

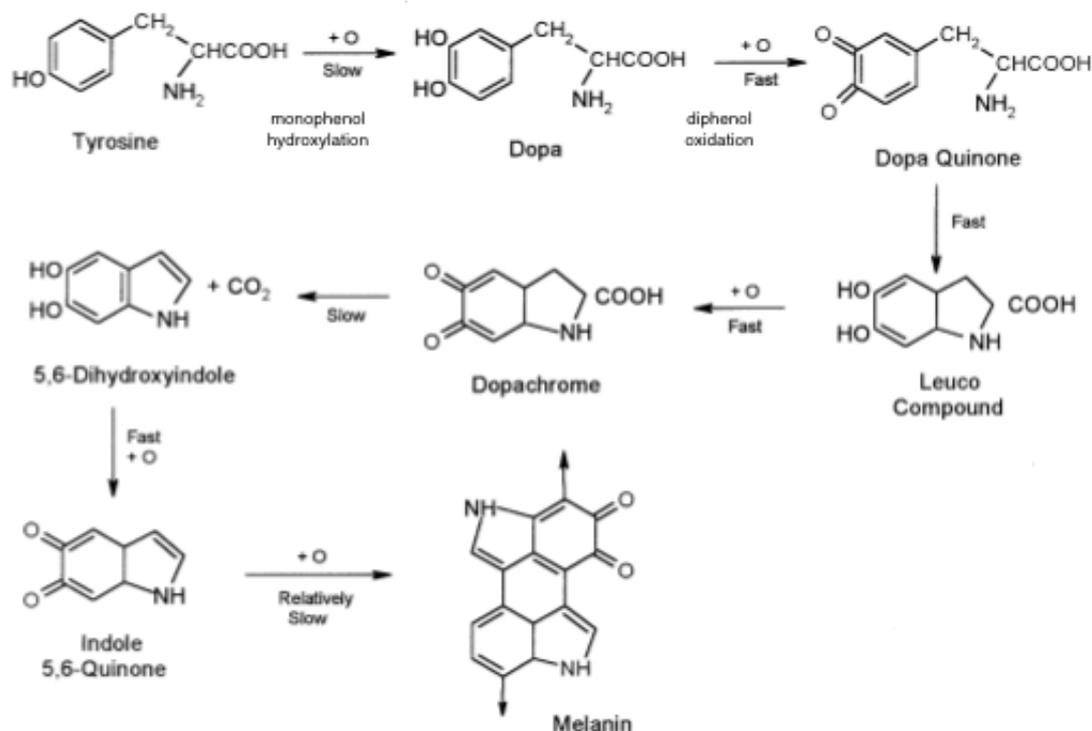


Figura 2.6: Fasi della reazione d'imbrunimento in cui incorre l'amminoacido tirosina, principale substrato di tale reazione nei prodotti ittici (Haard et al. 2000).

di enzimi presenti non solo nei crostacei, dove sono componenti cruciali di un sistema con funzioni immunitarie e di autoriconoscimento (Cerenius et al. 2008), ma si ritrovano anche in frutti e vegetali (Haard et al. 2000).

Con il termine PPO si intende un gruppo di isoenzimi i quali differiscono principalmente per la specificità verso il substrato e per la capacità di svolgere una o entrambe le reazioni d'ossidazione descritte precedentemente (attività monofenolica e difenolica) (Nirmal, Benjakul et al. 2015). Per quanto riguarda le PPO derivate dai crostacei si riscontrano entrambe le attività mentre le differenze che emergono derivano dalla velocità che spesso varia sia in base alla specie che in base all'area del corpo studiata (Pilar Montero et al. 2001). Diversi autori hanno riscontrato delle differenze in termini di peso e di valori ottimali di pH e T° come mostrato in tab. 2.3.

Zamorano et al. 2009 mostrano come vi siano differenze notevoli nella distribuzione di questi enzimi nel corpo di *Parapenaeus longirostris*, trovando le più alte concentrazioni nel carapace, nell'esoscheletro addominale e nel cefalotorace. In aggiunta gli stessi autori mostrano come la mera concentrazione di PPO non sia sufficiente a spiegare la melanosi, difatti il carapace preso singolarmente non mostra

Source	M.W. (Daltons)	pH optima	pH stability	T° optima	T° stability
White shrimp ( <i>Penaeus setiferus</i> )	30 000	7,5	6,0-7,5	45°C	25-50°C
Brown shrimp ( <i>Penaeus aztecus</i> )	210 000	6,0-6,5	-	-	20-40°C
Pink shrimp ( <i>Penaeus duorarum</i> )	40 000	8,0	6,5-9,0	40°C	20-40°C
Florida spiny lobster ( <i>Panulirus argus</i> )	97 000	6,5	6,5-8,0	35°C	30-40°C
	88 000				
	82 000				
Western Australian lobster ( <i>Panulirus cygnus</i> )	92 000	7,0	5,0-9,0	30°C	25-35°C
	87 000				
Lobster ( <i>Homarus americanus</i> )	-	6,5	6,5-7,5	30°C	15-30°C

*Tabella 2.3:* Alcuni esempi di PPO derivate da varie specie di crostacei con differenti caratteristiche chimiche (Gonçalves et al. 2016).

evidenti segni di imbrunimento in conservazione nonostante sia il segmento a maggior concentrazione di PPO. Questo avviene in quanto nei crostacei le PPO vengono sintetizzate come zimogeni (proPPO), ovvero enzimi inattivi che necessitano di una proteolisi per attivarsi. *In vivo* questa proteolisi è regolata da appositi meccanismi mentre *post mortem* viene favorita da enzimi presenti nell'emolinfa (tessuti maggiormente vascolarizzati sono più suscettibili) e dagli enzimi che fuoriescono dal tratto intestinale (Ali et al. 1994).

Secondo Gonçalves et al. 2016 sono necessari altri studi per comprendere a pieno il meccanismo di reazione di questi enzimi e le varie peculiarità di ogni isoenzima al fine di poter meglio controllare il fenomeno dell'imbrunimento.

### Le polifenolossidasi *in vivo*

*In vivo* le polifenolossidasi e la loro attività per produrre chinoni e melanine hanno un'utilità ben definita. Difatti la produzione di chinoni in prossimità dell'esoscheletro permette una miglior sclerotizzazione della cuticola, fenomeno estremamente utile all'animale soprattutto dopo ogni muta (Haard et al. 2000).

In aggiunta si è scoperto che la produzione di composti melaninici svolge anche una funzione di difesa contro le infezioni. Nello specifico questo meccanismo, comune a tutti gli artropodi, si attiva mediante il riconoscimento di specifici composti chimici derivanti da proliferazioni microbiche o fungine e permette di organizzare una risposta fisiologica consistente nella produzione di melanine ed altri composti in grado di incapsulare o inibire lo sviluppo degli organismi patogeni (Cerenius et al. 2008; Amparyup et al. 2013). La produzione di melanine viene controllata attivando gli zimogeni (proPPO) mediante una serie di reazioni (cascata delle proteasi seriniche) che ne permette una proteolisi mirata (fig.2.7a) (Cerenius et al. 2008).

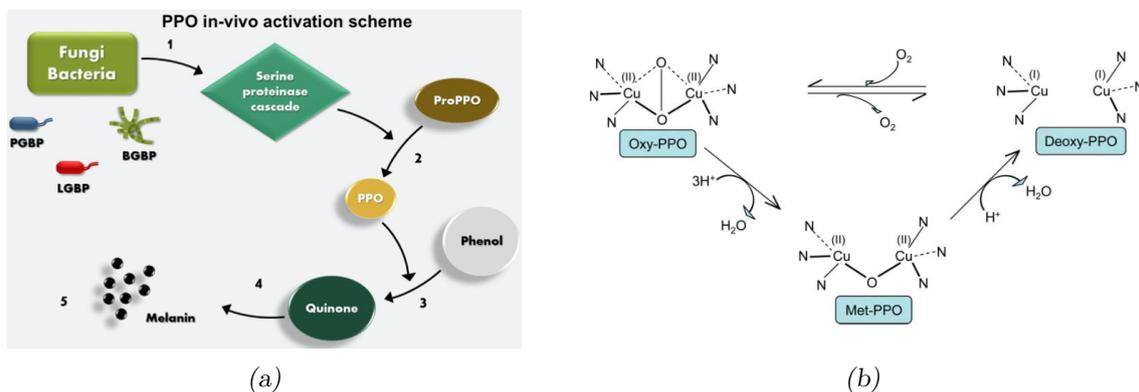


Figura 2.7: (a) Schema del processo di formazione delle melanine *in vivo* (Gonçalves et al. 2016). (b) Meccanismo di funzionamento del sito attivo delle polifenolossidasi (Nirmal, Benjakul et al. 2015).

## 2.3 Strategie di controllo della melanosì

Come visto precedentemente i crostacei sono prodotti dall'alto valore economico e pertanto si ha molto interesse nel mantenerne la qualità durante la conservazione. In questo capitolo verranno discussi i principali metodi di controllo del fenomeno della melanosì, essendo questa la principale problematica in conservazione (resta importante sapere che non è comunque l'unica). Generalmente i metodi utilizzati nel controllo di questa problematica si concentrano nell'eliminazione di almeno uno dei componenti essenziali della reazione stessa (Nirmal, Benjakul et al. 2015). A questo scopo si può agire concentrandosi sugli enzimi stessi (PPO), sui substrati (O<sub>2</sub>, tirosina e polifenoli) e sui vari prodotti intermedi della reazione (chinoni e difenoli).

Altrettanto importanti sono le tempistiche con cui si mettono in atto le varie strategie di conservazione, essendo la melanosì un fenomeno che incomincia già dai primi momenti dopo la cattura. In questo senso sono estremamente efficaci quei metodi in grado di essere messi in atto direttamente sulle imbarcazioni, bloccando (o rallentando) la reazione di imbrunimento (Mendes 2006). Lo stesso autore illustra come l'applicazione di buone pratiche di lavorazione (GMPs) direttamente in battello sia indispensabile. Fra queste risultano particolarmente importanti il controllo della temperatura (da abbattere il prima possibile), la pulizia del prodotto (fango e sporco riducono l'efficacia dei successivi trattamenti chimici) e la riduzione del tempo di sosta nelle reti (causa danni al prodotto facilitando il contatto con l'ossigeno).

In questa sezione verranno descritti i principali additivi utilizzati per il controllo

della melanosi. Rimane però importante sapere che esistono anche processi tecnologici utilizzabili al fine di mitigare la melanosi e allungare la *shelf-life*. Parliamo di trattamenti come il congelamento e l'uso di ghiaccio in varie forme (rallentano e bloccano solo momentaneamente l'imbrunimento), le HHP (agendo anche sulla carica microbica), la cottura (impattando però molto sul prodotto) e le atmosfere modificate (eliminando l'O<sub>2</sub>). Per una trattazione più ampia di questi temi si rimanda a Mendes 2006 e Haard et al. 2000. Fra i trattamenti tecnologici che si possono sfruttare, nell'ottica di minimizzare l'utilizzo di additivi alimentari, potrebbe trovare applicazione anche l'acqua attivata al plasma (PAW). Nonostante vi siano pochi studi che cercano di valutarne l'efficacia, nelle sezioni successive verranno spiegati i meccanismi di funzionamento e le possibili applicazioni di questo trattamento innovativo.

### 2.3.1 Additivi per il controllo della melanosi

Di additivi per il controllo della melanosi ne esistono molti, alcuni d'uso più comune e consolidato (esilresorcinolo e solforosa) mentre altri di più recente introduzione. Quest'ultimi nascono da una forte ricerca di composti "naturali" che permettano di avere prodotti *clean lable* o adatti anche a categorie sensibili della popolazione (ad esempio persone soggette da allergia ai solfiti). Fra questo gruppo di prodotti ricordiamo i polifenoli ottenuti da varie fonti vegetali (Nirmal, Benjakul et al. 2015) e gli olii essenziali (Patel 2015). Generalmente gli additivi contro la melanosi vengono suddivisi in categorie in base al loro meccanismo d'azione. Secondo Nirmal, Benjakul et al. (2015) i principali sono:

- **Agenti riducenti**
- **Chelanti**
- **Acidificanti**
- **Inibitori enzimatici**
- **Enzimi**
- **Complessanti**

Gli agenti riducenti sono gli additivi maggiormente utilizzati nell'industria alimentare e comprendono solfiti, cisteina, acido ascorbico e glutatione. Il loro meccanismo d'azione si basa o sulla riduzione degli o-chinoni in difenoli (incolori) o

sulla formazione di composti stabili ed incolore nati dall'unione fra gli o-chinoni e l'additivo utilizzato (Nirmal, Benjakul et al. 2015).

Per quanto riguarda i chelanti questi interagiscono con gli ioni metallici legandoli e siccome le PPO sono metalloenzimi contenenti rame, il quale partecipa attivamente alla reazione, risultano bloccate. Studi d'efficacia di questi composti si hanno per l'EDTA, per l'acido cogico e soprattutto per l'acido citrico (usato anche per l'effetto acidificante) (Haard et al. 2000).

Gli acidi organici come citrico, lattico e malico si usano spesso in combinazione con altre sostanze e sono in grado di abbassare il pH del prodotto sotto i livelli ottimali per l'attività enzimatica. Tutti gli enzimi per poter funzionare devono trovarsi nella conformazione corretta, la quale si ottiene grazie ad un complesso sistema di interazioni in cui le cariche dei gruppi R degli amminoacidi sono determinanti. L'abbassamento del pH modifica le cariche presenti in tali residui e conseguentemente modifica la struttura dell'intera proteina con ripercussioni sulla funzionalità (Gonçalves et al. 2016).

Infine, per quanto riguarda gli inibitori enzimatici il più comune è sicuramente l'esilresorcinolo. In questo caso le sostanze fungono da inibitori dell'enzima, ovvero avendo una struttura simile al substrato sono in grado di legarsi all'enzima ma in modo irreversibile e pertanto rendono l'enzima inattivo. Oltre al 4-HR altre sostanze con questa funzione sono alcuni alcoli alifatici e specifici peptidi (Haard et al. 2000).

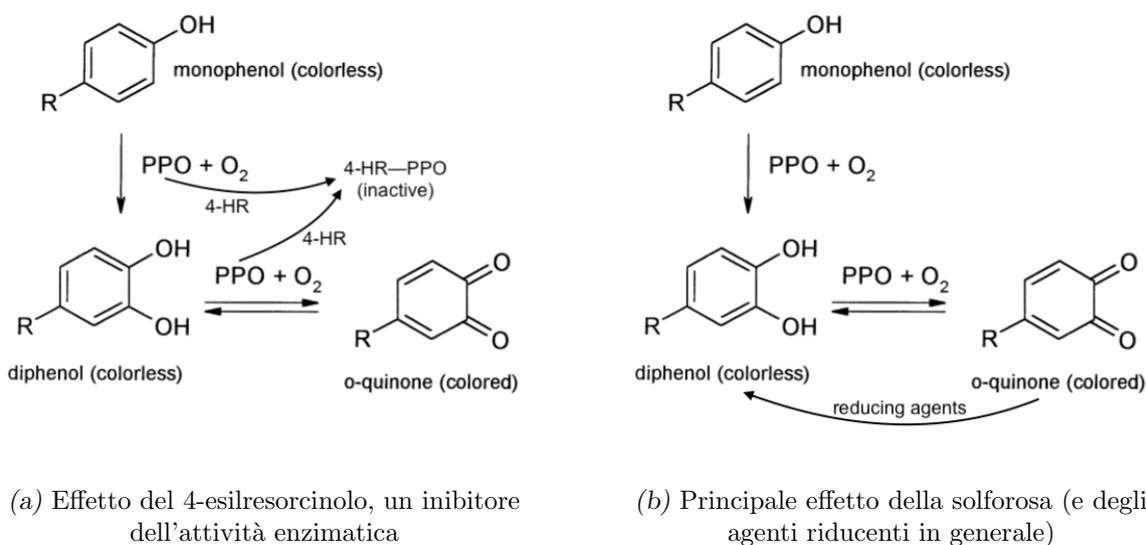


Figura 2.8: Confronto di due dei più comuni meccanismi d'inibizione della melanosina (Haard et al. 2000).

## I solfiti

I solfiti sono additivi alimentari conosciuti e molto utilizzati nell'industria alimentare grazie alle loro varie funzioni. Per il controllo della melanosì nei crostacei sono in uso da più di cinquant'anni ed ancora oggi sono l'additivo maggiormente utilizzato (Mendes 2006). Si possono utilizzare in diverse forme, dall'E220 all'E228 ad eccezione dell'E225 (calcio disolfito) anche se la forma maggiormente utilizzata è il metabisolfito di sodio (E223). Dopo l'aggiunta in sistemi acquosi si crea un equilibrio fra le varie forme dissociate in base al pH della soluzione in cui si trova. A pH 4 si ha la massima concentrazione di bisolfito ( $\text{HSO}_3^-$ ), mentre a pH 7 bisolfito e solfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) si trovano alla stessa concentrazione (Haard et al. 2000). La seguente formula illustra l'intero processo di dissociazione in acqua.



All'atto pratico i solfiti vengono utilizzati direttamente sulle imbarcazioni al momento della cattura con 2 metodi: a secco o per immersione. Il primo metodo consiste nello spolverare direttamente sul prodotto il conservante, mentre il secondo prevede l'immersione delle casse contenenti i crostacei in soluzioni precedentemente preparate. Ovviamente il primo metodo d'utilizzo è estremamente sconsigliato vista la difficoltà nell'applicare un trattamento uniforme.

L'effetto antimelanotico si deve, come per gli altri composti riducenti, all'azione di solfito e bisolfito sugli intermedi della reazione (principalmente gli o-chinoni) i quali vengono ridotti nuovamente ai difenoli di partenza (fig.2.8b), come illustrato da Nirmal, Benjakul et al. 2015. Siccome questi additivi agiscono sui prodotti della reazione hanno la capacità non solo di rallentare il fenomeno melanotico ma anche di recuperare, almeno in parte, la colorazione precedentemente persa.

Nonostante la loro elevata efficacia e il basso costo questi additivi presentano controindicazioni sia tecnologiche che salutari. Vari autori riportano come eccessive concentrazioni di questi composti non solo influenzino altri pigmenti presenti (modificando quindi la colorazione (Gonçalves et al. 2016)) ma soprattutto risultano essere pericolose per soggetti sensibili (persone allergiche o asmatiche) causando anche problemi respiratori (Mendes 2006; Haard et al. 2000).

	Cotti	Freschi - Congelati
Crostacei	50	150
Famiglie <i>Penaeidae</i> , <i>Solenoceridae</i> e <i>Aristaeidae</i> :		
Fino a 80 unità per kg	135	150
Fra 80 e 120 unità per kg	180	200
Piu di 120 unità per kg	180	300

Tabella 2.4: Limiti indicati dal Reg.UE 1333/08 per i solfiti (E220-E228). Valori in mg/Kg di parte edibile calcolati in SO<sub>2</sub>eq.

Per questo motivo l'UE ha imposto dei limiti massimi ammissibili per i crostacei trattati, e per i gamberi i limiti variano in funzione della pezzatura e dello stato in cui si trovano (tabella 2.4).

Risulta importante notare come i limiti di legge si applichino solo alla parte edibile, nonostante spesso i crostacei vengano venduti con ancora il carapace. Bonerba et al. 2013 mostrano come i residui di solforosa presenti sul carapace raggiungano concentrazioni importanti in molti prodotti congelati e sottolineano l'eventuale rischio sulla salute derivante dall'uso scorretto in cucina di questi prodotti.

#### 4-Esilresorcinolo

Il resorcinolo è un difenolo con un'efficacia nell'inibire le PPO relativamente bassa la quale, però, può essere notevolmente incrementata sostituendo l'idrogeno in posizione 4 con un gruppo lipofilo, generalmente un esile ( $-(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ ).

Questa molecola (E589) sta guadagnando importanza come sostituto dei solfiti nell'inibizione dell'imbrunimento in quanto può essere utilizzato con quantità molto minori, non interagisce con i pigmenti, ha un'azione estremamente mirata e non presenta controindicazioni per la popolazione (Haard et al. 2000).

Nello specifico Frankos et al. 1991 hanno valutato la molecola come GRAS alle concentrazioni utilizzate per il trattamento della melanosì e risulta essere un trattamento autorizzato ormai in tutto il mondo. Da un punto di vista della regolamentazione europea, il 4-esilresorcinolo (E586) può essere utilizzato esclusivamente su crostacei freschi, surgelati e congelati nella dose massima di 2 p.p.m. (valutata come residuo nella polpa).

Il motivo per cui siano spesso sufficienti basse concentrazioni di prodotto (50-100ppm) si deve al meccanismo d'azione verso le PPO. 4-HR agisce come inibitore

competitivo degli enzimi, ovvero essendo simile al substrato si lega all'enzima in maniera irreversibile rendendolo inattivo (Montero et al. 2006) (fig.2.8a). Se dal peculiare meccanismo d'azione di questo composto si possono trarre vantaggi in termini di quantità utilizzate (rispetto alla solforosa) va notato anche che, proprio per lo stesso motivo, l'uso di questo composto presenta lo svantaggio intrinseco di non poter agire sui composti già ottenuti e quindi di non poter migliorare la colorazione di prodotti già danneggiati. Gli stessi autori hanno valutato l'effetto di diverse concentrazioni (da 2,5mg a 5g) anche in combinazione con chelanti o acidificanti su *Parapenaeus longirostris*, uno dei crostacei più sensibili all'imbrunimento.

Ad oggi 4-HR sta guadagnando popolarità come alternativa ai solfiti e generalmente viene utilizzato con formulazioni in polvere addizionate con altri agenti (EDTA, acido ascorbico o acidi organici) al fine di ottimizzarne il funzionamento (Mendes 2006).

### 2.3.2 Acqua attivata al plasma (PAW)

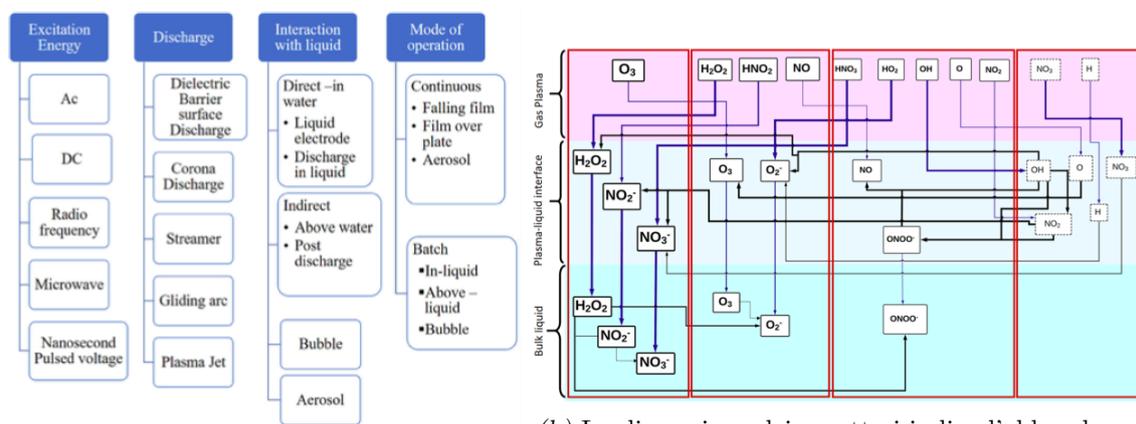
Come descritto precedentemente sono vari i trattamenti tecnologici che attualmente si impiegano per controllare l'imbrunimento nei crostacei, minimizzando o sostituendo l'utilizzo di additivi. L'uso di sistemi ad acqua marina refrigerata (RSW Systems), ad esempio, permette un ottimo controllo della temperatura ed un corretto isolamento dall'ossigeno (Mendes 2006). Fra i tanti trattamenti tecnologici applicabili potrebbe trovare un suo impiego anche l'acqua attivata al plasma.

Per acqua attivata al plasma (*Plasma Activated Water - PAW*) si intende acqua sottoposta ad un trattamento con plasma freddo che permette di arricchirla di specifiche sostanze responsabili della sua funzionalizzazione. Il trattamento con plasma porta alla formazione di specie chimiche altamente reattive fra cui ROS, RNS,  $H_2O_2$  e  $OH\cdot$ , le quali vengono generalmente sfruttate per l'inattivazione microbica ed enzimatica (Herianto et al. 2021).

Per 'attivare' l'acqua si sfrutta il plasma freddo, il quale si ottiene ionizzando un gas (generalmente aria) mediante una scarica elettrica che genera un miscuglio di particelle cariche, specie reattive e fotoni ultravioletti. Dall'interazione di questi composti con le molecole d'acqua si creano le specie reattive che poi si ritrovano nella PAW (Zhou et al. 2020).

Innumerevoli sono i parametri che influenzano la concentrazione finale delle specie reattive nell'acqua trattata e, siccome le stesse sono direttamente responsabili dell'effetto antimicrobico, risulta estremamente importante conoscere e controllare i parametri del processo (Herianto et al. 2021). La fig.2.9a elenca i principali parametri influenzanti il processo, per una descrizione dettagliata degli stessi si rimanda al lavoro di Perinban et al. (2019) mentre per l'ottimizzazione dei parametri di processo a Rathore et al. (2021) e Herianto et al. (2021) (i principali sono: gas utilizzato, pH e caratteristiche dell'acqua, durata della scarica, distanza tra la soluzione e l'elettrodo).

L'immagine 2.9b invece riporta una dettagliata descrizione delle principali specie chimiche che si formano nel plasma, nella zona d'interazione fra plasma e liquido e quelle che poi permangono nell'acqua.



(a) Classificazione dei principali sistemi per la produzione di PAW (Perinban et al. 2019).

(b) La dimensione dei caratteri indica l'abbondanza relativa di tale specie, mentre il colore delle linee indica reazioni chimiche se nero o processi di diffusione se blu (Perinban et al. 2019).

Figura 2.9

Caratteristica determinante della PAW è l'inevitabile calo di efficacia nel tempo. Questo si deve alla natura stessa delle specie chimiche che la caratterizzano ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ed è il motivo per cui si tende ad utilizzare immediatamente l'acqua prodotta. Alcuni autori hanno però riscontrato come una conservazione sotto forma di ghiaccio permette un sensibile prolungamento della sua efficacia antimicrobica che si mantiene anche per 1-2 settimane (Zhou et al. 2020).

### Applicazioni

Al momento gli utilizzi principali di questa tecnologia riguardano principalmente il controllo dello sviluppo microbico (Zhou et al. 2020). Gli studi in merito all'azione sui microrganismi sono molti e spaziano sia per i prodotti trattati che per i metodi d'applicazione (acqua per lavaggi, salamoie, mezzo per lo scongelamento o come ghiaccio di stoccaggio). Herianto et al. (2021) e Esua et al. (2021) raccolgono gli studi pubblicati in merito. Recentemente sono emersi studi che cercano di valutare l'effetto dell'acqua attivata al plasma anche sui componenti principali degli alimenti come lipidi, proteine e carboidrati. Sfortunatamente ancora non vi sono sufficienti studi per poter trarre delle conclusioni ma sembrerebbe che la PAW non influenzi significativamente i macrocomponenti degli alimenti ad eccezione dei grassi i quali generalmente sono più suscettibili all'ossidazione in alimenti trattati (Herianto et al. 2021).

### Effetti sull'imbrunimento

Ad oggi non sono presenti articoli specifici riguardanti gli effetti di PAW sulle cinetiche d'imbrunimento in prodotti alimentari. Herianto et al. (2021) fanno notare come esistano studi sull'inibizione di vari enzimi in prodotti vegetali anche se i risultati sono spesso contraddittori. Liao et al. (2018) hanno valutato gli effetti di uno stoccaggio con ghiaccio ottenuto da PAW su *Metapenaeus ensis* rispetto ad uno convenzionale ed è risultato come il valore di luminosità ( $L^*$ ) si sia mantenuto a livelli maggiori rispetto al controllo anche se non vi sono riferimenti sull'affidabilità statistica delle differenze riscontrate. Xu et al. (2016), invece, hanno studiato la *shelf-life* di funghi champignon dopo un'immersione in PAW per 5, 10 e 15 min. Dall'analisi dei parametri di colore  $L^*$ ,  $a^*$ , e  $b^*$  risulta un più ridotto imbrunimento per i campioni trattati e gli autori ipotizzano un'interazione tra ROS e l'enzima tirosinasi (PPO) anche se maggiori studi in merito risultano necessari (Xu et al. 2016).

## 2.4 Sistemi di visione computerizzata (CVS)

I sistemi di visione computerizzata sono degli strumenti tecnologici ideati allo scopo di svolgere valutazioni oggettive di specifici parametri partendo da un'immagine digitale. Sono quindi da immaginarsi come degli strumenti che mimano, nonostante alcune importanti differenze, la valutazione che può svolgere un operatore utilizzando i propri occhi e il proprio cervello (Sun 2016). La necessità di superare la valutazione umana si deve al fatto che questa sia soggettiva, costosa, laboriosa e spesso variabile. Questo unito alla crescente disponibilità di strumenti a buon mercato ha permesso un florido sviluppo di questa tecnologia in vari ambiti fra cui anche quello alimentare (Mogol et al. 2014) dove, i CVS, vengono impiegati ad esempio per valutare materie prime o prodotti finiti in tempo reale (in linea) sia in termini di colorazione che di forma e dimensione.

### 2.4.1 Strumentazione

Un CVS si compone essenzialmente di un sistema d'acquisizione dell'immagine (es. fotocamera), un sistema d'illuminazione standardizzato e un computer necessario per lo stoccaggio e l'elaborazione delle immagini (Russ 2015). Per quanto riguarda l'industria alimentare il sistema d'acquisizione più utilizzato consiste in fotocamere in grado di rilevare le lunghezze del visibile, ma esistono anche applicazioni basate sulla rilevazione di altre frazioni dello spettro luminoso (Sun 2016).

#### Sistema d'acquisizione dell'immagine

Ne esistono di vario tipo ma in generale quelli maggiormente utilizzati sono fotocamere digitali in grado di convertire lo spettro luminoso riflesso di un oggetto in un'immagine composta da più pixel, ognuno associato ad una colorazione precisa. L'informazione contenuta in un pixel varia a seconda dello spazio utilizzato per descrivere il colore e, nel caso di immagini RGB, si compone di 3 valori numerici indicanti rispettivamente le coordinate spaziali per il colore rosso, blu e verde. Oltre allo spazio RGB esistono altri modi per descrivere il colore, fra questi i più utilizzati sono lo spazio  $L^*a^*b^*$  e HSB. Per una miglior comprensione degli spazi di colore si consiglia la lettura di Ibraheem et al. (2012). Le immagini così ottenute dal sensore

sono caratterizzate da vari parametri, come la densità di pixel (risoluzione) o la tipologia, generalmente a 8, 16 o 32 bit (indice della quantità d'informazione associabile ad ogni pixel) (Russ 2015). È importante ai fini della successiva elaborazione dell'immagine anche la scelta dell'estensione, difatti formati come .jpeg o .png generalmente comprimono l'immagine causando una perdita di dati mentre formati come .tiff o .raw mantengono tutte le informazioni presenti in origine, pertanto la scelta dev'essere ponderata considerando da un lato la qualità dell'immagine e dall'altro le prestazioni del software che si possiede per l'elaborazione (Russ 2015).

### **Sistema d'illuminazione**

Il secondo componente cruciale della strumentazione è il sistema di gestione dell'illuminazione. Questo ha lo scopo di illuminare il campione e l'area circostante in maniera riproducibile e fissa sia in termini d'intensità che di spettro luminoso emesso (Sun 2016). La regolazione di tale parametro è maggiormente importante nei casi in cui si debba svolgere una valutazione del colore, in quanto il colore non è una caratteristica propria di un oggetto come può essere la forma ma, è il risultato dell'interazione fra lo spettro luminoso che lo colpisce e l'oggetto stesso (sia in termini di composizione chimica che di struttura). Pertanto, tre sono le caratteristiche indispensabili su cui occorre lavorare per installare un buon sistema d'illuminazione: il tipo di luce usata (quindi l'illuminante), la geometria d'illuminazione e i materiali che circondano l'area fotografata (Sun 2016).

L'illuminante è la radiazione prodotta da una fonte luminosa e si caratterizza da uno spettro indicante per ogni lunghezza d'onda la quantità di energia emessa. I tre illuminanti maggiormente utilizzati sono la luce solare diretta, le lampade ad incandescenza e le lampade fluorescenti (2.10a). La scelta dell'illuminante più appropriato si basa sia sulla tipologia di prodotto da studiare, sia sullo scopo dello studio (Sun 2016).

Anche il modo con cui si dispongono le sorgenti luminose gioca un ruolo importante nella qualità delle immagini che si ottengono. In questo caso non si deve considerare solo con quale angolo la radiazione luminosa emessa colpisce la superficie del campione ma serve conoscere anche il tipo di superficie e geometria del campione stesso. Ad esempio superfici lucide e riflettenti, come possono essere le cuticole

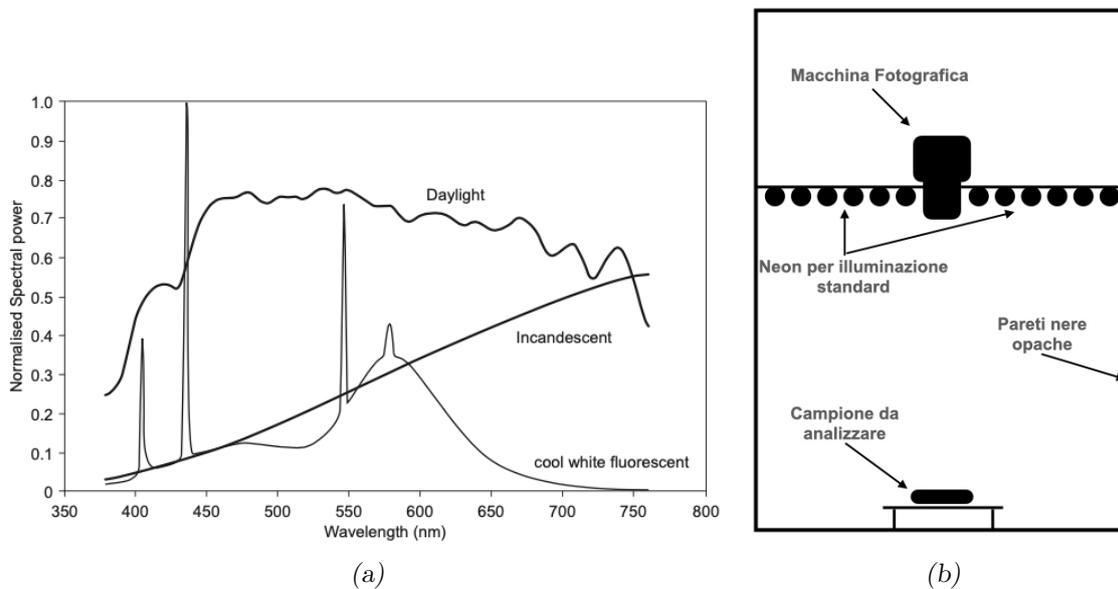


Figura 2.10: l'immagine (a) mostragli spettri degli illuminanti più comuni (Sun 2016), mentre l'immagine (b) riporta lo schema del sistema CVS presente nei laboratori dell'Università di Bologna.

esterne di alcuni frutti, fanno sì che la luce venga riflessa con lo stesso angolo d'incidenza e pertanto portano alla saturazione del sensore che restituirà pixel bianchi in quella determinata area (fenomeno detto *glossy*). Altre problematiche possono derivare dalla forma dell'oggetto che potrebbe creare zone d'ombra dove l'immagine risulterebbe artificialmente più scura e pertanto in questi casi si deve studiare un'illuminazione più diffusa. In genere i due sistemi di disposizione dell'illuminazione maggiormente utilizzati sono la disposizione ad anello o diffusa. Il primo vede le sorgenti luminose poste attorno alla fotocamera (2.10b) mentre il secondo posiziona le fonti luminose in modo che non illuminino direttamente il campione ma che la luce provenga di riflesso dalle superfici della camera (Sun 2016).

## 2.4.2 Elaborazione delle immagini

Una volta ottenute le immagini con le caratteristiche consone (in termini di qualità e standardizzazione) si può procedere all'elaborazione delle stesse al fine di estrarne le informazioni desiderate. Secondo Sun (2016) generalmente le immagini vengono elaborate per due scopi principali: misurare un oggetto o classificarlo. Nel primo caso parliamo di valutazioni in termini di dimensioni, forma, colorazione o texture, mentre con la classificazione s'intende la capacità di riconoscere un oggetto

(sfruttando le reti neurali o altri tipi d'intelligenza artificiale). Questi due scopi non sono mutualmente esclusivi, anzi generalmente la valutazione di un qualche parametro di un oggetto è indispensabile alla sua successiva classificazione. In ogni caso però entrambi gli scopi partono da un processo comune di pre-elaborazione e di segmentazione dell'immagine dallo sfondo al fine di facilitare la successiva elaborazione (Russ 2015).

### **Operazioni di pre-elaborazione**

Questa fase consiste essenzialmente nel ridurre le imperfezioni di un'immagine come ad esempio, immagini con ridotto contrasto oppure con un elevato rumore di fondo (Russ 2015). Sun (2016) fa notare anche come una buona fase di pre-elaborazione può essere utilizzata come soluzione economica per ottenere immagini informative piuttosto che agire sulla più costosa e laboriosa parte *hardware* (come uso di fotocamere a maggior risoluzione (Per una descrizione maggiormente dettagliata si consiglia la lettura del capitolo 2 di Sun (2016)). Durante le fasi acquisizione dell'immagine vi sono dei disturbi inevitabili che portano alla creazione del cosiddetto rumore di fondo, ovvero quella parte d'informazione contenuta nell'immagine che non deriva da essa. Disturbi di questo tipo si devono sia a meccanismi intrinseci al sistema, come la fase di digitalizzazione dell'immagine, ma possono dipendere anche da vibrazioni o condizioni sub-ottimali al momento dell'acquisizione (Russ 2015). Questo fenomeno viene efficacemente ridotto mediante l'utilizzo di appositi filtri i quali essenzialmente raggruppano più pixel adiacenti elaborandoli in vari modi. I filtri più semplici svolgono operazioni come eseguire la media o la mediana di un gruppo di pixel delle dimensioni scelte dall'operatore mentre altri si basano su operazioni più complesse come il filtro gaussiana (Sun 2016). La scelta di uno o dell'altro filtro da utilizzare va necessariamente svolta caso per caso considerando gli obiettivi della successiva elaborazione e le caratteristiche proprie dell'immagine di partenza.

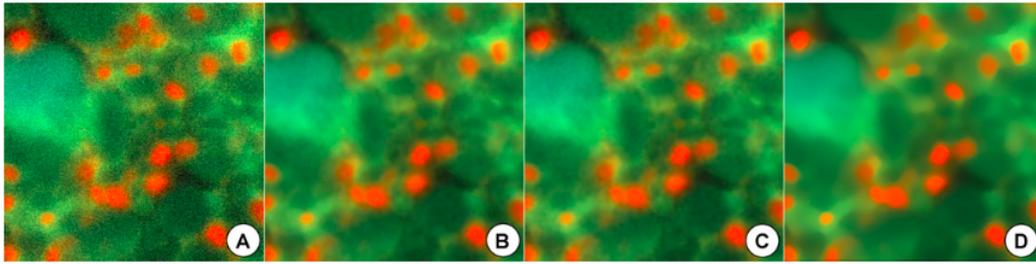


Figura 2.11: Confronto di differenti filtri sull'immagine originale (A). I filtri mostrati sono, in ordine, filtro mediana, anisotropo e a media non locale (Russ 2015).

Un'altra comune necessità durante la pre-elaborazione delle immagini è l'aumento del contrasto. Con questo termine si intende l'intervallo entro cui variano i valori d'intensità di ogni pixel, al ridursi dell'intervallo aumenta la difficoltà nel distinguere aree dell'immagine composte da pixel d'intensità specifica. Un chiaro esempio è dato dall'immagine 2.12a dove (A) e (B) rappresentano la stessa immagine ma con due differenti contrasti. Nella prima tutti i pixel hanno un range d'intensità che varia fra 100 e 109 mentre nella seconda lo stesso intervallo (0-9) si è trasformato in un intervallo che va da 0 a 200 (Sun 2016). Esistono differenti algoritmi per il controllo e la regolazione del contrasto, differenziabili principalmente in algoritmi lineari o non. Le due operazioni più comuni generalmente svolte sono scalare l'istogramma di un'immagine o equalizzarlo (Russ 2015).

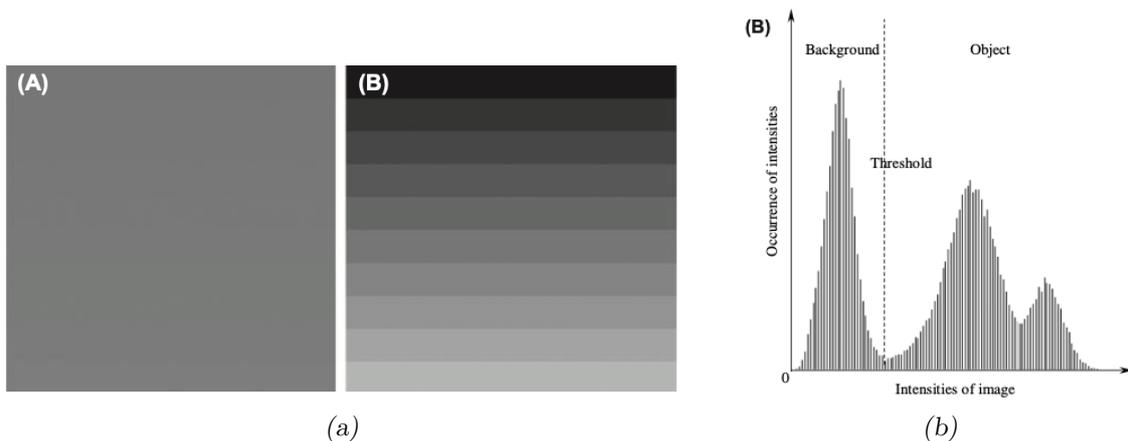


Figura 2.12: (a): Esempio delle potenzialità del controllo del contrasto in un'immagine. (b): Segmentazione dell'immagine mediante la selezione di un valore soglia sull'istogramma. (Sun 2016).

### Segmentazione delle immagini

Tra le fasi di pre-elaborazione, la segmentazione delle immagini viene spesso utilizzata per la selezione di specifiche aree di interesse (oggetti), e per separare gli stessi dal resto (sfondo). Il modo più semplice per operare in questo senso è la segmentazione a soglia (o *threshold segmentation* in inglese), consistente nel dividere in due aree l'immagine (oggetto e sfondo) sulla base di un valore soglia d'intensità scelto dall'operatore (fig.2.12b). Questa tipologia di segmentazione è la più applicata nell'industria alimentare, soprattutto nei casi d'applicazione in linea in quanto permette di lavorare solo sull'istogramma dell'immagine e quindi rende le operazioni da svolgere estremamente rapide anche con poca potenza di calcolo (Sun 2016). Infine oltre alla segmentazione basata sul valore soglia esistono altri processi per scomporre le immagini in regioni specifiche. Questi hanno il vantaggio di poter formare più di due sole regioni ma al contempo risultano essere processi maggiormente complessi e spesso difficili da implementare in linea (Sun 2016).

#### 2.4.3 L'utilizzo di CSV per la valutazione della melanosi

Data l'abbondanza di letteratura in merito all'applicazione dei sistemi di visione computerizzata nel settore alimentare, sia a livello di ricerca scientifica che di applicazione industriale, in questa sezione verranno trattati solo studi che valutano le modifiche di colore durante la conservazione di diverse specie di crostacei.

Sfortunatamente, per quanto riguarda le specie di crostacei trattate in questo elaborato (mazzancolle e gamberi rosa) la maggior parte della letteratura presente utilizza come metodo di valutazione della melanosi un'analisi sensoriale visiva basata su apposite scale discrete (con range da 1-4 o da 1-10 generalmente), mentre i pochi che cercano di utilizzare una valutazione oggettiva utilizzano analisi colorimetriche svolte sul carapace polverizzato o carne cotta tritata (Varlik et al. 2014, López-Caballero et al. 2007, Huidobro et al. 2002).

Martinez-Alvarez et al. (2020) hanno studiato i valori  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  ottenuti con un colorimetro dopo polverizzazione del carapace. Nello studio viene mostrato come, durante la conservazione, i campioni trattati con solfiti o 4-HR risultino possedere un valore di  $L^*$  significativamente maggiore rispetto al campione non trattato, differenza attribuibile al maggior sviluppo di composti scuri dati dall'ossidazione. Similmente,

anche il parametro  $a^*$  risultava avere una tendenza a ridursi anche se, nei campioni trattati con varie concentrazioni di 4-HR, si riscontrava un aumento del valore subito dopo il trattamento e nelle prime fasi di conservazione.

Allargando invece lo sguardo alle applicazioni su altre specie di crostacei si riesce a trovare qualche utilizzo dei CVS in questo campo.

Kimbuathong et al. (2020) e Loubes et al. (2012) hanno valutato la melanosi rapportando l'area imbrunita (in pixel) sull'area totale. Sfortunatamente nessuno dei due articoli offre informazioni dettagliate sul procedimento utilizzato per identificare l'area considerata imbrunita oppure le azioni svolte in fase di pre-elaborazione e segmentazione delle immagini. Ad ogni modo secondo Kimbuathong et al. (2020) l'aumento della percentuale di area imbrunita durante la conservazione si correlava bene con l'aumento della carica microbica totale (*total viable counts* - TVC). Infatti, parte del fenomeno della melanosi si deve all'attivazione delle pro-PPO a seguito dello sviluppo microbico (Gonçalves et al. 2016).

Un lavoro più completo e dettagliato, che spiega con quale criterio si sia scelta un'area imbrunita piuttosto che un'altra è quello di Diego A Luzuriaga et al. (1997), il quale lavorando su gamberi bianchi ha definito quali colori fossero indice di melanosi secondo panelisti esperti. Da questo lavoro emerge come non solo la colorazione nera sia indice di melanosi ma anche colorazioni più o meno scure debbano essere incluse. Nello specifico lo spazio di colore RGB è stato suddiviso in 64 colori (raggruppando i 256 valori di ogni asse in 4 gruppi) e, dei risultanti colori, 9 si sono indicati come potenziali rappresentanti delle aree melanotiche dopo l'esame visivo. Da una successiva analisi svolta comparando il punteggio ottenuto dall'analisi visiva (0-10) e la percentuale di area indicata come melanotica utilizzando varie combinazioni dei colori scelti si è cercato di valutare l'accuratezza del modello di analisi di immagine sviluppato. La combinazione migliore ottenuta comprendeva 6 blocchi di colore e risultava essere correlata linearmente con la valutazione dell'ispettore con un  $R^2$  di 0,68.

Lo stesso autore in un lavoro successivo (Diego Andres Luzuriaga 1999) utilizza lo stesso sistema a 64 blocchi di colore su più specie di gamberi non solo per identificare l'area corrispondente alla melanosi ma anche l'evoluzione dei parametri  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  medi per ogni gambero. Per quanto riguarda quest'ultimi lo studio mostra

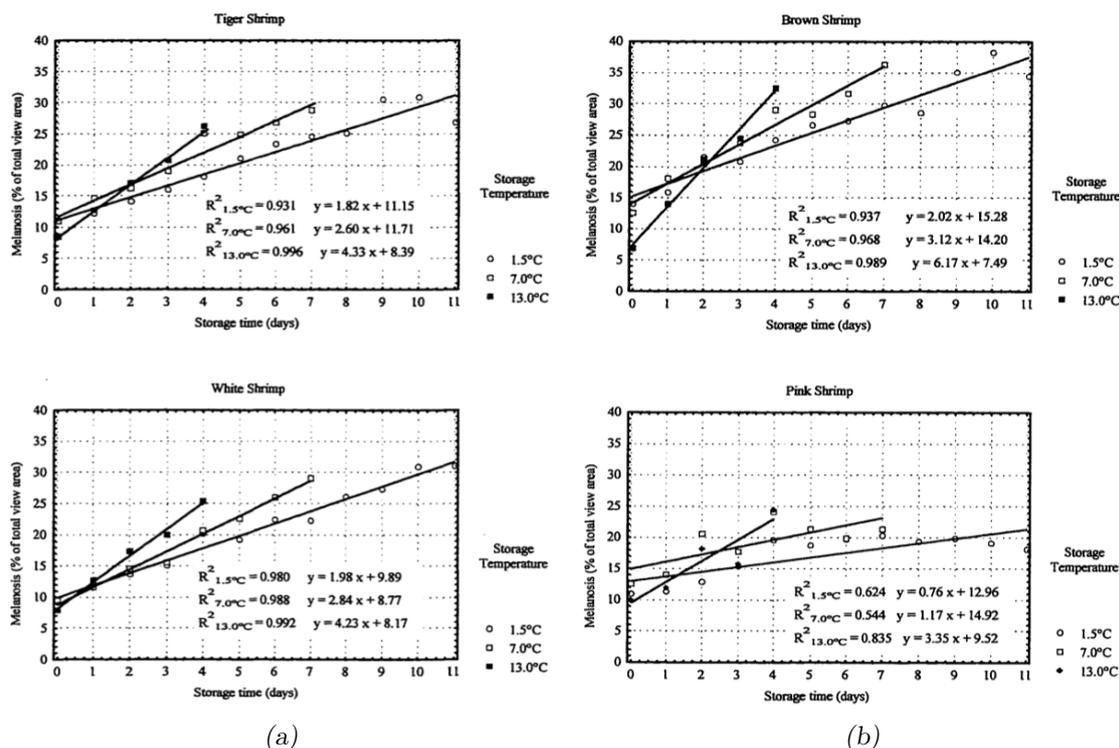


Figura 2.13: Grafici illustranti l'aumento dell'area considerata melanotica durante la conservazione per ogni diversa specie e temperatura valutata (Diego Andres Luzuriaga 1999).

come solo il parametro  $L^*$  risulti avere un andamento di costante riduzione durante la conservazione, mentre per i valori  $a^*$  e  $b^*$  le variazioni non risultavano essere particolarmente informative.

Come esempio, in fig.2.13a e 2.13b vengono riportati i risultati delle aree imbrunite per ciascuna specie oggetto di studio (Diego Andres Luzuriaga 1999). Nello specifico si nota come l'aumento dell'area imbrunita segua un andamento lineare con una pendenza che si accentua all'aumentare delle temperature di conservazione.

Rotabakk et al. (2020) si concentra sullo studio dell'evoluzione della melanosi sulla granseola artica (*Chionoecetes opilio*) utilizzando come parametri la luminosità ( $L^*$ ) e l'indice di blu dello spazio di colore RGB. Sulla stessa specie Lian et al. (2018) hanno valutato l'effetto di diversi trattamenti antimelanotici (solforosa, 4-HR) mediante l'applicazione di un sistema d'analisi d'immagine computerizzato.

Studi più recenti, infine, hanno combinato un elevato numero di parametri ottenibili con l'analisi d'immagine (come i valori medi di ogni parametro delle scale  $L^*a^*b^*$ , HUE, RGB, HSV) sfruttando reti neurali o altri approcci computazionali al fine di ottenere un modello in grado di descrivere l'evoluzione del colore dei crostacei

in conservazione (Zaki Dizaji et al. 2019, Ghasemi-Varnamkhasti et al. 2016).

# Capitolo 3

## Materiali e metodi

### 3.1 Preparazione dei campioni

In questa sezione verranno spiegate le procedure utilizzate per la preparazione dei campioni e l'esecuzione dei trattamenti. Tutte le fasi di preparazione e di successivo stoccaggio dei campioni si sono svolte presso i laboratori del CIRI agroalimentare dell'università di Bologna.

#### 3.1.1 Provenienza e stoccaggio dei campioni

I gamberi rosa e le mazzancolle fresche utilizzate per le analisi provenivano dal mercato ittico di Rimini e sono state pescate nel Mar Adriatico (zona FAO 37.2.1). Dopo l'acquisto, i prodotti sono stati conservati sotto ghiaccio prima dei successivi trattamenti, i quali sono stati effettuati a circa 12-24 ore dalla cattura.

#### 3.1.2 Trattamenti

Le soluzioni impiegate in questo studio per il controllo della melanosì in gamberi rosa e mazzancolle sono state così preparate:

- Soluzione al 3% di potassio bisolfito.
- Soluzione al 0,1% di 4-esilresorcinolo.
- Acqua distillata attivata al plasma (PAW).
- Acqua distillata, come soluzione di controllo.

L'acqua attivata al plasma (PAW) è stata precedentemente preparata sfruttando un generatore di alta tensione (ALINTEL SP300). 500 ml di acqua distillata sono stati trattati mediante una scarica elettrica da 12 kV di tensione, ad una frequenza di 5 kHz, per un tempo di trattamento totale pari ad 1 minuto. La distanza tra la punta dell'elettrodo e la superficie dell'acqua era pari a 3-4 mm. Per controllare la corretta esecuzione del trattamento si è valutato il pH pre e post scarica, il quale risultava sensibilmente ridotto dopo il trattamento (pH finale 3,5).

I crostacei oggetto di studio sono stati sottoposti ad un ciclo di impregnazione sotto vuoto per 10 min a 200 mbar immergendo 3 crostacei comprensivi di carapace in 150 ml delle 4 soluzioni precedentemente descritte. Successivamente, i campioni impregnati sono stati mantenuti in agitazione a pressione atmosferica per 20 min. I campioni ottenuti sono stati così codificati: H<sub>2</sub>O, SO<sub>2</sub>, 4HR e PAW rispettivamente per campioni impregnati con acqua distillata, soluzione di bisolfito, soluzione di esilresorcinolo e soluzione di acqua attivata al plasma. Infine il campione che non ha subito nessun trattamento è stato indicato con CTRL (controllo). Per ogni trattamento sono state eseguite 3 repliche. Dopo la sosta in agitazione i crostacei sono stati asciugati e conservati a secco in condizioni refrigerate (4°C) per 9 giorni.

## 3.2 Analisi d'immagine

Al fine di monitorare l'evoluzione della melanosi dei crostacei durante la conservazione refrigerata, i campioni sono stati fotografati ogni 24 ore, per una durata totale di 9 giorni. Per l'acquisizione delle immagini si sono utilizzati gli spazi e gli strumenti dei laboratori della facoltà di Scienze e Tecnologie Alimentari dell'Università di Bologna. L'elaborazione delle immagini digitali è stata condotta utilizzando il *software* ImageJ (NIH, USA). Per una migliore comprensione delle operazioni svolte usando tale programma si consiglia la lettura di Ferreira et al. (2012).

### 3.2.1 Acquisizione delle immagini

Le immagini sono state acquisite utilizzando una camera fotografica digitale (NIKON D7000) equipaggiata di obiettivo da 60mm, e posizionata all'interno di un sistema chiuso con illuminazione (illuminante D65) controllata e stabilizzata per

standardizzare le condizioni di scatto (fig.2.10b). Le immagini RGB (4928x264 pixel) così ottenute sono state salvate in formato JPEG e RAW per poter essere elaborate successivamente.

#### 3.2.2 Pre-elaborazione



Figura 3.1: Diagramma di flusso delle fasi di *pre-processing*.

Prima di svolgere l'analisi d'immagine vera e propria si è proceduto alla pre-elaborazione e segmentazione dell'immagine originale come schematizzato in fig.3.1. Alle immagini RGB (punto 1) è stato applicato un filtro mediana a 10px per eliminare il rumore di fondo e il disturbo dato dal *glossy* (punto 2). In seguito le immagini filtrate sono state trasformate in immagini binarie con la funzione *make binary* di ImageJ (punto 3) ottenendo la distinzione fra l'area nera con pixel di valore 0 (oggetto) e quella bianca con pixel di valore 255 (sfondo). Le maschere così ottenute sono state sottratte alle immagini RGB mediante la funzione *image calculator "OR"* (punto 4) al fine di separare l'area d'interesse dallo sfondo.

#### 3.2.3 Analisi

Dopo la fase di pre-elaborazione, si sono provati differenti metodi per individuare e quantificare delle regioni di interesse (ROI) che fossero correlate all'annerimento causato dalla melanosi. Una schematizzazione delle fasi di lavoro attuate è presentata in fig.3.2.

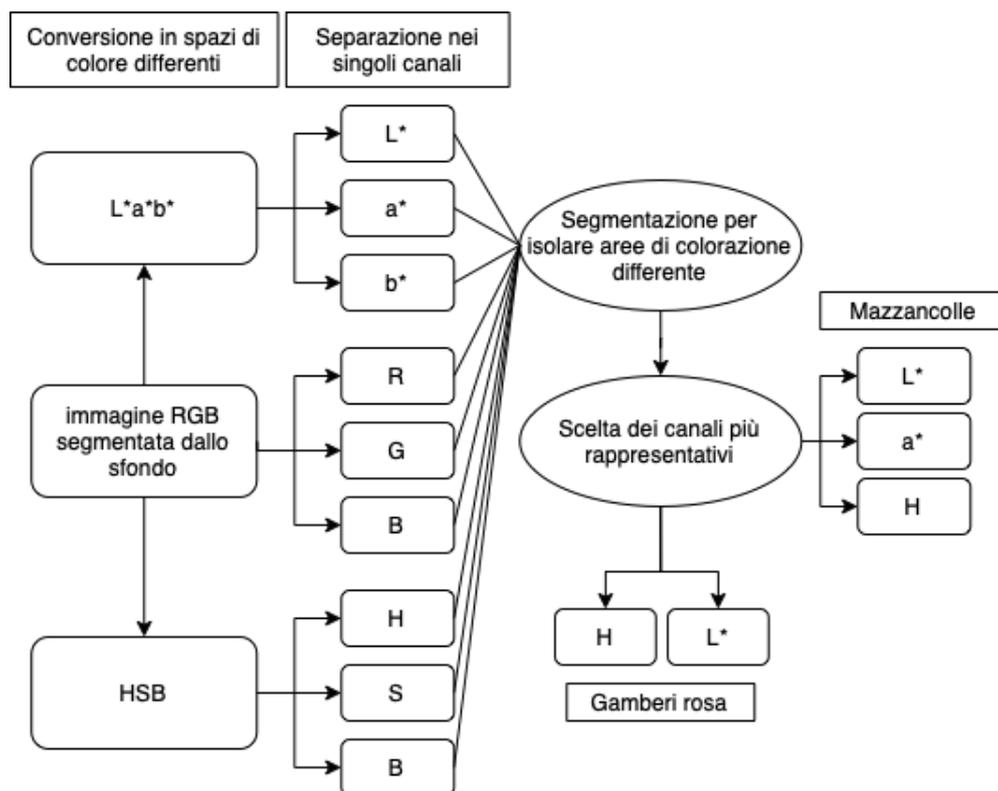


Figura 3.2: Diagramma di flusso delle fasi dell'analisi d'immagine.

Si è dapprima proceduto a convertire l'immagine RGB nello spazio di colore  $L^*a^*b^*$  e HSB mediante le funzioni di conversione di ImageJ. In seguito tutti gli spazi di colore ottenuti sono stati scomposti nelle tre matrici che li compongono e valutati separatamente. Successivamente, per ogni matrice è stato selezionato un intervallo di canali che più rappresentasse le aree correlabili alla melanosì. Gli intervalli dei canali utilizzati per ogni matrice sono riportati in tab.3.1.

	R	G	B	$L^*$	$a^*$	$b^*$	H	Brightness	Gray
Mazzancolle	0-50	0-30	0-5	0-25	110-210	0-90	10-20	0-30	0-30
Gamberi rosa	0-40	0-30	0-10	0-25	110-210	0-100	10-20	0-30	0-30

Tabella 3.1: Intervallo di canali selezionato per ogni matrice valutata

Una volta ottenute le aree d'interesse le si è misurate (in  $px^2$ ) ed infine rapportate all'area corrispondente all'intero crostaceo ottenuta in fase di pre-elaborazione, secondo l'equazione 3.1 (Kimbuathong et al. 2020).

$$Melanosì (\%) = \frac{Area\ scura\ (px^2)}{Area\ totale\ (px^2)} \cdot 100 \quad (3.1)$$

Di tutti i parametri valutati si sono poi scelti solamente quelli maggiormente rappresentativi per descrivere i due fenomeni che si sono verificati durante la conservazione, ovvero un annerimento a causa dell'avanzare della melanosi e un inaspettato arrossamento dei campioni trattati con 4-esilresorcinolo.

### 3.3 Analisi statistica

Per la valutazione delle eventuali differenze statistiche tra i campioni (PAW, 4HR, CTRL, H<sub>2</sub>O e SO<sub>2</sub>) e lungo il tempo di conservazione è stata condotta una analisi della varianza di tipo parametrico o non parametrico. La scelta fra le due tipologie di test è dipesa dalla valutazione preliminare dei dati mediante test di Levene per l'omogeneità della varianza e test di Shapiro per la normalità ( $p < 0,05$ ). In caso di significatività dei test di Levene e Shapiro, si è applicata una ANOVA parametrica e post-hoc Tukey; altrimenti si è applicata una ANOVA non parametrica Kurskal-Wallis e post-hoc Holm ( $p < 0,05$ ). Inoltre, i dati ottenuti dall'analisi di immagine sono stati confrontati mediante Analisi delle Componenti Principali (PCA). Per l'analisi statistica è stato utilizzato il software R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).



# Capitolo 4

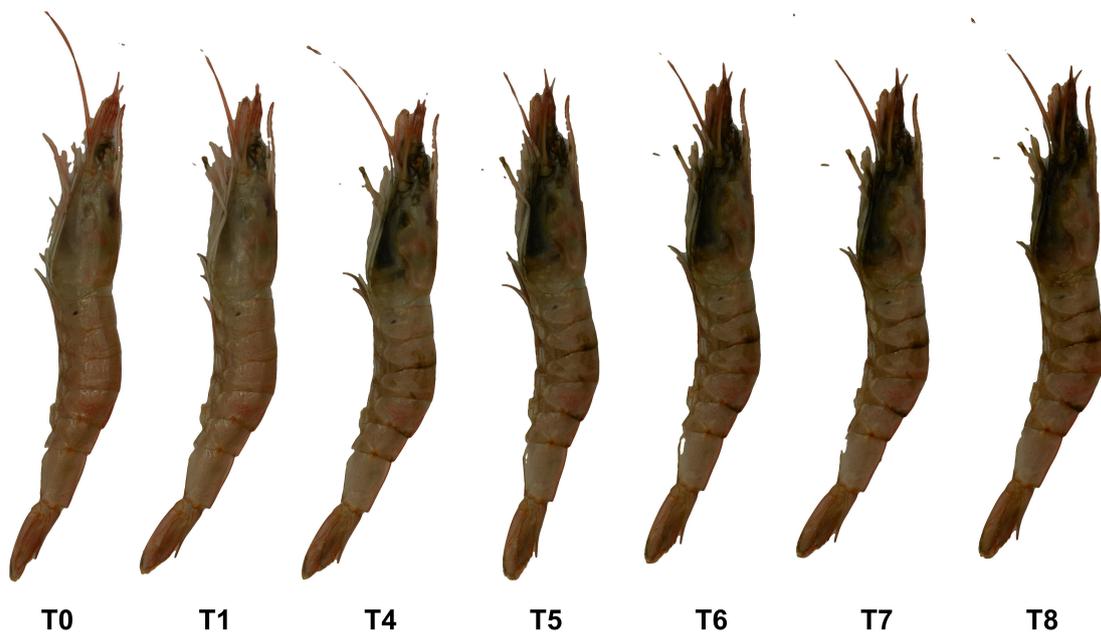
## Risultati e discussione

### 4.1 Valutazione melanosi

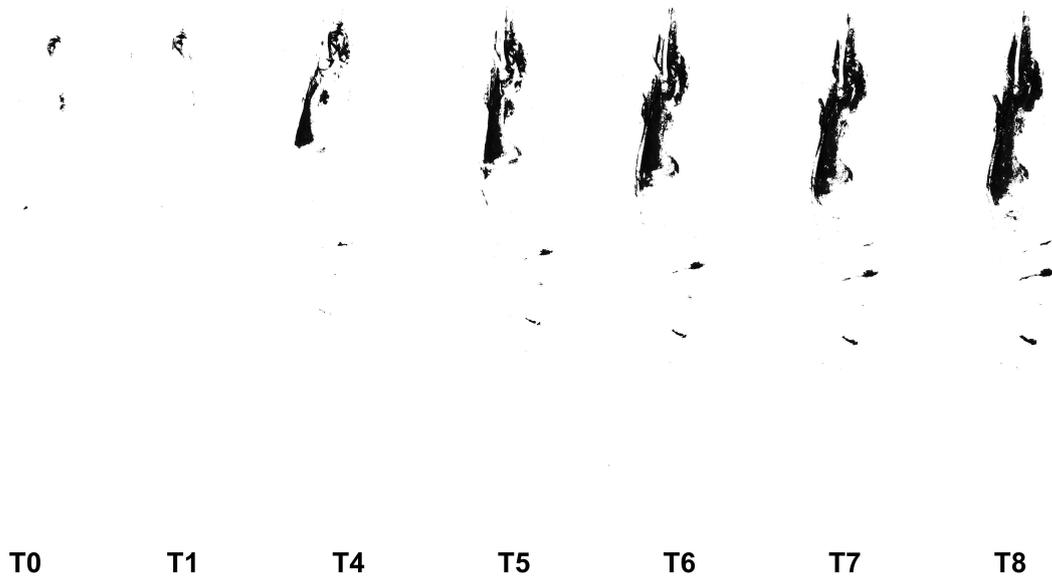
Per entrambe le specie gambero rosa e mazzancolla il canale  $L^*$  dello spazio di colore  $L^*a^*b^*$  è risultato essere il parametro che meglio descriveva l'evoluzione della melanosi lungo tutto il tempo di conservazione.

In fig.4.1 viene mostrato un esempio di selezione delle aree imbrunite sfruttando il parametro  $L^*$  su gamberi rosa. I risultati che rappresentano l'evoluzione delle aree aventi luminosità fra 0 e 25 sono illustrati in fig.4.2. Per entrambe le specie si sono scelti i canali di luminosità da 0 a 25 in quanto coincidenti, al tempo zero, alle zone naturalmente scure come gli occhi. Questa scelta si deve al disturbo causato, specialmente per le mazzancolle, dalla presenza di zone con colorazioni scure corrispondenti alle normali bande colorate presenti nel corpo dell'animale. Questo approccio, in contrasto con quello applicato da Diego A Luzuriaga et al. (1997) porta a selezionare come aree imbrunite solo zone con colorazione molto scura che si concentrano nella zona del cefalotorace e del telson (come riscontrato anche da Pilar Montero et al. (2001)). I canali 0-25 scelti corrispondono all'intervallo di valori 0-39 della scala  $L^*$  (0-100)

Per quanto riguarda le mazzancolle (fig.4.2a), dall'analisi statistica dei dati, emerge che l'imbrunimento del campione controllo non trattato e del campione impregnato con sola acqua non presenta differenze significative. Questo sembrerebbe indicare come l'applicazione del trattamento d'impregnazione sottovuoto non influenzi l'imbrunimento.



(a) Modifiche nell'aspetto di gamberi impregnati con acqua attivata al plasma in conservazione.



(b) Rispettive aree identificate come melanotiche lungo le fasi di conservazione.

Figura 4.1: Evoluzione nel tempo delle aree selezionate come imbrunite grazie al parametro  $L^*$  su gamberi rosa.

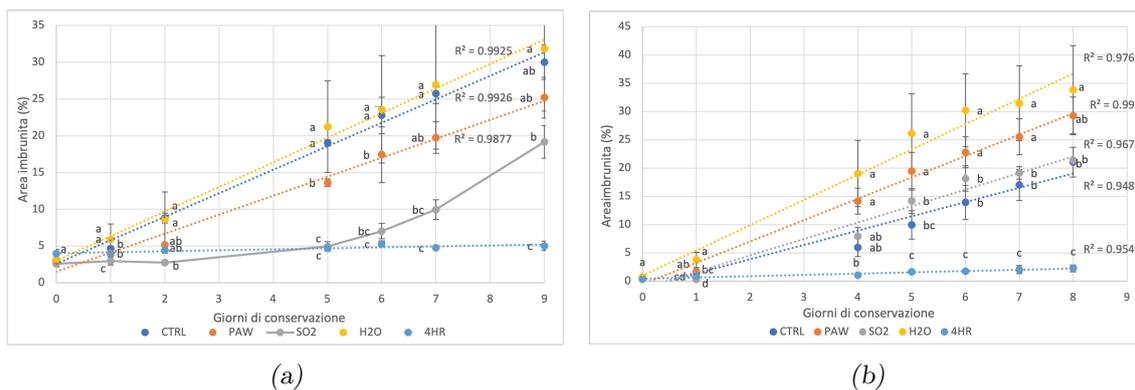


Figura 4.2: Evoluzione nel tempo delle aree imbrunite per mazzancolle (a) e gamberi (b). Le aree sono state selezionate tramite i canali 0-25 del parametro luminescenza ( $L^*$ ). Diverse lettere (a,b,c...) indicano differenze significative fra i diversi trattamenti allo stesso tempo di conservazione

Osservando i campioni trattati con acqua attivata al plasma sembra corretto ipotizzare una certa, seppur ridotta, efficacia nei confronti dell'imbrunimento soprattutto entro i primi 6 giorni di conservazione dove, dall'analisi statistica, risultano esserci differenze significative fra i campioni PAW e CTRL. Tuttavia con l'avanzare della conservazione il comportamento dei campioni trattati con PAW risulta più simile a quello del controllo e dei campioni impregnati con sola acqua. Durante la conservazione dei campioni PAW si possono identificare due fasi contraddistinte da velocità ben diverse; fino al secondo giorno di conservazione l'aumento dell'imbrunimento risulta lineare con un coeff. angolare di 1,08, mentre dal quinto giorno di conservazione assume valori di 2,83. Quest'accelerazione si deve probabilmente all'esaurimento delle specie chimiche reattive formatesi durante l'attivazione dell'acqua con plasma che non sono più un grado di ridurre i composti derivanti dall'azione delle PPO.

In ogni caso i risultati ottenuti con l'acqua attivata al plasma sono molto distanti rispetto a quelli ottenuti con i più comuni agenti conservanti. Dal grafico si può notare come, per i campioni trattati con solforosa l'imbrunimento sia stato ottimamente bloccato fino al quinto giorno di conservazione (passando solo dal  $2,60 \pm 0,40\%$  al  $4,96 \pm 0,63\%$  di area imbrunita) per poi peggiorare velocemente dal sesto giorno di conservazione. Quest'accelerazione, come visto anche per i campioni PAW, si deve al meccanismo d'azione proprio della solforosa (fig.2.8b) che non agisce impedendo all'enzima di portare avanti la reazione ma semplicemente riconverte i composti che si generano dall'ossidazione enzimatica.

Per i campioni trattati con 4-esilresorcinolo l'imbrunimento è invece stato bloccato completamente durante tutta la durata della conservazione, probabilmente in quanto il quantitativo di 4-HR utilizzato è stato sufficientemente abbondante per legarsi irreversibilmente all'enzima bloccando la reazione di imbrunimento.

Le considerazioni svolte fin'ora sull'efficacia dei vari trattamenti nelle mazzancolle non sono applicabili nel caso dei gamberi rosa (fig.4.2b), ad eccezione del comportamento dei campioni impregnati con 4-esilresorcinolo che non hanno mostrato la comparsa di aree melanotiche durante tutta la durata della conservazione refrigerata. Dall'analisi statistica non emergono differenze significative fra i campioni impregnati con acqua e quelli impregnati con PAW, probabilmente a causa della maggior sensibilità all'imbrunimento di questa specie rispetto alle mazzancolle. Anche l'effetto della solforosa risulta ridotto in quanto al quinto giorno di conservazione le aree imbrunite raggiungono il  $14,18 \pm 2,2\%$  contro il  $4,96 \pm 0,63\%$  ottenuto per le mazzancolle. Tuttavia la differenza maggiore fra le due specie si ha per i campioni non impregnati. Per le mazzancolle hanno restituito dei valori paragonabili ai campioni impregnati con acqua, mentre nei gamberi rosa i risultati sono stati decisamente migliori, con un andamento paragonabile ai campioni trattati con potassio bisolfito.

Il comportamento anomalo del controllo è risultato inizialmente complesso da spiegare ma, dopo un approfondimento sulle materie prime utilizzate è emerso che vi potrebbe essere stata un'aggiunta di solfiti direttamente in barca al momento della cattura. Nel caso questo fosse vero risulterebbe che, le procedure adottate per eseguire i trattamenti d'impregnazione, permettano un certo dilavamento dei solfiti nei campioni H<sub>2</sub>O, PAW e 4HR mentre questo dilavamento risulterebbe compensato nei campioni trattati con soluzione di potassio bisolfito, spiegando il motivo del comportamento simile fra campioni impregnati con solforosa e il controllo. Sfortunatamente non è stato possibile svolgere analisi sui residui di solforosa per valutare la veridicità di tale ipotesi.

## 4.2 Valutazione arrossamento

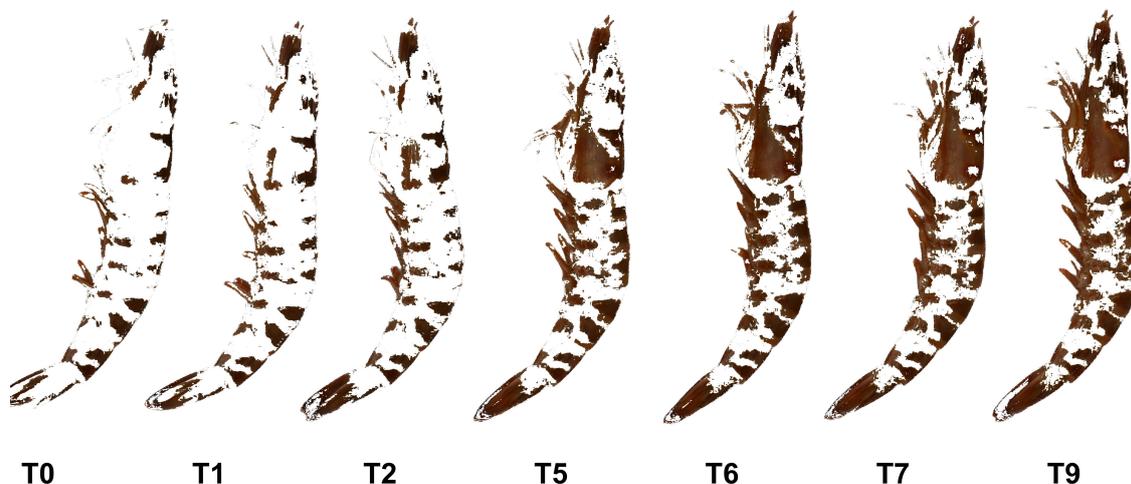


Figura 4.3: Evoluzione delle aree identificate come "arrossate" sfruttando i canali 10-20 del parametro tinta (H) per mazzancolle.

Oltre all'imbrunimento dovuto al progredire della melanosi si è riscontrato, unicamente nei campioni trattati con 4-esilresorcinolo, un certo arrossamento del carapace (fig.4.3). Questo si concentra nella zona addominale, sui pleopodi (zampe) e nel cefalotorace ed è risultato essere un fenomeno più accentuato per le mazzancolle che per i gamberi rosa. Le zone di maggior incidenza sono quindi coincidenti con quelle dove tipicamente si svilupperebbe la melanosi che, per questi campioni, risulta essere un fenomeno praticamente ininfluenza (le aree imbrunite raggiungono i valori massimi di solo  $5,04 \pm 0,65\%$  e  $2,27 \pm 0,6\%$  rispettivamente per mazzancolle e gamberi).

Vista l'insorgenza di questo fenomeno si è cercato di valutarne l'incidenza come per la melanosi. I parametri che risultano maggiormente influenzati dalla variazione di colore sono la tinta (*hue*) ottenuta dallo spazio HSB e l'indice rosso-verde ( $a^*$ ) dello spazio  $L^*a^*b^*$ . Anche Pilar Montero et al. (2001) hanno riscontrato un arrossamento sui gamberi rosa a seguito del trattamento con 4-esilresorcinolo, fenomeno giudicato sgradevole per la presenza di sfumature anomale. Sfortunatamente non sono disponibili, al momento, studi specifici in merito ai meccanismi biochimici alla base di tale fenomeno.

## 4.2.1 Tinta (H)

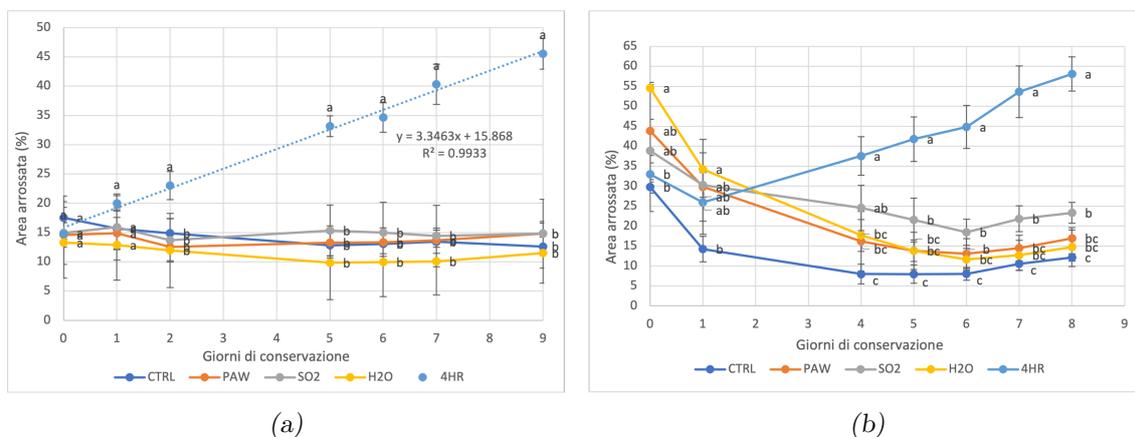


Figura 4.4: Evoluzione nel tempo delle aree arrossate per mazzancolle (a) e gamberi (b). Aree selezionate con i canali 10-20 del parametro tinta (H). Diverse lettere (a,b,c,...) indicano differenze significative fra i diversi trattamenti allo stesso tempo di conservazione.

In figura 4.4 viene riportata l'evoluzione nel tempo delle aree selezionate sfruttando i canali 10-20 del parametro H per mazzancolle e gamberi. Si sono scelti questi canali in quanto al tempo zero permettevano di selezionare, per le mazzancolle, solo le aree di colorazione rosa-rossastra tipiche delle striature del carapace e del telson, coincidenti con valori di *hue angle* fra  $11^\circ$  e  $28^\circ$  gradi (tinte rosso-arancioni).

Per le mazzancolle, i campioni trattati con 4-esilresorcinolo, sono gli unici che hanno avuto un aumento significativo del parametro H dal secondo giorno di conservazione in poi, raggiungendo aree identificate come arrossate che ricoprivano il  $45,55 \pm 2,64\%$  del corpo dell'animale al nono giorno di conservazione. Tutti i campioni non trattati con 4-esilresorcinolo hanno invece mantenuto costante la dimensione delle aree attorno a valori del 14-15%, coincidenti con le bande marroni-rossastre normalmente presenti su tutto il corpo dell'animale.

L'uso dei medesimi canali per l'analisi dei campioni di gamberi ha invece prodotto risultati differenti, dovuti alla diversa colorazione di partenza dei due crostacei. Le mazzancolle presentano una colorazione biancastra tendente al rosa-grigio solcata da bande marroni-rossastre mentre i gamberi hanno una colorazione rosa tenue più uniforme. Queste differenze fanno sì che, al tempo zero, le aree selezionate per i gamberi siano molto più ampie e variabili (dal  $29,75 \pm 6,1\%$  per CTRL al  $54,55 \pm$

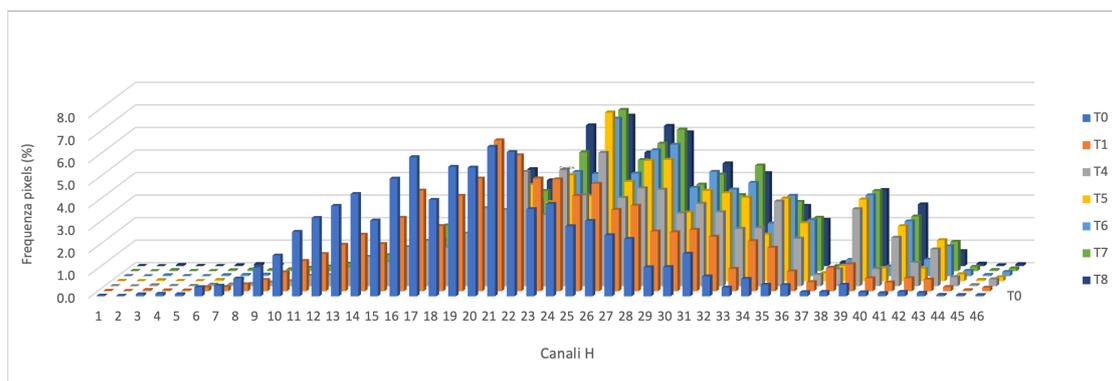


Figura 4.5: Istogrammi del parametro tinta (H) ottenuti dai campioni di gamberi impregnati con acqua, si noti l'aumento dell'incidenza percentuale dei canali 20-30 al passare dei giorni di conservazione.

0, 83% per  $H_2O$ ) in quanto i canali di tinta scelti comprendono parte della colorazione rosata classica del gambero andando quindi a coprire anche ampie aree addominali.

I campioni di gamberi rosa trattati con 4-esilresorcinolo hanno mostrato nei primi giorni di conservazione un leggero calo del parametro H, che tendeva ad aumentare nei successivi 4 giorni di *shelf-life* fino a valori del  $58,1 \pm 4,26\%$ . Lo stesso non si può dire per gli altri campioni dove si è assistito dapprima ad un vistoso calo delle aree selezionate che si è in seguito stabilizzato su valori del 10-20%. Il comportamento di quest'ultimi campioni si può attribuire ad un cambio di tonalità che è avvenuto intorno al primo giorno di conservazione che ha fatto assumere valori di tinta maggiori (20-30) a buona parte dell'addome dei crostacei (fig.4.5).

#### 4.2.2 Indice rosso-verde ( $a^*$ )

Nel grafico 4.6a viene riportata l'evoluzione nel tempo delle aree selezionate sfruttando i canali 110-210 del parametro  $a^*$  per le sole mazzancolle in quanto per i gamberi rosa non si è riusciti a spiegare il fenomeno dell'arrossamento mediante questo parametro. I canali selezionati corrispondevano all'intervallo da +13 a +50 sull'asse verde-rosso (intervallo asse da -140 a +140).

Dai dati ottenuti si nota in primis un'ampia variabilità fra le repliche, probabilmente dovuta a qualche tipo di disturbo dell'immagine di partenza. Si riesce comunque ad individuare un aumento lineare delle aree interessate per i campioni trattati con 4 esilresorcinolo, che porta ad ottenere differenze statisticamente significative rispetto agli altri campioni dal quinto giorno di conservazione in poi. In

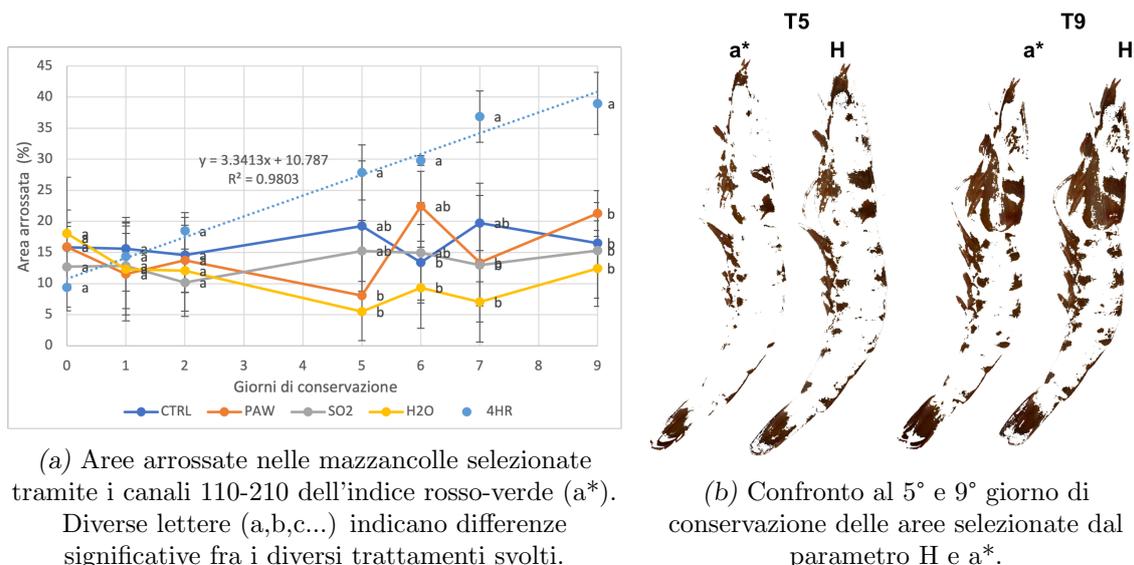


Figura 4.6

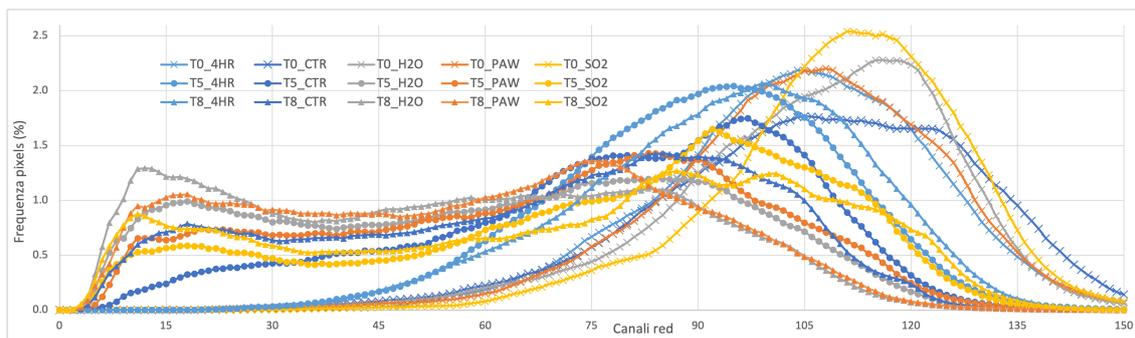
aggiunta, confrontando questi risultati con quelli ottenuti dal parametro tinta (H) (fig.4.6a e 4.4a), si nota come la pendenza delle due rette di regressione lineare sia essenzialmente coincidente (3,35 e 3,34) e porti ad ottenere una paragonabile evoluzione nel tempo di conservazione delle aree selezionate. Rapportando fra di loro le aree ottenute con i due metodi si individua una buona correlazione lineare ( $y = 0,97x - 8,3$  con  $R^2=0,94$ ), indicando come entrambe le metodiche permettano una simile e valida descrizione del fenomeno. In figura 4.6b si mostra un confronto visivo fra i risultati ottenuti sfruttando le due metodiche (parametro H e parametro  $a^*$ ).

### 4.3 Valutazione degli istogrammi

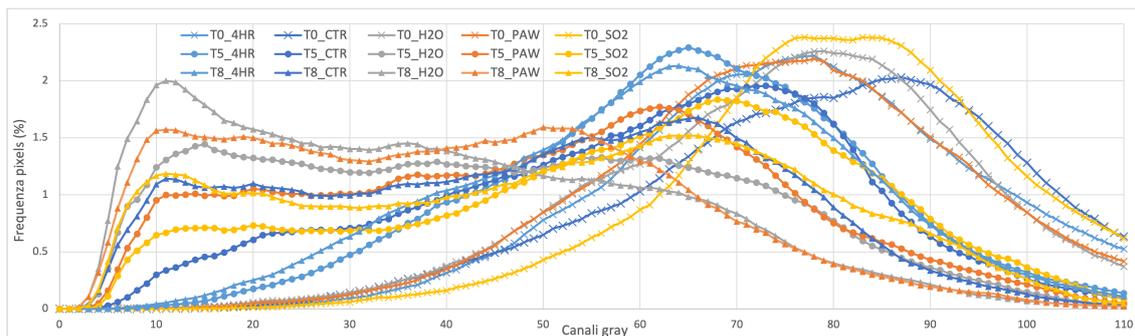
Sfruttando il programma ImageJ si sono estrapolati gli istogrammi dei parametri R, G, B, Gray,  $L^*$  e Hue. I primi 3 corrispondono agli assi dello spazio di colore RGB e si compongono di 256 canali (0-255). Il valore Gray si ottiene sempre dall'immagine RGB dopo trasformazione dei valori R, G e B di ogni pixel mediante la formula 4.1 e si esprime anch'esso in una scala da 0 a 255. Negli ultimi due casi invece si sono utilizzate immagini a 32 bit del parametro  $L^*$  e Hue per ottenere istogrammi suddivisi rispettivamente in 101 (0-100) e 360 (0-359) canali.

$$Gray = \frac{R + G + B}{3} \quad (4.1)$$

Al fine di descrivere lo spostamento delle curve (fig.4.7) tra i campioni e lungo il tempo di conservazione, per ogni spettro (frequenza di pixel % vs canali) è stata calcolata la moda, ovvero il canale avente la massima frequenza di pixel. Nella tabella 4.1 sono riportate le mode relative ai parametri luminosità ( $L^*$ ) e *hue* (H) per le mazzancolle mentre per i gamberi vengono riportati gli istogrammi del parametro *gray* e *red* (fig.4.7).



(a) Istogramma di R in cui si nota l'aumento del numero di pixel che assumono valori intorno a 15.



(b) Si noti il più marcato spostamento verso destra delle curve nei campioni H<sub>2</sub>O e PAW a seguito del maggior invecchiamento dovuto all'imbrunimento.

Figura 4.7: Istogrammi derivati dal parametro *red* (a) e *gray* (b) per i campioni di gamberi.

Gli istogrammi delle matrici Red e Gray hanno mostrato, in maniera più o meno marcata, uno spostamento verso canali più bassi, fenomeno correlabile all'assunzione di tonalità scure nel prodotto.

Di tutti i parametri su cui si sono valutate le mode si è scelto di presentare H e  $L^*$  per le mazzancolle (tab.4.1) in quanto dal primo emergono nuovamente differenze statisticamente significative fra il comportamento dei campioni trattati con 4-esilresorcinolo e il resto dei campioni, confermando quanto riscontrato con l'analisi delle aree ottenute dai parametri H e  $a^*$ . Dall'analisi statistica delle mode del parametro  $L^*$  emerge come il comportamento dei campioni trattati con PAW

non si può considerare statisticamente differente dai campioni di controllo in nessuno dei tempi valutati, mentre invece si differenziano i comportamenti di 4HR e SO<sub>2</sub>.

H	T0	T1	T2	T5	T6	T7	T9
4HR	39 ± 0 <sup>aA</sup>	37 ± 2 <sup>aA</sup>	37 ± 2 <sup>dA</sup>	33 ± 0 <sup>cB</sup>	32 ± 2 <sup>cB</sup>	30 ± 0 <sup>cC</sup>	30 ± 0 <sup>bC</sup>
PAW	36 ± 1 <sup>aA</sup>	38 ± 2 <sup>aB</sup>	42 ± 0 <sup>abB</sup>	39 ± 0 <sup>bB</sup>	39 ± 0 <sup>abB</sup>	39 ± 0 <sup>abB</sup>	39 ± 0 <sup>aC</sup>
SO <sub>2</sub>	39 ± 0 <sup>aA</sup>	39 ± 0 <sup>aA</sup>	45 ± 5 <sup>cdA</sup>	42 ± 0 <sup>bA</sup>	41 ± 2 <sup>bA</sup>	41 ± 2 <sup>bA</sup>	40 ± 2 <sup>aA</sup>
H <sub>2</sub> O	38 ± 1 <sup>aA</sup>	38 ± 2 <sup>aAB</sup>	38 ± 1 <sup>aBC</sup>	38 ± 2 <sup>aBC</sup>	38 ± 2 <sup>aBC</sup>	38 ± 2 <sup>aC</sup>	37 ± 3 <sup>aC</sup>
CTRL	37 ± 3 <sup>aA</sup>	39 ± 0 <sup>aA</sup>	40 ± 2 <sup>bcA</sup>	40 ± 2 <sup>bA</sup>	40 ± 2 <sup>abA</sup>	40 ± 2 <sup>abA</sup>	38 ± 2 <sup>aA</sup>

L*	T0	T1	T2	T5	T6	T7	T9
4HR	29 ± 1 <sup>aA</sup>	29 ± 0 <sup>aAB</sup>	28 ± 1 <sup>aB</sup>	27 ± 2 <sup>aBC</sup>	25 ± 1 <sup>aCD</sup>	25 ± 1 <sup>aD</sup>	24 ± 1 <sup>aD</sup>
PAW	29 ± 2 <sup>aA</sup>	28 ± 2 <sup>aA</sup>	27 ± 1 <sup>aA</sup>	24 ± 0 <sup>abB</sup>	21 ± 3 <sup>bcB</sup>	20 ± 4 <sup>bcBC</sup>	8 ± 9 <sup>bcC</sup>
SO <sub>2</sub>	32 ± 2 <sup>aA</sup>	28 ± 2 <sup>aAB</sup>	27 ± 4 <sup>aBC</sup>	20 ± 4 <sup>aCD</sup>	15 ± 12 <sup>abDE</sup>	13 ± 9 <sup>abEF</sup>	8 ± 8 <sup>abF</sup>
H <sub>2</sub> O	31 ± 1 <sup>aA</sup>	28 ± 1 <sup>aA</sup>	30 ± 2 <sup>aA</sup>	27 ± 2 <sup>bB</sup>	26 ± 1 <sup>cB</sup>	24 ± 2 <sup>cB</sup>	18 ± 1 <sup>bcB</sup>
CTRL	30 ± 2 <sup>aA</sup>	28 ± 1 <sup>aAB</sup>	26 ± 2 <sup>aB</sup>	19 ± 3 <sup>bC</sup>	18 ± 1 <sup>cC</sup>	14 ± 10 <sup>cC</sup>	3 ± 1 <sup>cD</sup>

*Tabella 4.1:* Valori ed evoluzione nel tempo delle mode (media ± deviazione standard) ottenute dagli istogrammi del parametro luminosità (L\*) e *Hue* per campioni di mazzancolle. Le lettere minuscole indicano differenze statistiche fra i campioni mentre le maiuscole fra i tempi.

## Analisi PCA

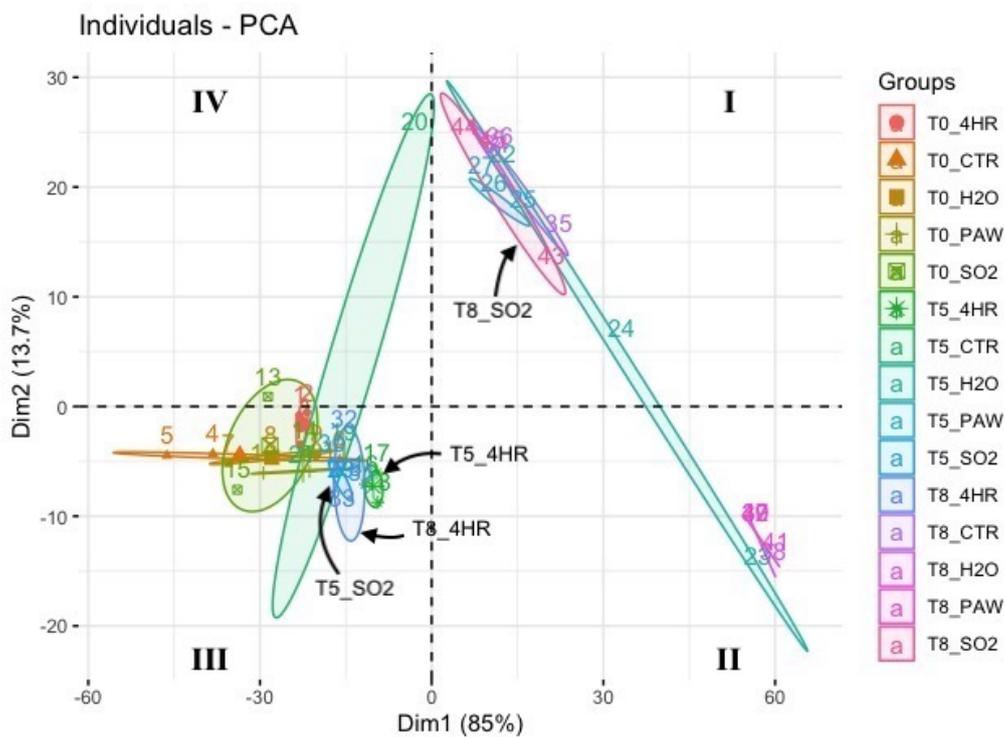
I risultati dell'analisi PCA svolta sui campioni sono riportati in fig.4.8 e tab.4.2. Si è scelto di considerare solo 3 tempi per ogni trattamento al fine di ottenere dei risultati maggiormente leggibili, scegliendo quindi i campioni al tempo zero, a 5 giorni di conservazione e al termine delle analisi (ottavo o nono giorno).

Sia per i gamberi che per le mazzancolle i campioni al tempo zero si posizionano a cavallo fra il terzo e quarto quadrante per entrambe le specie, mentre con l'avanzare della conservazione i campioni tendono a spostarsi progressivamente verso valori maggiori della componente principale 1, segno del continuo invecchiamento del prodotto (valori positivi per la componente principale 1 sono correlabili all'imbrunimento mentre valori negativi ad un prodotto più fresco). Gli unici campioni che non presentano quest'andamento sono quelli trattati con 4-esilresorcinolo che permangono nella stessa area del piano assieme ai campioni del tempo zero, in quanto

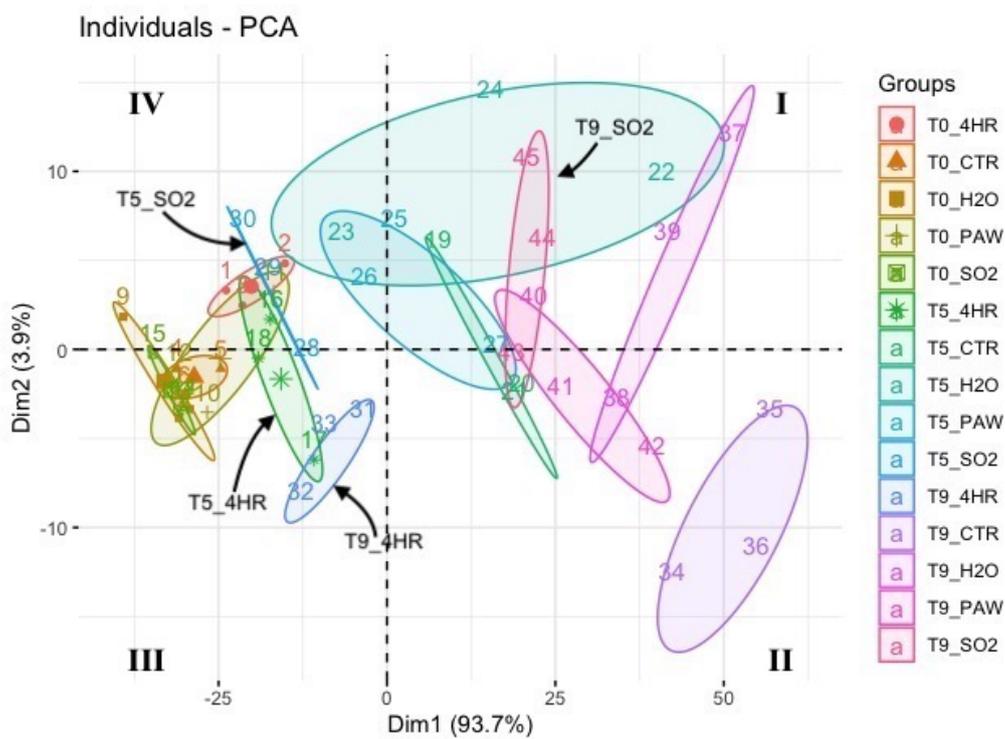
sono gli unici in cui non si è sviluppato l'imbrunimento a seguito dell'azione delle PPO. Con più difficoltà si riesce a notare l'effetto protettivo della solforosa; i campioni al 5° giorno di conservazione rientrano nell'area attribuibile a campioni non imbruniti mentre, all'ultimo giorno di conservazione, anche i campioni trattati con solforosa presentano un certo imbrunimento e pertanto ricadono nella zona assieme ai campioni imbruniti.

	Mazzancolle	Gamberi rosa
Dim 1	93,7	85,0
Dim 2	3,9	13,7
Dim 3	1,3	1,3
Dim 4	1,1	–

*Tabella 4.2:* Percentuale della varianza spiegata da ogni componente principale, ottenuta dall'analisi PCA per mazzancolle e gamberi rosa (*eigenvalues*).



(a)



(b)

Figura 4.8: Analisi PCA delle mode per gamberi rosa (a) e mazzancolle (b). Vengono evidenziati i campioni trattati con solforosa e 4-esilresorcinolo

# Capitolo 5

## Conclusioni

In generale, il trattamento a base di 4-esilresorcinolo è risultato essere il più efficace nel ritardare il progredire dell'imbrunimento riuscendo, alle concentrazioni utilizzate, a bloccare quasi completamente l'insorgenza di macchie scure durante tutta la durata delle analisi nelle due specie di crostacei considerate in questo studio. Allo stesso modo però ha alterato la normale colorazione dei crostacei, causando uno spostamento significativo verso tonalità rosa-rossastre giudicabili, secondo altri studi, come sgradite (Pilar Montero et al. 2001).

Gli effetti del trattamento a base di acqua attivata al plasma (PAW) hanno permesso di ottenere differenze significative ( $p < 0.05$ ) rispetto ai crostacei non trattati solo entro 5 giorni di conservazione per le mazzancolle, mentre per i gamberi rosa non si sono riscontrate differenze significative durante la *shelf-life*. La differente efficacia potrebbe dipendere dalla maggior sensibilità all'imbrunimento dei gamberi rosa.

Inoltre, è emerso come il trattamento d'impregnazione sottovuoto non sembri danneggiare le mazzancolle, mentre per gamberi rosa potrebbe avere un effetto negativo visto il comportamento, decisamente peggiore, dei campioni di controllo rispetto ai crostacei impregnati con acqua. Vista la ridotta conoscenza dei meccanismi con cui le specie reattive dell'acqua attivata al plasma interagiscono con i composti responsabili dell'imbrunimento (chinoni e melanine), sono necessari ulteriori studi per l'ottimizzazione e applicazione di tale trattamento allo scopo di ridurre la melanosità dei crostacei. L'aumento dell'efficacia della PAW per tempi di stoccaggio superiore ai 4 giorni potrebbe essere verificato considerando differenti modalità di applicazione

della stessa sul prodotto.

L'implementazione di un sistema di visione computerizzata (CVS) in grado di monitorare e quantificare le modifiche di colorazione del carapace dei crostacei ha prodotto buoni risultati, riuscendo a individuare i parametri in grado di descrivere sia il fenomeno dell'imbrunimento dovuto alla melanosì, sia il secondario arrossamento dei campioni trattati con 4-esilresorcinolo.

Nell'ottica di un'eventuale implementazione industriale sarà necessario confrontare i risultati ottenuti dall'analisi di immagine con la classica valutazione sensoriale effettuata da panelisti addestrati, al fine della validazione del modello presentato.

# Bibliografia

- Ali, MT, RA Gleeson, CI Wei e MR Marshall (1994). «Activation mechanisms of pro-phenoloxidase on melanosis development in Florida spiny lobster (*Panulirus argus*) cuticle». In: *Journal of food science* 59.5, pp. 1024–1030.
- Alvarez, Ricardo Zariquiey (1968). *Crustáceos decápodos ibéricos*. Vol. 32. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Patronato Juan de la Cierva.
- Amparyup, Piti, Walaiporn Charoensapsri e Anchalee Tassanakajon (2013). «Pro-phenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens». In: *Fish & Shellfish Immunology* 34.4, pp. 990–1001.
- Bonerba, Elisabetta, Edmondo Ceci, Giancarlo Bozzo, Angela Di Pinto e Giuseppina Tantillo (2013). «Analysis of the sulphite content in shrimps and prawns». In: *Italian Journal of Food Safety* 2.2, pp. 55–60.
- Cerenius, Lage, Bok Luel Lee e Kenneth Söderhäll (2008). «The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity». In: *Trends in immunology* 29.6, pp. 263–271.
- D'Agaro, Edo e Rodolfo Ballestrazzi (2012). *I Crostacei: Biologia, produzione, patologie e commercializzazione*. ARACNE editrice S.r.l. ISBN: 9788854855854.
- Davidek, Jiri, Jan Vekisek e Jan Pokorny (1999). *Chemical changes during food processing*. Developments in food science. Elsevier. Cap. 5: sensorially active compounds. ISBN: 04444988459.
- Esua, Okon Johnson, Jun-Hu Cheng e Da-Wen Sun (2021). «Functionalization of water as a nonthermal approach for ensuring safety and quality of meat and seafood products». In: *Critical reviews in food science and nutrition* 61.3, pp. 431–449.
- EUMOFA (2020). *The EU fish market 2020 edition*. Publications Office of the European Union. ISBN: 9789276153771.

- Falciai, Lucia e Roberto Minervini (1992). *Guida dei crostacei decapodi d'Europa*. franco muzzio & c. editore. ISBN: 8870215571.
- FAO (2020). *The state of world fisheries and aquaculture 2020. Sustainability in action*. FAO, Rome. ISBN: 978-92-5-132692-3. URL: <http://www.fao.org/3/ca9229en/CA9229EN.pdf>.
- FAO, Fisheries e Aquaculture (n.d.). *Fishery Statistical Collection, Dataset: Global Production Statistics (online query)*. URL: [http://www.fao.org/figis/servlet/TabSelector?tb\\_ds=Production&tb\\_mode=TABLE&tb\\_act=SELECT&tb\\_grp=COUNTRY](http://www.fao.org/figis/servlet/TabSelector?tb_ds=Production&tb_mode=TABLE&tb_act=SELECT&tb_grp=COUNTRY). visitato il 12.09.2021).
- FAO, FishFinder (n.d.). *FAO Species Fact Sheets (SIDP - Species Identification and Data Programme)*. URL: <http://www.fao.org/fishery/fishfinder/about/en>.
- FAO, Nutrition Division (2012). *Code of practice for fish and fishery products, Second edition*. Codex Alimentarius - Joint FAO/WHO Food Standards Programme. FAO/WHO. ISBN: 978-92-5-107018-5.
- Ferreira, Tiago e Wayne Rasband (2012). «ImageJ User Guide». In: *ImageJ & Fiji* 1, pp. 155–161.
- Frankos, Vasilios H, Donald F Schmitt, Laurie C Haws, Arthur J McEvily, Radha Iyengar, Sanford A Miller, Ian C Munro, Fergus M Clydesdale, Allan L Forbes e Robert M Sauer (1991). «Generally recognized as safe (GRAS) evaluation of 4-hexylresorcinol for use as a processing aid for prevention of melanosis in shrimp». In: *Regulatory toxicology and pharmacology* 14.2, pp. 202–212.
- Ghasemi-Varnamkhashi, Mahdi, Reza Goli, Michele Forina, Seyed Saeid Mohtasebi, Sahameh Shafiee e Mojtaba Naderi-Boldaji (2016). «Application of image analysis combined with computational expert approaches for shrimp freshness evaluation». In: *International Journal of Food Properties* 19.10, pp. 2202–2222.
- Gonçalves, Alex Augusto e Adriene Rosceli Menezes de Oliveira (2016). «Melanosis in crustaceans: A review». In: *LWT-Food Science and Technology* 65, pp. 791–799.
- Haard, Norman F e Benjamin K Simpson (2000). *Seafood enzymes: utilization and influence on postharvest seafood quality*. CRC Press. Cap. Polyphenoloxidase, pp. 271–315.

- Herianto, Samuel, Chih-Yao Hou, Chia-Min Lin e Hsiu-Ling Chen (2021). «Non-thermal plasma-activated water: A comprehensive review of this new tool for enhanced food safety and quality». In: *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 20.1, pp. 583–626.
- Huidobro, Almudena, María López-Caballero e Rogério Mendes (2002). «Onboard processing of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) with liquid ice: effect on quality». In: *European Food Research and Technology* 214.6, pp. 469–475.
- Ibraheem, Noor A, Mokhtar M Hasan, Rafiqul Z Khan e Pramod K Mishra (2012). «Understanding color models: a review». In: *ARPJ Journal of science and technology* 2.3, pp. 265–275.
- Kimbuathong, Netchanok, Pattarin Leelaphiwat e Nathdanai Harnkarnsujarit (2020). «Inhibition of melanosis and microbial growth in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using high CO<sub>2</sub> modified atmosphere packaging». In: *Food chemistry* 312, p. 126114.
- Lian, Federico, Ingrid Måge, Grete Lorentzen, Sten Ivar Siikavuopio, Kersti Øverbø, Birthe Vang e Diana Lindberg (2018). «Exploring the effect of inhibitors, cooking and freezing on melanosis in snow crab (*Chionoecetes opilio*) clusters». In: *Food Control* 92, pp. 255–266.
- Liao, Xinyu, Yuan Su, Donghong Liu, Shiguo Chen, Yaqin Hu, Xingqian Ye, Jun Wang e Tian Ding (2018). «Application of atmospheric cold plasma-activated water (PAW) ice for preservation of shrimps (*Metapenaeus ensis*)». In: *Food Control* 94, pp. 307–314.
- López-Caballero, María Elvira, Oscar Martínez-Alvarez, María del Carme Gómez-Guillén e Pilar Montero (2007). «Quality of thawed deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) treated with melanosis-inhibiting formulations during chilled storage». In: *International journal of food science & technology* 42.9, pp. 1029–1038.
- Loubes, María Ana, Carlos Alberto Almada e Marcela Patricia Tolaba (2012). «Kinetics of Melanosis in Shrimp: Effect of Pretreatment Using Chemical Additives». In: *Color in Food*. CRC Press, pp. 270–277.

- Luzuriaga, Diego A, Murat O Balaban e Sencer Yeralan (1997). «Analysis of visual quality attributes of white shrimp by machine vision». In: *Journal of food science* 62.1, pp. 113–118.
- Luzuriaga, Diego Andres (1999). *Application of computer vision and electronic nose technologies for quality assessment of color and odor of shrimp and salmon*. University of Florida. Cap. 4; Color and Melanosis evaluation on different species of shrimp stored at different temperatures using computer vision, pp. 80–109.
- Martinez-Alvarez, Oscar, Maria Elvira Lopez-Caballero, Pilar Montero e Maria del Carmen Gomez-Guillen (2020). «The effect of different melanosis-inhibiting blends on the quality of frozen deep-water rose shrimp (*Parapenaeus longirostris*)». In: *Food control* 109, p. 106889.
- Mendes, R (2006). «Guidebook on melanosis inhibitors and processing technology of crustaceans». In: *INIAP/IPIMAR: Project QLK1* 41.
- Mipaافت e Unioncamere (2019). *Gamberi: Analisi economica e prospettive di consumo*. URL: <https://ittico.bmti.it/CaricaPdfRegolamenti.do?doc=10>. Con il supporto tecnico di BMTI S.C.p.A.
- Mogol, Burçe Ataç e Vural Gökmen (2014). «Computer vision-based analysis of foods: A non-destructive colour measurement tool to monitor quality and safety». In: *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94.7, pp. 1259–1263.
- Montero, P, O Martínez-Álvarez, JP Zamorano, R Alique e M del C Gómez-Guillén (2006). «Melanosis inhibition and 4-hexylresorcinol residual levels in deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) following various treatments». In: *European Food Research and Technology* 223.1, pp. 16–21.
- Montero, Pilar, Adolfo Avalos e Miriam Perez-Mateos (2001). «Characterization of polyphenoloxidase of prawns (*Penaeus japonicus*). Alternatives to inhibition: additives and high-pressure treatment». In: *Food Chemistry* 75.3, pp. 317–324.
- Nirmal, Nilesh Prakash e Soottawat Benjakul (2011). «Inhibition of melanosis formation in Pacific white shrimp by the extract of lead (*Leucaena leucocephala*) seed». In: *Food chemistry* 128.2, pp. 427–432.
- Nirmal, Nilesh Prakash, Soottawat Benjakul, Mehraj Ahmad, Yasir Ali Arfat e Pharkphoom Panichayupakaranant (2015). «Undesirable enzymatic browning in

- crustaceans: Causative effects and its inhibition by phenolic compounds». In: *Critical reviews in food science and nutrition* 55.14, pp. 1992–2003.
- Patel, Seema (2015). «Plant essential oils and allied volatile fractions as multi-functional additives in meat and fish-based food products: a review». In: *Food Additives & Contaminants: Part A* 32.7, pp. 1049–1064.
- Perinban, Sellam, Valérie Orsat e Vijaya Raghavan (2019). «Nonthermal plasma-liquid interactions in food processing: A review». In: *Comprehensive reviews in food science and food safety* 18.6, pp. 1985–2008.
- Prato, Ermelinda, Michele Pastore, Isabella Parlapiano e Francesca Biandolino (2011). «Alimentazione e predazione in natura di *Melicertus kerathurus*». In: *La risorsa Crostacei nel Mediterraneo: ricerca, produzione e mercato*, pp. 86–96.
- Rathore, Vikas e Sudhir Kumar Nema (2021). «Optimization of process parameters to generate plasma activated water and study of physicochemical properties of plasma activated solutions at optimum condition». In: *Journal of Applied Physics* 129.8, p. 084901.
- Rotabakk, Bjørn Tore, Karsten Heia, Tone Mari Rode, Federico Lian e Grete Lorentzen (2020). «Developing a chromatic value for determining melanosis of high pressure processed snow crab (*Chionoecetes opilio*) clusters by digital imaging». In: *Food Control* 114, p. 107223.
- Russ, John C (2015). «Image analysis of foods». In: *Journal of food science* 80.9, E1974–E1987.
- Sun, Da-Wen (2016). *Computer vision technology for food quality evaluation*. Academic Press.
- Varlik, Candan, Kamil Bostan e Enver Baris Bingol (2014). «Effects of treatment with chitosan and antimelanogenesis agents on discoloration of chilled and frozen stored shrimp». In: *Medycyna Weterynaryjna* 70.6, pp. 357–361.
- Xu, Yingyin, Ying Tian, Ruonan Ma, Qinghong Liu e Jue Zhang (2016). «Effect of plasma activated water on the postharvest quality of button mushrooms, *Agaricus bisporus*». In: *Food chemistry* 197, pp. 436–444.
- Zaki Dizaji, Hassan, Hossein Javadikia, Samira Azizi e Leila Naderloo (2019). «Combining image processing technique and three artificial intelligence methods to re-

cognize the freshness of freshwater shrimp». In: *Journal of Food and Bioprocess Engineering* 2.2, pp. 155–162.

Zamorano, José-Pablo, Oscar Martínez-Álvarez, Pilar Montero e María del Carmen Gómez-Guillén (2009). «Characterisation and tissue distribution of polyphenol oxidase of deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*)». In: *Food Chemistry* 112.1, pp. 104–111.

Zhou, Renwu, Rusen Zhou, Peiyu Wang, Yubin Xian, Anne Mai-Prochnow, Xinpei Lu, PJ Cullen, Kostya Ken Ostrikov e Kateryna Bazaka (2020). «Plasma-activated water: generation, origin of reactive species and biological applications». In: *Journal of Physics D: Applied Physics* 53.30, p. 303001.