

Corso di Laurea Magistrale in
Biologia

Tesi di Laurea Sperimentale in Igiene

**Coating ad attività antibatterica e
antiossidante a base di eugenolo su film di
alluminio per applicazioni di packaging
alimentare**

Candidata

Claudia Ludovica Barone

A38/918

Relatore

Prof.ssa

Margherita Lavorgna

Correlatore

Dott.ssa

Elena Orlo

A. A. 2021/2022

INDICE

1	INTRODUZIONE	1
1.1	Deterioramento alimentare	1
1.2	Il packaging alimentare	2
1.2.1	Definizioni e normative	2
1.2.2	Funzioni del packaging	3
1.3	Packaging attivo	4
1.3.1	Tipologie di packaging attivo.....	5
1.3.1.1	Scavengers	5
1.3.1.1.1	Scavengers di etilene	5
1.3.1.1.2	Scavengers dell'ossigeno	6
1.3.1.1.3	Assorbitore di umidità	6
1.3.1.2	Sistemi di diffusione	8
1.3.1.2.1	Emettitore di anidride carbonica	8
1.3.1.2.2	Emettitore di etanolo	8
1.3.1.2.3	Emettitore di anidride solforosa	9
1.3.1.2.4	Rilascio di antiossidanti.....	9
1.3.1.2.5	Packaging antimicrobico	10
1.3.2	Molecole potenzialmente utilizzabili nel packaging attivo: oli essenziali.....	12
1.3.2.1	Oli essenziali e proprietà antiossidante.....	13
1.3.2.2	Oli essenziali e proprietà antimicrobica	13
1.3.2.3	Aspetti giuridici riguardanti l'uso degli oli essenziali negli alimenti	14
2	SCOPO DELLA RICERCA	15
2.1	Eugenolo	16
2.2	Caratteristiche e proprietà degli imballaggi	17
2.3	Simulanti alimentari	19

3	MATERIALI E METODI	21
3.1	Ceppi batterici utilizzati	21
3.1.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	21
3.1.2	<i>Salmonella typhimurium</i>	23
3.2	Preparazione delle colture batteriche	24
3.2.1	Esecuzione del test.....	25
3.2.2	Analisi dei dati	26
3.3	Attività antiossidante dei rivestimenti attivi	26
3.3.1	Screening dell'attività antiossidante	26
3.3.2	Saggio DPPH	26
3.3.3	Saggio ABTS.....	27
3.4	Attività antiossidante dopo test di rilascio dell'eugenolo	27
3.4.1	Determinazione dell'attività antiradicalica.....	27
3.5	Analisi dei dati	28
4	RISULTATI E DISCUSSIONE	29
4.1	Attività antimicrobica	29
4.2	Screening dell'attività antiossidante dei rivestimenti	34
4.3	Attività antiossidante dell'eugenolo rilasciato	35
5	CONCLUSIONI	40
	BIBLIOGRAFIA	III

1 INTRODUZIONE

Il cibo è essenziale per la vita, per questo motivo la sicurezza alimentare è un tema di estrema importanza per i consumatori così come per le industrie alimentari. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha stimato che 1 persona su 10 si ammala ogni anno mangiando cibo contaminato da microrganismi (OMS, 2015¹). Inoltre, componenti del cibo come carboidrati, lipidi, proteine, acidi nucleici e diverse vitamine, possono andare incontro ad ossidazione attraverso diversi meccanismi molecolari come la generazione di composti reattivi dell'ossigeno e radicali liberi (Mozuraityte, et al., 2016). I cambiamenti ossidativi possono comportare sapori sgradevoli, perdita di colore, possono alterare i valori nutrizionali e produrre composti tossici, che possono essere dannosi per la salute dei consumatori (Ahmed et al., 2016). In aggiunta, tutto ciò comporta anche spreco alimentare. Questa importante incidenza di minacce di origine alimentare porta a un urgente bisogno di alimenti più sicuri attraverso lo sviluppo di nuovi sistemi e tecnologie non tossici con proprietà antimicrobiche e antiossidanti.

1.1 Deterioramento alimentare

Il deterioramento alimentare è definito come un cambiamento nella qualità del cibo che lo rende indesiderabile e inadatto al consumo, sia da parte degli esseri umani che degli animali, a causa di indicatori di deterioramento come odore sgradevole e cambiamenti nella consistenza e nell'aspetto (Lianou et al., 2016). È un processo complesso dovuto a cause che possono essere ampiamente raggruppate in microbiologiche, chimiche o fisiche e comporta enormi perdite economiche per produttori, rivenditori e consumatori (Snyder e Worobo, 2018). I composti organici come carboidrati, proteine e lipidi negli alimenti, sono principalmente coinvolti in fenomeni di deterioramento dovuti a processi ossidativi o deterioramento da parte di microrganismi, portando alla perdita di valori nutrizionali e organolettici degli alimenti, riducendo inevitabilmente la *shelf life* degli alimenti. Temperatura di conservazione, pH, disponibilità di acqua, conservazione impropria, microflora come batteri e funghi, operazioni di lavorazione, trasporto (Wang et al., 2018)

¹ In corsivo, bibliografia citata.

influenzano il tasso di deterioramento. A parte i problemi legati alla sicurezza alimentare e perdita economica, il cibo avariato contribuisce anche allo spreco alimentare, che è un altro problema ambientale globale.

1.2 Il packaging alimentare

1.2.1 Definizioni e normative

Il packaging, detto comunemente imballaggio, involucro o confezione, è il mezzo che contiene, protegge, conserva e presenta un prodotto rendendolo disponibile nello spazio e nel tempo per l'utilizzatore finale (*Unione Nazionale Consumatori, 2019*). Il packaging è un materiale che può entrare a contatto con gli alimenti, per questo motivo, rientra nella definizione Europea di MOCA: materiali o oggetti destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari. I MOCA sono disciplinati sia da provvedimenti nazionali che europei. I materiali o gli oggetti destinati a venire a contatto, direttamente o indirettamente, con i prodotti alimentari devono essere sufficientemente inerti da escludere il trasferimento di sostanze ai prodotti alimentari in quantità tali da mettere in pericolo la salute umana o da comportare una modifica inaccettabile della composizione dei prodotti alimentari o un deterioramento delle loro caratteristiche organolettiche (*Regolamento CE N. 1935/2004*). I materiali che possono essere utilizzati per produrre packaging alimentare sono i seguenti:

- materie plastiche (D.M. 21/3/1973 e modifiche Reg. UE 10/2011)
- gomma cellulosa rigenerata (D.M 10/05/2006)
- carta e cartone (D.M. 21/03/1973 e modifiche)
- vetro (D.M 21/03/1973 e modifiche)
- acciaio inossidabile banda stagnata (D.M 10/02/1984)
- acciaio a banda cromata (D.M. 01/06/1988)
- ceramica (D.M. 01/02/2007)
- alluminio (D.M. 18/04/2007)

Secondo la normativa italiana (*Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152*) l'imballaggio, composto da materiali di qualsiasi natura, è "l'oggetto adibito a contenere determinate merci, dalle materie prime ai prodotti finiti, allo scopo di proteggerle, consentire la loro manipolazione e la loro consegna dal produttore al consumatore o all'utilizzatore e assicurare la loro presentazione". Questa normativa, inoltre, suddivide l'imballaggio in tre tipi:

- imballaggio primario: quello direttamente a contatto con l'alimento, definito "unità di vendita";
- imballaggio secondario: quello che permette il raggruppamento di un certo numero di unità di vendita, quindi ricopre l'imballaggio primario e può essere rimosso dal prodotto senza alterarne le caratteristiche;
- imballaggio terziario: ricopre l'imballaggio secondario e serve per facilitare la manipolazione ed il trasporto di un certo numero di unità di vendita oppure di imballaggi secondari per evitare i danni connessi al trasporto.

1.2.2 Funzioni del packaging

Le funzioni del packaging sono numerose, come illustrato anche nella figura 1. Tra queste possiamo trovare sicuramente la funzione di contenimento, di protezione, di trasporto e di comunicazione.



Figura 1. Funzioni del packaging (Salgado et al., 2021)

Il contenimento è sicuramente una delle funzioni più antiche che ad oggi ci può risultare scontata e molte volte è anche sottovalutata, in realtà questa funzione può essere prevedibile per gli alimenti solidi che presentano una forma propria, ma non lo è se si considerano gli alimenti liquidi o i prodotti polverosi/granulari, i quali hanno bisogno in ogni fase, dalla produzione, stoccaggio e trasporto, di un contenitore idoneo. Per quanto riguarda la funzione di protezione, il packaging preserva il prodotto dall'ambiente circostante, proteggendolo da sollecitazioni meccaniche, dalla luce, dall'umidità, dall'ossigeno e da contaminazioni chimiche o biologiche esterne, tutti fattori che possono andare a diminuire la *shelf life* dell'alimento, perché vanno

ad alterare le sue caratteristiche nutrizionali ed organolettiche. L'altra funzione è il trasporto dei prodotti da un luogo ad un altro senza rovinarli. Un'altra funzione del packaging che va citata è la comunicazione: il Regolamento (UE) n. 1169/2011 stabilisce che ci devono essere delle indicazioni obbligatorie da fornire sui prodotti alimentari preconfezionati, tra cui la denominazione dell'alimento, l'elenco degli ingredienti, qualsiasi ingrediente o coadiuvante tecnologico che provochi allergie o intolleranza, la quantità di taluni ingredienti, la quantità netta dell'alimento, il termine minimo di conservazione o la data di scadenza, le condizioni particolari di conservazione e/o di impiego, il paese di origine o il luogo di provenienza, una dichiarazione nutrizionale. La forma, il colore e l'aspetto di un packaging sono quelli che più richiamano l'attenzione del consumatore, per questo motivo per produrre gli imballaggi è richiesto anche il contributo di esperti di marketing. L'aspetto di un prodotto è molto importante ed è la prima cosa che viene notata dal consumatore, infatti è uno dei primi motivi per cui l'acquirente decide di acquistare quel prodotto. Inoltre, oggi i consumatori, in base alle loro esigenze o a determinati stili di vita, sono alla ricerca di particolari diciture come DOP, BIO, senza glutine o il luogo di origine dell'alimento.

1.3 Packaging attivo

Il regolamento CE n. 450/2009 afferma che per "materiali e oggetti attivi" si intendono materiali o oggetti destinati a prolungare la durata di conservazione o a mantenere o migliorare le condizioni degli alimenti confezionati. Essi sono progettati per incorporare componenti che rilascerebbero o assorbirebbero sostanze nel o dal cibo confezionato o nell'ambiente che circonda il cibo. Quando gli agenti attivi sono incapsulati nel materiale di imballaggio, quest'ultimo rilascia i composti attivi che migliorano la qualità e la sicurezza dei prodotti alimentari (*Regolamento della Commissione UE n. 450/2009, 2009*). Il packaging è fondamentale per la conservazione e per il mantenimento della qualità dei prodotti alimentari per l'esportazione, lo stoccaggio e il consumo finale. I cambiamenti nello stile di vita dei consumatori hanno aumentato la domanda di prodotti con una durata di conservazione prolungata che ha creato la necessità di nuove tecnologie di confezionamento. Oggi le nuove tecnologie come il packaging attivo vengono progressivamente applicate all'industria alimentare, ma in molti casi sono ancora in fase di studio e non sono state commercializzate. L'*active packaging* (AP) agisce modificando le condizioni

ambientali degli alimenti confezionati durante il periodo di conservazione, ciò è molto importante per preservare la sicurezza, le proprietà sensoriali e la qualità degli alimenti confezionati. Il monitoraggio della qualità del cibo è necessario per due aspetti principali: (i) proteggere i consumatori da conseguenze derivanti dal deterioramento del cibo; (ii) aumentare la produttività dell'industria alimentare e ridurre le perdite causate dall'alterazione del cibo. L'imballaggio attivo è definito come imballaggio in cui i componenti ausiliari sono stati deliberatamente inclusi nel o sopra il materiale di imballaggio o nello spazio tra il packaging e l'alimento per migliorare le prestazioni del sistema di imballaggio (Janjarasskul & Suppakul, 2018). I principali sistemi AP, come mostrato in figura 2, sono scavenger di ossigeno, assorbitori di etilene, assorbitori/emettitori di anidride carbonica, sistemi di rilascio/assorbimento di aromi, antiossidanti, antimicrobici, regolatori di umidità e altri.



Figura 2. Agenti attivi per l'imballaggio alimentare (Vira | Smart Packaging <https://www.virasmart.co/en/what-is-active-packaging/>)

L'umidità può modificare la qualità degli alimenti alterandone la consistenza e l'aspetto, nonché l'attività microbica. Scavengers (assorbitori di gas ed emettitori che contengono conservanti, aromi, antimicrobici, antiossidanti e così via), sono tra le più ampie tecnologie attualmente applicate nel settore AP.

1.3.1 Tipologie di packaging attivo

1.3.1.1 Scavengers

1.3.1.1.1 Scavengers di etilene

L'etilene (C₂H₄) è un ormone vegetale e svolge un ruolo regolatore chiave nella maturazione di molti frutti. L'inizio della maturazione è spesso associato a

cambiamenti di colore, alterazione del metabolismo degli zuccheri, ammorbidimento e alterazione della consistenza dei frutti, sintesi di sostanze aromatiche volatili e maggiore suscettibilità alle infezioni da agenti patogeni. L'etilene, quindi, ha effetti significativi sulle proprietà fisiologiche, sulla crescita, sulla maturazione e sulla senescenza di frutta e verdura (*Gaikwad et al., 2020*). L'aumento del tasso di produzione di C_2H_4 durante la fase di maturazione, specialmente nei raccolti confezionati, porterebbe alla senescenza. In questo caso, il gas C_2H_4 ha un impatto negativo sulla commercializzazione del prodotto. Per controllare il gas nella confezione e prolungare la durata di conservazione del prodotto, sono stati sviluppati scavengers di C_2H_4 che assorbono l'etilene prodotto dai prodotti freschi. Il doppio legame che esiste nella struttura molecolare dell'etilene gli conferisce un alto livello di reattività che offre molte opportunità alle metodologie commerciali per eliminare questo ormone (*Firouz et al., 2021*). I sistemi di rimozione dell'etilene a base di permanganato di potassio ($KMnO_4$) sono i più comunemente usati. I sistemi scavengers dell'etilene sono sviluppati sotto forma di bustina contenente le sostanze scavengers e sono posizionati nello spazio tra l'imballaggio e l'alimento, oppure possono anche essere incorporati in pellicole e contenitori per imballaggio.

1.3.1.1.2 Scavengers dell'ossigeno

La presenza di O_2 nelle confezioni degli alimenti accelera il deterioramento dei prodotti, l'ossidazione dei grassi e delle vitamine degli alimenti favorendo la crescita di microrganismi come muffe, batteri aerobi e lieviti. I suoi effetti sul cibo si manifestano con un cattivo aroma, un sapore sgradevole, cambiamenti di colore e danni ai nutrienti. Per risolvere questo problema, sono stati messi a punto gli scavenger di O_2 . Sebbene il confezionamento sottovuoto possa ridurre il livello di ossigeno nello spazio tra l'imballaggio e l'alimento fino allo 0,5–2% v/v (*Gibis & Rieblinger, 2011*), gli scavenger di ossigeno hanno una capacità di ridurre il livello di ossigeno a meno dello 0,1% v/v, il che porta a un'estensione della durata di conservazione (*Mills et al., 2006*). I principali sistemi di scavenging dell'ossigeno sono metalli a base di ferro, platino e palladio, idrocarburi insaturi, tocoferolo, acido ascorbico e scavenger a base di enzimi.

1.3.1.1.3 Assorbitore di umidità

L'umidità è di solito uno dei fattori più di disturbo nell'industria alimentare, che può avere effetti dannosi in tutte le fasi, compreso lo stoccaggio di materie prime e prodotti

nei magazzini e durante il trasporto. L'eccessivo accumulo di umidità relativa (RH) all'interno dello spazio compreso tra l'imballaggio e gli alimenti, per quanto riguarda gli alimenti confezionati con un'elevata attività dell'acqua come prodotti a base di carne, frutta e verdura fresca, comporta un'accelerazione della crescita di muffe e batteri che porta al deperimento degli alimenti, alla perdita di valori nutrizionali e fattori di qualità del cibo (Ščetar *et al.*, 2010). Una buona soluzione è l'uso di un assorbitore di umidità all'interno della confezione per controllare la presenza e il livello dell'acqua. Gli assorbitori di umidità sono generalmente prodotti sotto forma di tamponi, bustine e pellicole e interagiscono con l'umidità tramite un materiale che assorbe l'umidità per adsorbimento fisico. Gli assorbitori di umidità sotto forma di *controller* RH (come essiccanti) vengono utilizzati per assorbire l'umidità nello spazio tra l'alimento e l'imballaggio, mentre i dispositivi di rimozione dell'umidità (come tamponi e fogli) vengono utilizzati per assorbire i liquidi trasudati dai prodotti alimentari o l'acqua condensata a causa della saturazione dell'umidità nella confezione (Yildirim *et al.*, 2018). Le sostanze inorganiche sono ampiamente utilizzate nella produzione industriale di assorbitori di umidità. L'ossido di calcio (CaO) e il gel di silice sono utilizzati principalmente in bustine per mantenere l'umidità relativa a un livello molto basso nello spazio tra l'alimento e l'imballaggio. Le sostanze inorganiche, tra cui cloruro di potassio (KCl), carbonato di potassio (K₂CO₃), cloruro di calcio (CaCl₂) e bentonite, sono utilizzati come assorbitori di umidità per l'imballaggio alimentare (Yildirim *et al.*, 2018). Gli assorbitori di umidità applicati nel settore dell'imballaggio alimentare agiscono per adsorbimento fisico (come il gel di silice) e chimico (come il cloruro di calcio) e diminuiscono l'umidità relativa nello spazio tra l'alimento e l'imballaggio o raccolgono il liquido essudato dal fondo del contenitore. Anche gli assorbitori di umidità a base di sostanze organiche hanno buone potenzialità per essere applicati nei sistemi di imballaggio. Si possono usare assorbitori di umidità naturali come sorbitolo e fruttosio intrappolati in una matrice polimerica: il fruttosio come monosaccaride igroscopico assorbe l'umidità dall'ambiente circostante a circa il 55% di umidità relativa; il sorbitolo è disponibile sotto forma di polvere bianca che può essere inserita in bustine da utilizzare negli alimenti confezionati. Anche la cellulosa è studiata come assorbitore di umidità per i sistemi di imballaggio alimentare. Essa come polimero organico e materiale igroscopico è abbondantemente disponibile in natura. Questo polimero e i suoi derivati sono utilizzati nella produzione di film che assorbono l'umidità per

applicazioni di imballaggio alimentare. Gli svantaggi più importanti delle sostanze organiche sono il loro costo più elevato e la minore capacità di assorbimento dell'umidità rispetto agli assorbitori realizzati con sostanze inorganiche. Alla luce di ciò sono necessarie ulteriori ricerche per aumentare l'efficienza di assorbimento, la possibilità di commercializzazione e prolungare la stabilità degli assorbitori di umidità a base organica (*Gaikwad et al., 2019*).

1.3.1.2 Sistemi di diffusione

Il principio dei sistemi di diffusione o emettitori si basa sull'emissione dei gas desiderati nello spazio tra l'alimento e l'imballaggio per avere un impatto positivo sul cibo confezionato, ritardare i processi avversi e garantire l'estensione della durata di conservazione. Gli emettitori di gas più comunemente utilizzati si basano sul rilascio di etanolo (C_2H_6O), anidride solforosa (SO_2) e anidride carbonica (CO_2) (*Wyrwa & Barska, 2017*).

1.3.1.2.1 Emettitore di anidride carbonica

La CO_2 ha un impatto positivo sulla conservazione della freschezza iniziale degli alimenti e inibisce la formazione degli odori associati al deterioramento (*Hansen et al., 2016*). Grazie alle sue utili proprietà antimicrobiche, la CO_2 è ampiamente utilizzata nell'industria alimentare per prolungare la durata di conservazione e preservare la qualità degli alimenti. In generale, alte concentrazioni di CO_2 sarebbero preferite per carne fresca, pesce, pollame e frutta non climaterica per ridurre efficacemente la crescita di microrganismi attraverso un complesso insieme di meccanismi: ad esempio variazioni del pH citoplasmatico, inibizione degli enzimi batterici e alterazione della membrana cellulare batterica (*Vilela et al., 2018*). Il sistema di rilascio si attiva quando viene a contatto con il liquido del prodotto alimentare. Il sistema agisce secondo il *principio di Le Chatelier* che si basa sul fatto che quando il liquido viene introdotto nel sistema, il pH si abbassa e inizia la produzione di anidride carbonica. La capacità di tali sistemi può essere ottimizzata in base ai requisiti variabili del prodotto alimentare, tra cui dimensioni, volume dell'imballaggio, composizioni dei gas e proprietà fisico-chimiche.

1.3.1.2.2 Emettitore di etanolo

Gli emettitori di etanolo vengono utilizzati per rilasciare etanolo nello spazio tra l'imballaggio e gli alimenti confezionati per inibire la crescita di lieviti, batteri e

muffe. L'etanolo come sostanza antimicrobica riduce il deterioramento e prolunga la durata di conservazione di frutta e verdura durante la manipolazione, lo stoccaggio e la vendita al dettaglio. Sono disponibili alcuni sistemi commerciali di rilascio di etanolo, prodotti mediante adsorbimento diretto di etanolo su adsorbenti come la silice. In questi emettitori l'etanolo è convenzionalmente utilizzato in forma liquida avente un'elevata e incontrollata velocità di volatilizzazione. Tuttavia, sono state segnalate alcune difficoltà nell'applicazione di emettitori di etanolo come la comparsa di sapori sgradevoli. Gli emettitori di etanolo sono sottoforma di film e bustine.

1.3.1.2.3 Emettitore di anidride solforosa

Solfiti, inclusi anidride solforosa, solfito di sodio, bisolfito di sodio, metabisolfito di sodio, metabisolfito di potassio e solfito di potassio possono essere utilizzati per inibire l'imbrunimento enzimatico e non enzimatico durante la lavorazione e lo stoccaggio. Agiscono contro il deterioramento ossidativo, i funghi e i batteri responsabili della fermentazione malolattica. Il *Codex Alimentarius* (un insieme di linee guida e codici di buone pratiche, standardizzate a livello internazionale, che contribuisce al miglioramento della sicurezza, qualità e correttezza del commercio mondiale di alimenti) classifica i solfiti come uno dei principali allergeni. Le dosi di incorporazione di SO₂ negli alimenti sono strettamente regolamentate da questo codice e la concentrazione superiore a 10 mg/L è considerata un allergene, quindi la presenza di SO₂ dovrebbe essere segnalata sull'etichetta del prodotto (*Pisoschi et al., 2020*). Date le implicazioni del suo utilizzo sulla salute umana come dermatiti, orticaria, ipotensione, dolori addominali, diarrea o reazioni anafilattiche (*Pisoschi et al., 2020*), sono state pubblicate poche ricerche sull'uso dei solfiti nella conservazione e nell'estensione della vita da scaffale degli alimenti.

1.3.1.2.4 Rilascio di antiossidanti

Gli antiossidanti possono essere aggiunti nei film polimerici di imballaggio o possono essere applicati in materiali di rivestimento per limitare l'ossidazione dei componenti grassi. Gemili e collaboratori (2010) hanno sviluppato pellicole a base di acetato di cellulosa con diverse caratteristiche morfologiche per controllare il tasso di rilascio di acido L-ascorbico e L-tirosina come antiossidanti naturali. Il butilidrossianisolo (BHA) e il butilidrossitoluene (BHT) sono comuni antiossidanti sintetici utilizzati nel settore dell'*active packaging*. Tuttavia, il Dipartimento della Salute e dei Servizi Umani (HSS) degli Stati Uniti ha riportato che il BHA è cancerogeno e dovrebbe

essere sostituito da altri antiossidanti sicuri. D'altra parte, oggi i consumatori preferiscono gli alimenti privi di qualsiasi additivo sintetico a causa dei possibili effetti negativi sulla salute umana. Pertanto, gli antiossidanti naturali sarebbero una valida alternativa agli antiossidanti sintetici poiché sono biodegradabili e sono sostanze sicure (Júnior et al., 2021). Tuttavia, molti antiossidanti naturali hanno problemi per l'incorporazione nei sistemi di imballaggio a causa della loro ossidazione, bassa stabilità termica, elevata volatilità, ecc., e necessitano di ulteriori ricerche per la loro applicazione. Alcuni di questi componenti antiossidanti naturali sono sostanze aromatiche e quindi, a causa dei loro odori specifici, ne limitano l'applicazione a molti sistemi alimentari. I processi ossidativi possono verificarsi durante le fasi di produzione, conservazione, lavorazione e preparazione degli alimenti (Mozuraityte et al., 2016) e possono influenzare principalmente proteine e acidi grassi polinsaturi. Il problema principale è legato a questi ultimi in quanto l'ossidazione lipidica porta alla formazione di aldeidi tossiche, responsabili di sapori e odori alimentari sgradevoli (Ahmed et al., 2016). Metalli leggeri e di transizione, alcuni enzimi (ad esempio, lipossigenasi) e diversi composti negli alimenti (ad esempio, clorofille, riboflavina, porfirine, feofitine e bilirubina) possono catalizzare l'autossidazione dei lipidi quando reagiscono con l'ossigeno o possono promuovere la produzione di radicali liberi (Nerín, 2010).

1.3.1.2.5 Packaging antimicrobico

L'utilizzo di agenti antimicrobici negli imballaggi alimentari è vantaggioso per prevenire la crescita di batteri che possono essere trovati in un alimento confezionato o nei materiali di imballaggio e quindi aumenta la durata di conservazione dei prodotti alimentari. Gli antimicrobici incorporati nel packaging attivo sono più efficaci rispetto all'aggiunta diretta degli stessi agli alimenti. Tale efficacia è dovuta al fatto che l'*active packaging* ha la capacità di controllare il rilascio degli agenti antimicrobici dall'imballaggio ai prodotti alimentari, in modo da rallentare il loro rilascio e quindi aumentare il tempo di conservazione. Per ottenere un rilascio controllato della sostanza antimicrobica dalla confezione all'alimento, è stato proposto l'uso di film multistrato (strato interno, strato intermedio e strato esterno). In questi film, la velocità di diffusione del composto attivo è controllata dallo strato interno, mentre lo strato intermedio contiene l'agente antimicrobico e lo strato esterno impedisce la migrazione dell'antimicrobico verso l'esterno della confezione (Appendini &

Hotchkiss, 2002). Il film antimicrobico dovrebbe essere efficace contro un'ampia gamma di batteri e non causare alcun cambiamento nelle proprietà sensoriali. Muriel-Galet e collaboratori (2012) hanno sviluppato due tipi di film attivi realizzati con lauramide arginina etilestere (LAE). LAE è uno strato cationico derivato da sostanze antimicrobiche naturali (acido laurico, arginina ed etanolo), è una delle sostanze più importanti ed efficaci utilizzati negli imballaggi alimentari e ha una vasta gamma di attività antimicrobica. L'attività di questi film è stata valutata per il confezionamento di latte per neonati in presenza di batteri *Listeria* e *Salmonella spp.* a 4 °C per sei giorni. Gli autori affermano che questi film avevano più attività per controllare *Listeria* rispetto a *Salmonella spp.* Argento, zeolite d'argento, triclosan, glucosio ossidasi, biossido di cloro, natamicina e isotiocianato di allile sono ampiamente utilizzati come composti attivi nei sistemi AP antimicrobici disponibili in commercio (*Fang et al., 2017*). Oro, rame, biossido di titanio e ossido di zinco sono altri metalli e materiali contenenti metalli che presentano attività antimicrobica. Rispetto agli antimicrobici organici, le nanoparticelle a base metallica presentano una prestazione antimicrobica superiore. Zhang e coautori (2017) hanno sviluppato una carta rivestita in nanocomposito ZnO-acido polilattico (PLA) come materiale da imballaggio antimicrobico. Per avere adeguate proprietà antibatteriche, è essenziale una dispersione uniforme delle nanoparticelle all'interno del polimero ospite, mentre le nanoparticelle hanno una grande tendenza ad agglomerarsi, quindi il trattamento di deagglomerazione deve essere eseguito accuratamente. Hanno esaminato la carta rivestita su *Staphylococcus aureus* e hanno scoperto che la sua suscettibilità segue la concentrazione di nanoparticelle. Il materiale antimicrobico è stato testato anche su *Escherichia coli* e si è osservato un effetto inibitorio più forte rispetto a *Staphylococcus aureus*. Nella preparazione delle pellicole antimicrobiche, diversi fattori, come l'irradiazione, influiscono in modo significativo sulle prestazioni antimicrobiche. Oltre alle prestazioni tecniche, devono essere considerati altri fattori importanti come gli aspetti economici e le normative riguardanti l'utilizzo di nanomateriali per l'applicazione a contatto con gli alimenti. Gli oli essenziali estratti da piante come coriandolo, chiodi di garofano, rosmarino, origano, citronella, basilico e finocchio hanno un grande impatto sull'inibizione della crescita dei microrganismi. Ciò crea un buon potenziale nel loro utilizzo come additivi antimicrobici per applicazioni nell'imballaggio alimentare (*Maisanaba et al., 2017*). Félix de Andrade e collaboratori (2020) hanno aggiunto l'olio essenziale di arancia in un film di poli

butilene adipato-co-tereftalato (PBAT) e ne hanno valutato l'attività antibatterica contro *Escherichia coli*. Dai risultati hanno riscontrato una riduzione del tasso di crescita.

1.3.2 Molecole potenzialmente utilizzabili nel packaging attivo: oli essenziali

Gli oli essenziali (OE) sono metaboliti secondari sintetizzati da piante aromatiche e medicinali. In generale, gli OE corrispondono a una frazione molto piccola della composizione totale della pianta, circa meno del 5% della sostanza secca vegetale (Valderrama & Ruiz, 2018). Gli oli essenziali sono volatili, generalmente liquidi e incolori a temperatura ambiente. Sono scarsamente solubili in acqua ma altamente solubili in alcool e solventi organici. Inoltre, gli oli essenziali presentano un odore molto caratteristico e sono quindi responsabili dei profumi specifici che emettono le piante aromatiche (Valderrama & Ruiz, 2018). Chimicamente, gli OE sono una ricca miscela di numerosi componenti chimici bioattivi come terpeni, terpenoidi e fenoli. In natura, le particolari caratteristiche aromatiche e chimiche degli OE svolgono molte funzioni importanti per le piante come attrarre insetti impollinatori, proteggere le piante da alcuni stress ambientali (caldo, freddo, ecc.) e da parassiti e/o microrganismi (Dhifi et al., 2016). Questi OE bioattivi sono conosciuti in tutto il mondo per le loro comprovate attività biologiche, tra cui proprietà antimicrobiche, antimicotiche, antiossidanti, antivirali, antiparassitarie e insetticide (Dhifi et al., 2016). Queste proprietà sono utili ai fini della loro incorporazione nei packaging alimentari. Gli oli essenziali sono ampiamente utilizzati nell'industria alimentare grazie al loro naturale effetto antimicrobico, antiossidante, che aiuta a prolungare la durata di conservazione degli alimenti. L'applicazione di oli essenziali in imballaggi attivi può essere utilizzata sotto forma di film e coating. Tuttavia, il problema principale nell'utilizzo di oli essenziali per applicazioni antimicrobiche è che devono essere usati ad alte concentrazioni per ottenere un impatto significativo sui microrganismi, che potrebbe influenzare in modo negativo le proprietà organolettiche del cibo confezionato (Vilela et al., 2018). Per questo motivo dovrebbe essere determinato un intervallo sicuro di concentrazioni di oli essenziali per l'applicazione in imballaggi alimentari attivi. Inoltre, gli oli essenziali hanno una scarsa stabilità alle alte temperature a causa dell'elevata volatilità, bassa solubilità in acqua, deterioramento dovuto alla luce e all'ossigeno, nonché aroma e sapore intensi (Altay et al., 2022); tutto ciò ridurrebbe la capacità antimicrobica dei film attivi. Pertanto, la microincapsulazione è una delle

strategie efficaci utilizzate per preservare e ottimizzare il rilascio degli oli essenziali negli alimenti.

1.3.2.1 Oli essenziali e proprietà antiossidante

Il deterioramento degli alimenti è solitamente causato dal processo di ossidazione. Può influenzare i prodotti alimentari durante la loro lavorazione e conservazione e determinare cambiamenti irreversibili delle loro proprietà organolettiche e nutrizionali. L'attività antiossidante è legata alla capacità degli OE di eliminare i radicali liberi o di inibire la perossidazione lipidica (*Orlo et al., 2021*). Gli alimenti che contengono un'elevata quantità di acidi grassi sono più suscettibili all'ossidazione perché l'ossidazione dei lipidi è uno dei principali fattori che causa la deperibilità degli alimenti. L'ossidazione dei lipidi è responsabile dei cambiamenti nel colore e nella consistenza, del sapore e dell'odore rancido, della perdita di nutrienti e della produzione di composti tossici (*Wang et al., 2019*). Pertanto, è essenziale prevenire l'ossidazione dei prodotti alimentari. Poiché gli oli essenziali sono ricchi di antiossidanti, sono comunemente usati in film e coating commestibili (*Jamróz et al., 2018*). L'attività antiossidante degli oli essenziali può essere espressa dalla loro capacità di agire come scavenger di ossigeno.

1.3.2.2 Oli essenziali e proprietà antimicrobica

Gli alimenti possono deteriorarsi rapidamente a causa della presenza di microrganismi patogeni e deterioranti. La crescita di microrganismi responsabili del deterioramento può provocare l'ossidazione dei lipidi che modifica l'aspetto, la consistenza, l'odore e il gusto dell'alimento. D'altra parte, i patogeni di origine alimentare possono causare malattie. Gli oli essenziali estratti da varie parti delle piante aromatiche contengono diversi composti bioattivi che possono agire come agenti antimicrobici (*Atarés & Chiralt, 2016*). L'aggiunta di oli essenziali nella matrice del materiale di imballaggio alimentare può migliorare significativamente le sue proprietà antimicrobiche e di conseguenza aumentare la durata di conservazione dei prodotti alimentari, creando un'interazione con il polimero del film e riducendo il movimento degli stessi agenti antimicrobici negli alimenti. Questa efficacia degli OE è sia batteriostatica sia battericida (*Calo et al., 2014*). L'idrofobicità degli OE consente loro di attraversare la membrana citoplasmatica cellulare e i mitocondri e permeabilizza i loro diversi strati di acidi grassi, polisaccaridi e fosfolipidi (*Burt, 2004*). Inoltre, Rodriguez-Garcia e

collaboratori (2016) hanno spiegato che la membrana esterna che circonda la parete cellulare dei batteri Gram-negativi limita la penetrazione degli OE idrofobici attraverso lo strato lipopolisaccaridico. Questa è la ragione principale che spiega perché i batteri Gram-positivi sono in una certa misura più sensibili all'azione degli OE rispetto a quelli Gram-negativi. Siccome gli OE sono in grado di distruggere la membrana citoplasmatica alterando la conformazione degli acidi grassi, dei polisaccaridi e dei fosfolipidi aumentando la loro permeabilità, ciò implica la riduzione del potenziale di membrana, la perdita di ioni e altri contenuti cellulari, una riduzione del pool di ATP, un collasso della pompa protonica e infine una perdita di macromolecole (*Dhifi et al., 2016*). Ciascuno di questi effetti negativi è la causa principale del danneggiamento dei processi essenziali cellulari e inevitabilmente della lisi cellulare.

1.3.2.3 Aspetti giuridici riguardanti l'uso degli oli essenziali negli alimenti

Per poter essere utilizzati nei e sui prodotti alimentari, gli oli essenziali devono essere registrati dalla Commissione europea (CE). Il regolamento (CE) n. 1334/2008 emesso dalla Commissione europea contiene vari requisiti che devono essere messi in atto per garantire l'uso sicuro degli oli essenziali. Negli Stati Uniti, anche la Food and Drug Administration (FDA) ha approvato l'elenco degli oli essenziali che possono essere utilizzati. Inoltre, questi oli essenziali sono classificati come Generally Recognised as Safe (GRAS). Tuttavia, la FDA osserva che gli oli essenziali sono considerati sicuri se utilizzati nelle quantità raccomandate (US FDA, 2018). Anche se gli oli essenziali possono essere usati come additivi alimentari, in alcuni casi possono causare reazioni allergiche. L'uso degli oli essenziali può causare effetti negativi sulla salute come irritazioni degli occhi, della pelle e delle mucose (*Ali et al., 2015*). Pertanto, è fondamentale determinare l'equilibrio tra l'efficacia e la tossicità degli oli essenziali.

2 SCOPO DELLA RICERCA

Tenendo conto dei temi discussi nel capitolo precedente, è importante lo sviluppo di materiali innovativi per la realizzazione di un packaging attivo che permetta l'estensione della *shelf life* degli alimenti. Il mio lavoro di tesi sperimentale si inserisce proprio in questo ambito. Esso è stato parte di un progetto di ricerca POR (Programma Operativo Regionale) finanziato dalla Regione Campania e dal titolo “*Proprietà antibatteriche e antiossidanti di imballaggi innovativi per il prolungamento della shelf life di alimenti confezionati*”. Questo progetto è stato svolto in collaborazione con l'Istituto per i Polimeri, Compositi e Biomateriali (IPCB) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), l'azienda casertana Laminazione Sottile S.p.A. e il Laboratorio di Igiene e Tossicologia Ambientale del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Ambientali, Biologiche e Farmaceutiche (DiSTABiF) presso cui ho lavorato. L'IPCB ha partecipato attivamente nella progettazione del coating, mentre l'azienda Laminazione Sottile, leader mondiale nella produzione di substrati in alluminio, si è occupata di realizzare i prototipi di imballaggio alimentare attivi. L'obiettivo del progetto è stato quello di realizzare coating polimerici additivati con molecole naturali ad attività antimicrobica e antiossidante, da utilizzare come rivestimento per imballaggi in alluminio destinati alla conservazione degli alimenti. Il progetto POR ha come primo obiettivo lo studio dell'attività antibatterica e antiossidante di molecole naturali quali la capsaicina, l'acido malico, la vanillina e l'eugenolo, presenti in piante edibili. La molecola naturale selezionata è stata l'eugenolo, componente prevalente dell'olio essenziale dei chiodi di garofano, in quanto ha mostrato una maggiore attività antibatterica e antiossidante e, pertanto, è stato incorporato in una resina vinilica² e utilizzato per realizzare i materiali “attivi”. Di questi ultimi è stata saggiata l'attività antibatterica nei confronti di batteri potenzialmente patogeni per l'uomo e batteri responsabili del deterioramento alimentare (batteri alterativi). Nel mio lavoro di tesi è stata studiata e confrontata l'attività antibatterica di due tipi di coating: uno contenente eugenolo in forma libera e uno in cui l'eugenolo è stato incorporato all'interno di un nanocarrier inorganico, la silice mesoporosa Santa Barbara Amorphous-15 (SBA-15), per valutare come questo carrier influenzasse la cinetica di rilascio dell'eugenolo dall'imballaggio all'alimento.

² Resina vinilica: polimero resinoso ottenuto da due monomeri differenti, cioè il cloruro di vinile e l'acetato di vinile, fatto reagire con alcol vinilico o etanolo e che seccano per evaporazione del solvente.

L'attività antibatterica è stata testata nei confronti di due ceppi batterici potenzialmente patogeni per l'uomo *Listeria monocytogenes* ATCC7644 e *Salmonella typhimurium* ATCC14028. La scelta dell'utilizzo della silice mesoporosa SBA-15 è legato al fatto che tali nanoparticelle hanno la capacità di controllare il rilascio della molecola incorporata al loro interno (Lu et al., 2021). L'incapsulamento di oli essenziali volatili in nanoparticelle di silice mesoporosa dovrebbe, infatti, fornire effetti di rilascio controllato a lungo termine, prolungando la *shelf life* dell'alimento, senza influire sull'attività antimicrobica. Infatti, il campione Al/VIN/5%EG/SBA-15 è stato progettato per studiare e modulare la cinetica di rilascio dell'eugenolo dal packaging all'alimento. Questo permetterebbe al coating di rilasciare l'eugenolo nell'alimento più lentamente e in modo controllato, promuovendo una *shelf life* più duratura del prodotto confezionato. Oltre all'attività antimicrobica delle due tipologie di coating, è stata valutata anche la loro attività antiossidante mediante i saggi DPPH e ABTS. Infatti, nel presente studio, per ampliare le conoscenze sulle proprietà dei coating a base vinilica menzionati, la loro attività antiossidante è stata valutata in modo preliminare esponendoli direttamente alle soluzioni DPPH[•] e ABTS^{•+}. Successivamente, l'attività antiossidante è stata valutata anche indirettamente: i rivestimenti sono stati esposti a vari simulanti alimentari (soluzioni che mimano le capacità estrattive degli alimenti), in particolare etanolo al 50% per alimenti mediamente lipofili ed etanolo al 95% per alimenti fortemente lipofili, per 0, 1, 3 e 7 giorni a temperatura di refrigerazione (5°C) e ambiente (25°C), e quindi l'attività AO dell'eugenolo rilasciato dai rivestimenti è stata valutata in termini di attività radical scavenging con i saggi DPPH e ABTS. Questo approccio è utile per comprendere quali potessero essere i potenziali alimenti da confezionare con questi materiali.

2.1 Eugenolo

L'eugenolo (C₁₀H₁₂O₂; 2-metossi-4-allilfenolo nella nomenclatura IUPAC, figura 3) è un composto aromatico appartenente al gruppo dei fenoli.

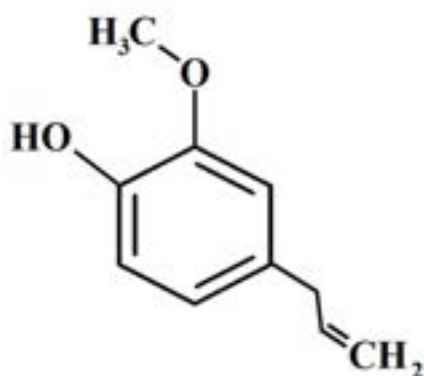


Figura 3. Struttura chimica dell'eugenolo.

È comunemente ottenuto dagli oli essenziali naturali delle piante delle famiglie Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae e Myristicaceae ed è il componente più importante dell'olio di chiodi di garofano (*Syzygium aromaticum*). Si trova in varie concentrazioni a seconda della specie, ma la fonte più ricca è *S. aromaticum* ed è il principale responsabile del suo caratteristico aroma (Marchese et al., 2017). L'eugenolo è un liquido dal colore giallo paglierino, di consistenza oleosa e aromatico, scarsamente solubile in acqua e ben solubile in solventi organici. L'eugenolo possiede proprietà antiossidanti, analgesiche, antinfiammatorie e antimicrobiche contro un ampio gruppo di batteri e parassiti (Marchese et al., 2017).

2.2 Caratteristiche e proprietà degli imballaggi

L'azienda Laminazione Sottile S.p.A. si è occupata di produrre i fogli di alluminio flessibili che sono stati utilizzati durante questo lavoro sperimentale. Una resina vinilica a base di solvente (VIN), normalmente utilizzata dall'azienda per rivestire fogli di alluminio flessibili destinati al contatto alimentare, è stata fornita. La resina vinilica è stata utilizzata dai ricercatori dell'IPCB del CNR per progettare due rivestimenti per fogli flessibili di alluminio (12 μm di spessore) ottenendo dei fogli dal peso di 10 ± 2 g di polimero/ m^2 . Nel dettaglio, i due rivestimenti sono stati additivati con eugenolo libero (EG) (5% p/p - 5g per 100g di massa di resina vinilica) o con una combinazione di eugenolo libero (2,5% p/p - 2,5g per 100g di massa di resina vinilica) e di eugenolo caricato in SBA-15 (2,5% p/p) (EG/SBA-15). I due campioni sono stati codificati rispettivamente come Al/VIN/5%EG e Al/VIN/5%EG/SBA-15. Le due formulazioni sono state agitate a 1200 giri/min per 30 min. Il metiletilchetone (MEK) è stato utilizzato per regolare la viscosità al fine di facilitare la distribuzione della resina sul foglio di alluminio. Successivamente,

ciascuna formulazione attiva e la resina sono state distribuite su fogli di alluminio utilizzando un bar coater. Il coating contenente eugenolo libero è stato progettato per valutarne l'attività antimicrobica; l'idea di progettare anche il coating in cui l'eugenolo è incorporato all'interno della silice mesoporosa nasce dal fatto di voler valutare come questa possa incrementare e prolungare nel tempo l'attività antimicrobica dell'eugenolo stesso. Grazie alla dimensione uniforme dei pori, alla stabilità, all'ampio volume dei pori e alla biocompatibilità, l'SBA-15 (figura 4) è stata ampiamente utilizzata in vari campi. Essa è una silice mesoporosa, questo vuol dire che la dimensione dei pori varia da 2 a 50 nm. Nel caso specifico della SBA-15, i pori hanno una struttura esagonale ben ordinata con dimensioni dei pori fino a 30 nm (Larki et al., 2021).

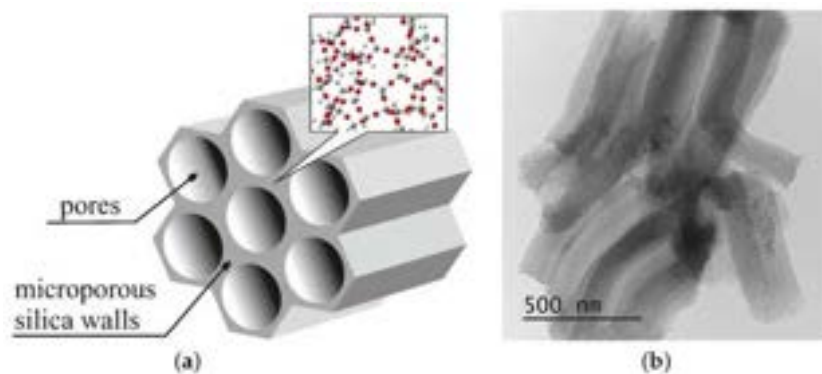


Figura 4. La struttura della silice mesoporosa di tipo SBA-15: uno schema (a) e una microfotografia al TEM (b). (Laskowski et al., 2019)

Si è visto che l'uso di SBA-15 funzionalizzata ritarda la migrazione della molecola incorporata nel lume interno, mostrando così una riduzione della diffusività della stessa dal coating all'alimento. Questo permette di controllare nel tempo il rilascio della molecola e di conseguenza aumentare il tempo di conservazione dell'alimento. Il nanocarrier inorganico poroso, oltre ad avere la funzione di controllare il rilascio dell'antimicrobico/antiossidante, ha anche la funzione di proteggerlo da raggi UV e/o solventi. Inoltre, la maggiore proprietà idrofobica della resina vinilica caricata con eugenolo potrebbe facilitare la sua potenziale applicazione nel campo dell'imballaggio alimentare attivo grazie alla migliore funzione di resistenza all'acqua per evitare che l'umidità alteri la struttura del materiale (Li et al., 2021). La silice mesoporosa SBA-15 è stata utilizzata come nanocarrier, grazie alla sua capacità di incorporare molecole attive nella sua porosità interna sia per preservare la loro attività specifica che per controllare il loro rilascio da parte dell'architettura dei pori, della dimensione dei pori

e delle specifiche interazioni molecola/parete dei pori (Stanzione et al., 2017). Oltre al rilascio cinetico di composti attivi, gli sviluppi nel campo della nanoincapsulazione di composti bioattivi naturali per sistemi di imballaggio alimentare sono in costante crescita. Questo perché i nanocarrier possono proteggere i composti attivi dalla degradazione dovuta all'ossidazione, alla luce, alle alte temperature, preservando la loro attività e migliorando la loro biodisponibilità (Beltrán & Valdés, 2021).

2.3 Simulanti alimentari

Per simulante alimentare si intende un mezzo di prova che imita l'alimento; il comportamento del simulante alimentare simula la migrazione dai materiali destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari (Regolamento (UE) N. 10/2011). I prodotti alimentari sono matrici complesse e pertanto le analisi delle sostanze che vi migrano possono presentare difficoltà. Si ritiene quindi necessario designare mezzi di prova che simulino il trasferimento delle sostanze dai materiali di imballaggio al prodotto alimentare. Quando si utilizzano i simulanti alimentari, le condizioni standard quali durata della prova e temperatura, devono riprodurre il più possibile la migrazione potenziale dal materiale al prodotto alimentare. Per determinare il simulante alimentare adeguato a determinati prodotti alimentari, è necessario tenere conto della composizione chimica e delle proprietà fisiche del prodotto alimentare. I simulanti alimentari sono elencati nella tabella 1.

Tabella 1. Elenco dei simulanti alimentari (UE/10/2011).

Simulante alimentare	Abbreviazione
Etanolo 10 % (v/v)	Simulante alimentare A
Acido acetico 3 % (p/v)	Simulante alimentare B
Etanolo 20 % (v/v)	Simulante alimentare C
Etanolo 50 % (v/v)	Simulante alimentare D1
Olio vegetale (*)	Simulante alimentare D2
poli(ossido di 2,6-difenil-p-fenilene), dimensioni delle particelle 60-80 mesh, dimensioni dei pori 200 nm	Simulante alimentare E

(*) Qualunque olio vegetale con una distribuzione di acidi grassi di

N. di atomi di carbonio nella catena di acidi grassi: n. di insaturazione	6-12	14	16	18:0	18:1	18:2	18:3
Gamma di composizione degli acidi grassi espressa in % (p/p) di metilestere per gascromatografia	< 1	< 1	1,5-20	< 7	15-85	5-70	< 1,5

I simulanti A, B e C sono designati per i prodotti alimentari che hanno un carattere idrofilo e sono in grado di estrarre sostanze idrofile. Il simulante alimentare B è

utilizzato per i prodotti alimentari il cui pH è inferiore a 4,5. Il simulante alimentare C va utilizzato per i prodotti alimentari alcolici il cui contenuto di alcol è inferiore o uguale a 20 % e per i prodotti alimentari che contengono una quantità significativa di ingredienti organici che li rendono più lipofilici. I simulanti alimentari D1 e D2 sono designati per i prodotti alimentari che hanno un carattere lipofilico e sono in grado di estrarre sostanze lipofile. Il simulante alimentare D1 è utilizzato per i prodotti alimentari alcolici il cui contenuto alcolico è superiore a 20% e per le emulsioni del tipo olio in acqua. Il simulante D2 è utilizzato per i prodotti alimentari che contengono grassi liberi nella superficie. Molto spesso però, per motivi di ricerca, l'olio vegetale viene sostituito dall'etanolo al 95% che riproduce lo stesso comportamento dell'olio. Il simulante alimentare E è designato per le prove di migrazione specifica negli alimenti secchi (*Regolamento UE N. 10/2011*).

3 MATERIALI E METODI

3.1 Ceppi batterici utilizzati

3.1.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes è un batterio Gram-positivo a forma bastoncellare (0,5-4 μm di diametro e 0,5-2 μm di lunghezza, figura 5), non sporigeno, anaerobio facoltativo e presenta flagelli peritrichi che permettono il movimento. La temperatura ottimale di crescita di *L. monocytogenes* è di 30–37 °C, ma può sopravvivere e moltiplicarsi tra 0 (quindi anche a temperature di refrigerazione) e 45 °C. *L. monocytogenes* è un microrganismo ampiamente distribuito in natura, con principali habitat in suolo, acqua e foraggio. Dal momento che si trova nel foraggio, anche gli animali domestici possono essere infettati.



Figura 5. *Listeria monocytogenes* (<https://www.sciencephoto.com/>)

L. monocytogenes è la principale causa di listeriosi di origine alimentare nell'uomo. Dopo l'ingestione, il germe entra nelle cellule enterocitarie attraverso un meccanismo che utilizza molecole di invasione per distruggere la membrana cellulare dell'ospite. I macrofagi, a questo punto, fagocitano i batteri per neutralizzarli. Il fagosoma si fonde con il lisosoma contenente enzimi digestivi, formando un fagolisosoma che cerca di distruggere l'agente che è appena entrato. Qui *L. monocytogenes* produce una tossina chiamata listeriolisina O che è vitale per la virulenza del batterio, anche se la listeriosi è un'infezione (conseguente all'ingestione di microrganismi vivi che possono determinare malattie locali o sistemiche). La listeriolisina O ha la funzione di rompere il fagolisosoma che cerca di distruggere, per fagocitosi, il microrganismo. Di conseguenza, grazie a questa tossina, il batterio si trova libero nella cellula. Dopo un

periodo di replicazione intracellulare all'interno delle cellule infette, la produzione della proteina che induce l'assemblaggio dell'actina ActA determina la formazione di code di actina che facilitano la motilità batterica all'interno delle cellule e la diffusione a cellule non infette. L'agente patogeno si diffonderà quindi da cellula a cellula ripetendo il suo ciclo di vita e nascondendosi dal sistema immunitario (*Sibanda et al., 2022*). La listeriolisina O, quindi, serve solo ad aumentare il potere patogeno del batterio, ma non interviene nel determinismo della malattia, quindi si tratta di un'infezione. La listeriosi di origine alimentare ha tre caratteristiche cliniche principali, vale a dire meningite, setticemia e aborto. Nell'uomo sano può decorrere in forma lieve e autolimitante causando gastroenterite febbrile, ma in soggetti più fragili (bambini, anziani, persone immunocompromesse e donne in gravidanza) può presentarsi in forme gravi, talvolta letali, comportando setticemia e meningite. La listeriosi è una delle più gravi malattie di origine alimentare. È una malattia relativamente rara, presentante da 0,1 a 10 casi per 1 milione di persone all'anno a seconda dei Paesi e delle regioni del mondo. Sebbene il numero di casi di listeriosi sia ridotto, l'alto tasso di morte associato a questa infezione la rende un problema significativo per la salute pubblica. Gli alimenti più spesso associati alla listeriosi includono:

- alimenti con una lunga durata di conservazione in frigorifero (*L. monocytogenes* può crescere in quantità significative negli alimenti a temperature di refrigerazione se gli viene concesso un tempo sufficiente);
- alimenti che vengono consumati senza ulteriori trattamenti, come la cottura, che altrimenti ucciderebbero *L. monocytogenes*.

Nelle passate epidemie (*OMS, 2018*), gli alimenti coinvolti includevano prodotti a base di carne pronti al consumo, come wurstel, carne spalmabile (paté), salmone affumicato e salsicce di carne cruda fermentata, nonché prodotti lattiero-caseari (inclusi formaggi a pasta molle, latte non pastorizzato e gelati) e insalate preparate (inclusi insalata di cavolo e germogli di soia), frutta e verdura fresca. Le verdure possono essere contaminate attraverso il suolo o l'uso di letame come fertilizzante. Anche gli alimenti pronti possono essere contaminati durante la lavorazione e i batteri possono moltiplicarsi durante la distribuzione e lo stoccaggio. *L. monocytogenes* negli alimenti viene ucciso dalla pastorizzazione e dalla cottura. Le linee guida sulla prevenzione della listeriosi includono la pratica della manipolazione sicura degli

alimenti e il rispetto di alcune regole: corrette procedure igieniche, separare crudo e cotto, cuocere bene, mantenere il cibo a temperature sicure, utilizzare acqua microbiologicamente pura. Le persone appartenenti a gruppi ad alto rischio dovrebbero evitare gli alimenti a rischio e leggere e seguire attentamente il periodo di validità e le temperature di conservazione indicate sull'etichetta del prodotto. È importante rispettare la durata e la temperatura di conservazione riportate sulle etichette degli alimenti pronti per il consumo per garantire che i batteri potenzialmente presenti in questi alimenti non si moltiplichino in quantità pericolosamente elevate.

3.1.2 *Salmonella typhimurium*

Salmonella typhimurium (figura 6) è un bacillo Gram-negativo, asporigeno e anaerobio facoltativo, replica tra gli 8 e i 45 °C. È un batterio ubiquitario e resistente che può sopravvivere diverse settimane in un ambiente secco e diversi mesi in acqua (OMS, 2018).



Figura 6. *Salmonella typhimurium* (<https://www.sciencephoto.com/>)

Nel caso della *Salmonella*, si parla di tossinfezione (essa è dovuta all'ingestione del germe e della tossina) perché contiene nella propria struttura delle endotossine, cioè lipopolisaccaridi termoresistenti che sono componenti naturali della parete cellulare dei batteri Gram-negativi. Queste endotossine vengono liberate una volta che il batterio muore. La tossinfezione provocata da *Salmonella typhimurium* fa parte delle forme non tifoidee, responsabile di forme cliniche a prevalente manifestazione gastroenterica. Ogni anno quasi 1 persona su 10 si ammala, infatti la *Salmonella* è una delle 4 principali cause globali di malattie diarroiche. La salmonellosi di solito è caratterizzata da febbre acuta, dolori addominali, diarrea, nausea e talvolta vomito. I sintomi della salmonellosi sono relativamente lievi e nella maggior parte dei casi i

malati si riprendono senza un trattamento specifico. Tuttavia, in alcuni casi, in particolare nei bambini e negli anziani, la disidratazione conseguente alla diarrea può diventare grave e pericolosa per la vita. L'insorgenza dei sintomi della malattia si verifica di solito 12-36 ore dopo l'ingestione di *Salmonella* e la malattia dura 2-7 giorni. Dopo essere entrato nell'ospite per via orale, *Salmonella typhimurium* raggiunge l'intestino crasso, dove l'agente patogeno entra in contatto con l'epitelio intestinale. Qui la cellula ospite internalizza il batterio e si ha la formazione di un vacuolo contenente *Salmonella*. Grazie ad un particolare meccanismo, il patogeno evita la difesa immunitaria innata e si replica all'interno delle cellule. La produzione di citochine proinfiammatorie, come IL-8, TNF e IL-1 β , da parte delle cellule infette avvia una cascata di eventi che porta al reclutamento di cellule infiammatorie, inclusi macrofagi e neutrofili. La risposta infiammatoria tissutale altera l'ambiente del lume intestinale. I batteri sono ampiamente distribuiti negli animali domestici e selvatici, ma sono prevalenti negli animali come polli, maiali e bovini. La salmonellosi nell'uomo viene generalmente contratta attraverso acqua contaminata, il consumo di alimenti contaminati di origine animale (principalmente uova, carne, pollame e latte), sebbene altri alimenti, comprese le verdure verdi contaminate dal letame, siano implicati nella sua trasmissione. I casi nell'uomo si verificano anche quando le persone hanno contatti con animali infetti, compresi gli animali domestici. Questi animali infetti spesso non mostrano segni di malattia. La prevenzione richiede misure di controllo in tutte le fasi della catena alimentare, dalla produzione agricola, alla trasformazione, produzione e preparazione degli alimenti sia negli stabilimenti commerciali che a casa. Tra le misure preventive troviamo:

- assicurarsi che il cibo sia ben cotto;
- evitare il latte crudo e i prodotti a base di latte crudo, ma bere solo latte pastorizzato o bollito;
- lavarsi accuratamente e frequentemente le mani con sapone, in particolare dopo il contatto con animali domestici o da fattoria, o dopo essere stati in bagno;
- lavare accuratamente frutta e verdura, soprattutto se consumate crude. Se possibile, frutta e verdura dovrebbero essere sbucciate.

3.2 Preparazione delle colture batteriche

È stato preparato l'inoculo dei batteri prelevando una colonia dalla *master plate* specifica con un'ansa sterile e poi stemperandola in 10 ml di terreno specifico per

ciascun batterio, in particolare Brain Heart Infusion per *L. monocytogenes* e Nutrient Broth per *S. typhimurium*. Ciascun inoculo è stato incubato alla temperatura di crescita specifica di ogni ceppo e cioè 37 °C per entrambi, per 16 ore.

3.2.1 Esecuzione del test

Il test di attività antibatterica dei materiali contenenti eugenolo è stato eseguito seguendo la ISO 22196:2007 “*Plastics – Measurement of antibacterial activity on plastic surfaces*”. Questo test si sviluppa in 3 giorni articolati in questo modo:

- giorno 1: contatto tra i film e i ceppi batterici;
- giorno 2: processamento dei campioni;
- giorno 3: conta delle colonie.

Sono stati preparati i campioni da testare, cioè i coating contenenti eugenolo (Al/VIN/5%EG) e quelli contenenti eugenolo e il carrier (Al/VIN/5%EG/SBA-15), cioè silice SBA-15, ritagliandoli in modo tale da ottenere delle dimensioni di 5 cm x 5 cm. Sono stati preparati anche i bianchi (Al/VIN), cioè film di controllo: si tratta di fogli flessibili in alluminio rivestiti dalla sola resina vinilica. I film sono stati passati in etanolo al 70% per 10 secondi, lasciati asciugare e, una volta pronti, sono stati riposti ognuno in una piastra Petri sterile. Nel giorno 1 è stata effettuata una lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro a 600 nm dell'inoculo batterico. I valori di densità ottica (OD) ottenuti dalla misurazione allo spettrofotometro sono stati convertiti in unità formanti colonie/mL (UFC/mL), utilizzando opportune curve di crescita (OD vs. UFC/mL). In accordo con la ISO 22196:2007, sono state effettuate diluizioni in Nutrient Broth 1:500 delle sospensioni batteriche per testare una concentrazione batterica di 6×10^5 UFC/mL. Dopodiché è stato effettuato il contatto: 0,4 mL di sospensione batterica sono stati distribuiti sul coating da testare. Ogni coating poi è stato ricoperto con una cover sterile in polietilene (PE), dalle dimensioni di 4 cm x 4 cm. I campioni sono stati incubati a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ in condizioni di umidità relativa non inferiori al 90% per 24 ore. Nel giorno 2, passate 24 ore, sono stati processati i campioni. In condizioni di sterilità, è stata rimossa la cover di PE ed è stata utilizzata una soluzione di lavaggio (Soybean Casein Digest Lecithin Polysorbate - SCDLP) per sciacquare la cover ed il film in modo tale da raccogliere tutti i batteri adesi a queste superfici, dopodiché partendo dalla soluzione di lavaggio sono state effettuate diluizioni scalari con fattore 10 utilizzando tampone fosfato

diluito 1:800. Ogni diluizione è stata piastrata in duplicato mediante un piastramento per inclusione in Plate Count Agar (PCA). Dopodiché le piastre sono state incubate a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24-48 ore, trascorse le quali, è stata effettuata la conta delle colonie cresciute prendendo in considerazione solo le piastre aventi un numero di colonie compreso tra 30 e 300.

3.2.2 Analisi dei dati

È stato determinato il numero di batteri vivi per ogni campione testato utilizzando l'equazione:

$$N = (100 \times C \times D \times V) / A$$

- dove N è il numero di batteri vivi trovati per cm^2 di campione testato;
- C è la media ottenuta dal duplicato delle piastre;
- D è la diluizione considerata;
- V è il volume in mL di SCDLP aggiunto al campione;
- A è l'area del film in mm^2 .

Ogni test è stato eseguito almeno due volte in modo indipendente con un minimo di due repliche. L'analisi dei dati è stata effettuata con i programmi Microsoft Excel e Graphpad Prism Analysis tramite i quali, utilizzando i valori di LogN di due test indipendenti, è stata calcolata la differenza statisticamente significativa (*Bonferroni's Multiple Comparison Test*) in riferimento al controllo negativo. Le differenze sono considerate significative per $*p < 0,5$.

3.3 Attività antiossidante dei rivestimenti attivi

3.3.1 Screening dell'attività antiossidante

L'attività antiossidante dei materiali Al/VIN/5%EG e Al/VIN/5%EG/SBA-15 è stata sottoposta a screening misurando la loro attività di scavenging radicalico mediante i saggi DPPH e ABTS descritti di seguito. La percentuale di scavenging radicale (RS%) è stata calcolata in riferimento al controllo negativo (Al / VIN) secondo Orlo e collaboratori (2021).

3.3.2 Saggio DPPH

Il test DPPH è stato eseguito in linea con Brand-Williams e co-autori (1995). Superfici pari a $0,19 \text{ cm}^2$ del controllo negativo, Al/VIN/5%EG e

Al/VIN/5%EG/SBA-15 sono state messe in quadruplicato in piastre a 96 pozzetti e sono stati aggiunti 235 μ L di soluzione di DPPH^{*} sciolto in metanolo (101,43 μ M). Dopo 30 minuti, i materiali sono stati rimossi e l'assorbanza è stata registrata a 515 nm. L'attività RS% è stata calcolata come segue:

$$RS\% = \left[\frac{OD_{controllo\ negativo} - OD_{campione}}{OD_{controllo\ negativo}} \right] \times 100 \quad (1)$$

3.3.3 Saggio ABTS

Il test ABTS è stato effettuato secondo Lavorgna e collaboratori (2021). L'ABTS⁺⁺ è stato preparato co-incubando la soluzione acquosa di ABTS (7 mM) con la soluzione acquosa di K₂S₂O₈ (140 mM) per 16-18 ore al buio. La soluzione ABTS⁺⁺ è stata dapprima diluita con una soluzione di tampone fosfato per ottenere $0,7 \pm 0,02$ OD (734 nm) e successivamente 227 μ L della soluzione radicalica sono stati messi in contatto con il controllo negativo, Al/VIN/5%EG e Al/VIN/5%EG/SBA-15 (0,19 cm²) in quadruplicato in piastre a 96 pozzetti. Dopo 6 minuti, i materiali sono stati rimossi e l'assorbanza è stata registrata a 734 nm. L'attività RS (%) è stata calcolata secondo l'equazione 1.

3.4 Attività antiossidante dopo test di rilascio dell'eugenolo

Sono stati condotti studi di rilascio dell'eugenolo da rivestimenti Al/VIN/5%EG e Al/VIN/5%EG/SBA-15 determinando la sua migrazione dal polimero all'etanolo al 50% (simulante alimentare mediamente lipofilo) e all'etanolo al 95% (simulante di alimenti fortemente lipofili) dopo 0, 1, 3 e 7 giorni a 5 °C e 25 °C. I test di rilascio sono stati eseguiti come segue: una superficie di 3 cm² di ciascun campione polimerico è stata esposta a 5 mL di simulante alimentare (rapporto area-volume 6 dm²/L). La concentrazione di eugenolo rilasciata in ciascun simulante alimentare è stata analizzata mediante spettroscopia UV nei diversi tempi selezionati e quantificata utilizzando una curva di calibrazione di assorbanza/concentrazione (mM) dell'eugenolo. L'efficacia antiossidante delle concentrazioni di eugenolo nei simulanti alimentari è stata testata utilizzando i saggi DPPH e ABTS.

3.4.1 Determinazione dell'attività antiradicalica

La capacità di scavenging di DPPH^{*} e ABTS⁺⁺ dei simulanti alimentari, che sono stati in contatto con Al/VIN, Al/VIN/5%EG e Al/VIN/5%EG/SBA-15 è stata determinata secondo Lavorgna e co-autori (2019) e Orlo e collaboratori (2022). In dettaglio, 15

μL di simulanti alimentari sono stati testati in quadruplicato con 235 μL di soluzione di DPPH \cdot (101,43 μM) nel test DPPH e 22,7 μL di simulanti alimentari sono stati incubati con 227 μL di soluzione ABTS $^{2+}$ (7 mM) nel saggio ABTS. L'assorbanza è stata letta a 515 nm dopo 30 minuti nel test DPPH e a 734 nm dopo 6 minuti nel saggio ABTS. RS (%) è stato calcolato utilizzando l'equazione 1.

3.5 Analisi dei dati

Per ogni test sono stati condotti tre esperimenti indipendenti, con almeno quattro repliche ciascuno. RS (%) è stato analizzato mediante analisi Prism 5 (GraphPad Inc., USA) per ottenere la media e la deviazione standard.

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Attività antimicrobica

Per ogni rivestimento attivo sviluppato, l'attività antibatterica è stata valutata nei confronti dei ceppi *L. monocytogenes* e *S. typhimurium*. I risultati dell'attività antimicrobica dei materiali Al/VIN/5%EG e Al/VIN/5%EG/SBA-15 sono riportati in figura 7.

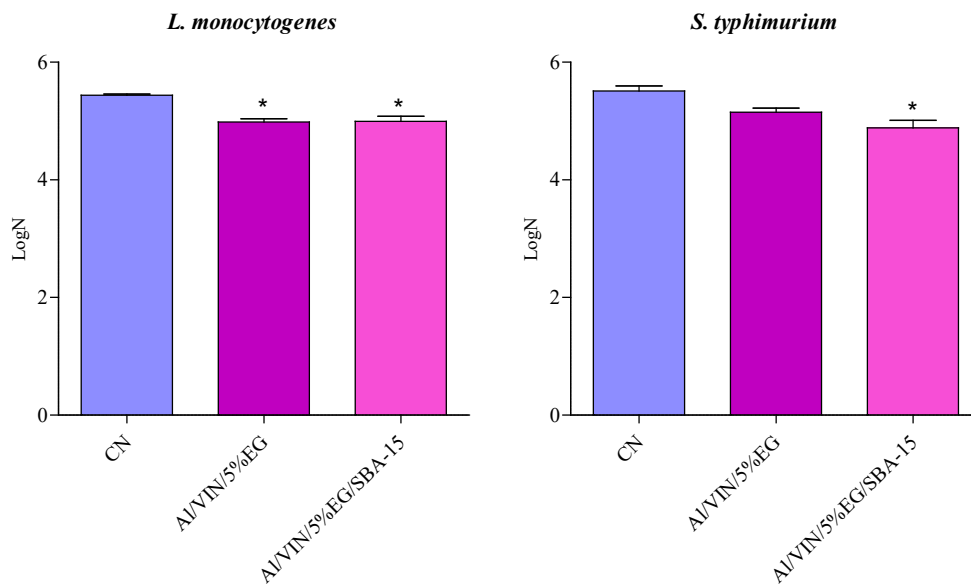


Figura 7. Valori logaritmici del numero di cellule vitali (LogN) di *L. monocytogenes* e *S. typhimurium* recuperati dai film Al/VIN (CN) e da Al/VIN/5%EG e Al/VIN/5% EG/SBA-15 dopo 24 ore di esposizione. I risultati sono espressi come $\text{LogN} \pm \text{DS}$ ($n = 3$). Gli asterischi indicano la differenza statisticamente significativa tra i campioni e il controllo negativo (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ -Bonferroni's Multiple Comparison Test).

I risultati hanno evidenziato che è stata indotta una significativa (* $p < 0,05$) riduzione delle cellule vitali di *L. monocytogenes*, rispetto al CN, quando sono state esposte sia al materiale Al/VIN/5%EG sia a quello Al/VIN/5%EG/SBA-15. Considerando, invece, la riduzione delle cellule vitali di *S. typhimurium*, si evince che la vitalità di questi batteri è stata significativamente influenzata solo da Al/VIN/5%EG/SBA-15 (* $p < 0,05$). È interessante notare, quindi, che la riduzione delle cellule vitali per *S. typhimurium* si è ottenuta quando l'eugenolo è stato caricato in nanoparticelle di silice mesoporosa SBA-15. La silice è nota per favorire un rilascio lento e prolungato dell'eugenolo (Lu et al., 2021). La riduzione del numero di cellule batteriche è da attribuire all'eugenolo che è riuscito a penetrare meglio nelle cellule grazie al supporto del carrier SBA-15, considerando il fatto che le particelle di silice in sé non hanno

nessun effetto antibatterico (Memar et al., 2020). Il ruolo della silice, infatti, è quello di facilitare il trasporto di composti attivi all'interno della parete batterica, come evidenziato dal lavoro di Wu e collaboratori (2019), in cui i ricercatori hanno testato un coating contenente SBA-15 e curcumina su *S. aureus* e su *E. coli*. La silice influisce sui meccanismi di trasporto che avvengono a livello membranale e può interagire con i batteri fondendosi con la membrana o con la parete cellulare e rilasciando il composto antimicrobico all'interno o adsorbendosi alla parete cellulare per fungere da continuo deposito di rilascio dell'agente antimicrobico (Memar et al., 2020). In effetti, Gámez e collaboratori (2020) hanno notato che l'incapsulamento di composti naturali in SBA-15 si traduce in un aumento della loro solubilità e stabilità chimica, migliorando anche la loro biodisponibilità ed efficacia contro i patogeni. La maggiore resistenza al coating da parte di *S. typhimurium* potrebbe essere attribuita al fatto che questo batterio è un Gram-negativo. Nair e collaboratori (2014) hanno valutato l'efficacia antimicrobica di diverse molecole contenute negli oli essenziali delle piante, tra cui l'eugenolo, su diversi sierotipi di *Salmonella*. In questo studio, i sierotipi di *Salmonella* erano altamente sensibili a oli essenziali di timo (rosso e bianco), moderatamente sensibili al carvacrolo e alla trans-cinnamaldeide, e meno sensibili all'eugenolo. Quest'ultimo risultato è in accordo con i risultati del presente lavoro di tesi, dove si è visto che *S. typhimurium* non è molto sensibile al solo eugenolo. *L. monocytogenes*, invece, secondo Kawacka e coautori (2020) è sensibile all'eugenolo, in accordo col presente lavoro di tesi. È noto che la parete cellulare dei batteri Gram-negativi è più complessa (Nazzaro et al., 2013): ha uno strato di peptidoglicano spesso 2-3 nm, che è più sottile rispetto alla parete cellulare dei batteri Gram-positivi e una membrana esterna al sottile strato di peptidoglicano. Il peptidoglicano e la membrana esterna sono saldamente legati dalla lipoproteina di Braun; questa proteina è legata in modo covalente al peptidoglicano ed è incorporata nella membrana esterna. La presenza di una membrana esterna è una delle caratteristiche che differenziano i batteri Gram-negativi da quelli Gram-positivi. È composta da un doppio strato di fosfolipidi che è legato alla membrana interna da lipopolisaccaridi (LPS). Lo strato di peptidoglicano è coperto dalla membrana esterna che contiene varie proteine e LPS. Il lipopolisaccaride è costituito dal lipide A, il polisaccaride centrale e la catena laterale O specifica, che consente ai batteri Gram-negativi di essere più resistenti agli OE e ad altri estratti naturali con attività antimicrobica. Diversi autori hanno riscontrato che i batteri Gram-positivi sono più

sensibili di quelli Gram-negativi quando vengono esposti a diversi componenti degli oli essenziali (COE) (Burt, 2004; Ait-Ouazzou et al., 2013). Questo comportamento è in accordo con i risultati qui ottenuti. La minore sensibilità dei batteri Gram-negativi all'azione dei diversi COE potrebbe essere dovuta a differenze nella struttura e nella permeabilità della membrana cellulare batterica, come la membrana esterna che circonda i microrganismi Gram-negativi limitando la diffusione dei composti idrofobi. Secondo questi autori, il meccanismo d'azione dei COE sulle cellule batteriche si basa sull'alterazione dell'involucro cellulare dei microrganismi. I COE interrompono la membrana cellulare con modifiche morfologiche e permeabilizzazione cellulare, causano alterazioni dell'omeostasi del pH, perdita di ioni inorganici e perdita del potenziale di membrana, inibiscono la respirazione cellulare e perturbano le frazioni lipidiche delle membrane citoplasmatiche batteriche (Ait-Ouazzou et al., 2013). Song e collaboratori (2014) hanno riportato che gli oli essenziali, compreso l'olio essenziale di chiodi di garofano contenente il 78% di eugenolo, hanno una maggiore capacità di inibizione contro i batteri Gram-positivi rispetto ai batteri Gram-negativi. Nel loro studio hanno utilizzato una proteina della piuma di pollo come materiale di base di un film; infatti, sono stati preparati film composti di tale proteina e gelatina e ne sono state studiate le proprietà antimicrobiche. Il film composito contenente olio di chiodi di garofano ha mostrato effetti inibitori nei confronti di *L. monocytogenes* ed *E. coli*, in particolare aveva una maggiore inibizione contro il batterio Gram-positivo rispetto al batterio Gram-negativo, in accordo con i risultati del mio lavoro di tesi. Inoltre, Hosseini e collaboratori (2009) hanno rivelato che con l'1,5% di olio di chiodi di garofano, il film di chitosano era molto efficace contro diversi ceppi batterici, come *E. coli* e *L. monocytogenes*. Melendez-Rodriguez e collaboratori (2019) hanno sviluppato un film di poli(3-idrossibutirrato-co-3-idrossivalerato) (PHBV) contenente eugenolo incorporato nei pori delle nanoparticelle di silice mesoporosa e hanno valutato l'attività antimicrobica contro *S. aureus* e *E. coli*. L'incorporazione della silice con eugenolo nel film PHVB ha mostrato una significativa attività antibatterica contro entrambi i batteri, ma l'attività maggiore è stata osservata su *S. aureus*, attribuibile alla maggiore resistenza dei batteri Gram-negativi rispetto a quelli Gram-positivi; questi risultati sono concordanti con quelli ottenuti nel mio lavoro di tesi. Allo stesso modo, Nisar e collaboratori (2018) hanno studiato l'attività antimicrobica di film di pectina di agrumi additivati con olio essenziale di chiodi di garofano contro i batteri

S. aureus, *E. coli* e *L. monocytogenes*. Per i film con la stessa concentrazione (1,5%) di olio di chiodi di garofano, i diametri della zona di inibizione erano significativamente ($p < 0,05$) diversi tra i batteri e seguivano il seguente ordine di attività *S. aureus* > *L. monocytogenes* > *E. coli*. Questi risultati sono in accordo con il lavoro di Hosseini e collaboratori (2008), che hanno osservato gli effetti inibitori dell'olio di chiodi di garofano contro *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* in pellicole commestibili a base di chitosano. Gli agenti antimicrobici erano più efficaci contro i batteri Gram-positivi (*L. monocytogenes* e *S. aureus*) rispetto ai Gram-negativi (*E. coli*). Anche Nonsee e coautori (2011) hanno riportato il potente effetto inibitorio dell'olio di chiodi di garofano incapsulato in film basati su idrossipropilmetilcellulosa (HPMC) sulla crescita di *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Nello studio di Hasheminya e coautori (2019) sono stati sviluppati e caratterizzati film biocompositi di kefiran-carbossimetilcellulosa incorporati con l'olio essenziale di santoreggia, di questi ne hanno valutato l'attività antimicrobica contro *S. aureus* ed *E. coli*. Complessivamente, l'attività antimicrobica dei film contro *S. aureus*, rispetto a *E. coli*, è stata maggiore, dimostrando che l'effetto degli oli essenziali sui batteri Gram-positivi è leggermente superiore al loro effetto sui batteri Gram-negativi. Il film utilizzato da Sharma e collaboratori (2020), invece, era un film di poli (lattide)-poli (butilene adipato-co-tereftalato) (PLA-PBAT) incorporato con l'olio di timo e l'olio di chiodi di garofano a varie concentrazioni (1%, 5% e 10% in peso). L'efficacia antibatterica del film incorporato con oli essenziali di timo e chiodi di garofano è stata testata contro *E. coli* (Gram-negativo) e *S. aureus* (Gram-positivo). Questi film hanno mostrato una significativa attività antibatterica e in particolare una maggiore efficacia di inibizione batterica contro *S. aureus*. Teixeira e collaboratori (2013) hanno determinato l'efficacia di 17 oli essenziali, tra cui l'olio di chiodi di garofano, per inibire la crescita di sette ceppi batterici patogeni e deterioranti di origine alimentare, tra cui *Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhimurium*. L'attività antibatterica degli oli essenziali è stata valutata utilizzando il metodo dell'alone di inibizione. Si è visto che *L. monocytogenes* era sensibile a tutti gli oli essenziali testati mentre *S. typhimurium* si è dimostrato essere più resistente. Wu e collaboratori (2019) hanno utilizzato liposomi per incapsulare l'olio essenziale di alloro e le nanoparticelle d'argento (AgNP) e questi sono stati miscelati con chitosano per rivestire film di polietilene. Di questi film è stata valutata l'attività antimicrobica contro *S. aureus* ed *E. coli* e si è visto che l'attività antibatterica del film contro *S. aureus* era superiore a

quella contro *E. coli*. Al meglio delle mie conoscenze, in letteratura non sono riportati lavori sui materiali preparati in questo lavoro di tesi. Ciò suggerisce l'innovazione del presente lavoro che ha portato ad una pubblicazione nel 2023. In tale lavoro Orlo e collaboratori (2023) hanno studiato l'attività antibatterica dei coating contenenti eugenolo libero o caricato in nanoparticelle di silice mesoporosa Santa Barbara Amorphous (SBA)-15 nei confronti di batteri potenzialmente patogeni per l'uomo (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus*) e nei confronti di batteri responsabili del deterioramento alimentare (*Shewanella putrefaciens*, *Brochothrix thermosphacta* e *Lactobacillus plantarum*). I risultati, mostrati in figura 8, hanno evidenziato una significativa riduzione delle cellule vitali di *S. aureus* ed *E. coli* (rispetto al relativo CN) dopo esposizione per 24h al materiale Al/VIN/5%EG, con valori $p < 0,01$ e $0,05$, rispettivamente sui due ceppi.

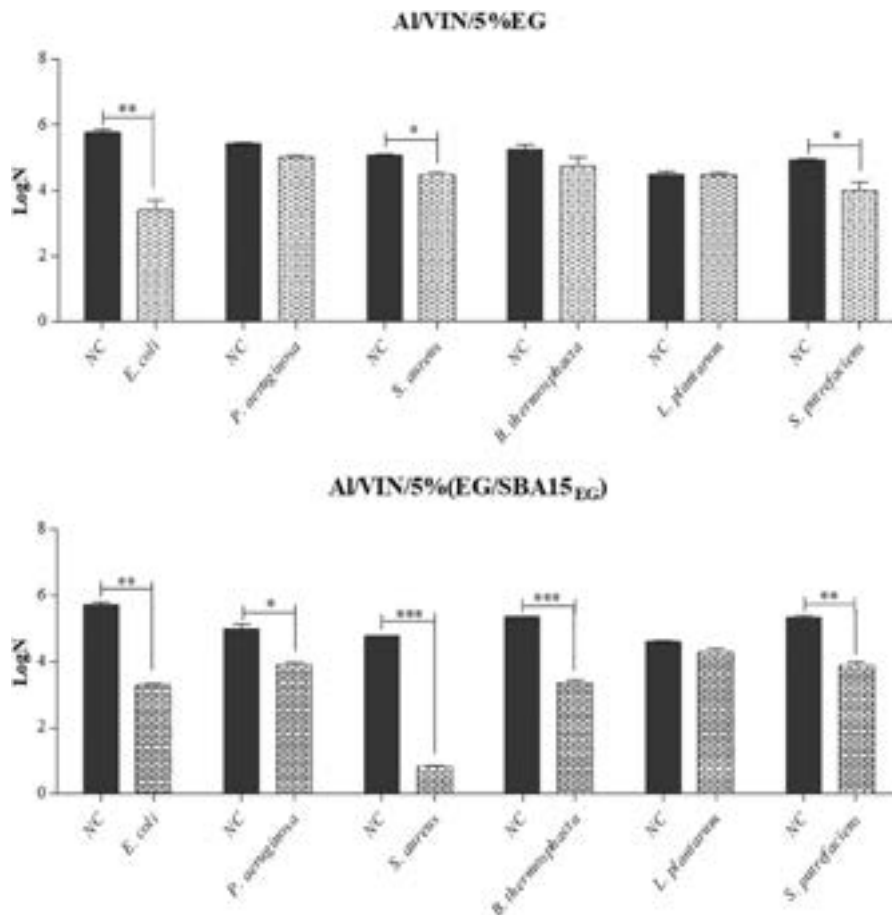


Figura 8. Valori logaritmici dei numeri di cellule vitali (LogN) di *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. thermosphacta*, *L. plantarum* e *S. putrefaciens* recuperate dai materiali Al/VIN (NC), Al/ VIN/5%EG e Al/VIN/5%EG/SBA-15 dopo 24 ore di esposizione. I risultati sono espressi come $\text{LogN} \pm \text{DS}$ ($n=3$). Gli asterischi indicano la differenza statisticamente significativa tra i campioni e il controllo negativo (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ - upaired t test) (Orlo et al., 2023).

Tra i ceppi batterici responsabili del deterioramento degli alimenti, solo la vitalità di *S. putrefaciens* è stata significativamente influenzata da Al/VIN/5%EG. È interessante notare che, quando l'eugenolo è stato caricato in nanoparticelle di silice mesoporosa SBA-15 e incorporato nella resina vinilica, non solo la sua efficacia antibatterica è aumentata significativamente su *S. aureus* e *S. putrefaciens*, ma ha anche ridotto la vitalità di *P. aeruginosa* (*p <0,05) e *B. thermosphacta* (**p <0,001). *L. plantarum* è stato l'unico ceppo non suscettibile a entrambi i coating. Orlo e collaboratori (2021) hanno osservato che vari composti metossifenolici naturali, tra cui l'eugenolo, sono risultati scarsamente attivi contro *L. plantarum* che è considerato uno dei principali batteri di deterioramento, in quanto causa una diminuzione della qualità del cibo con cambiamento del colore, inacidimento, aroma sgradevole e formazione di gas nel cibo. Tuttavia, l'elevata resistenza mostrata da *L. plantarum* all'eugenolo, libero o caricato in SBA-15, potrebbe essere considerata anche un possibile vantaggio per applicazioni dei coating Al/VIN/5%EG e Al/VIN/5%EG/SBA-15 come imballaggi alimentari. Infatti, i lattobacilli possono essere usati come starter nei latticini e in alcune carni lavorate per fornire acidità, contribuire al sapore e produrre composti antimicrobici (per esempio batteriocine) che promuovono la conservazione degli alimenti e al tempo stesso possono inibire la crescita di microrganismi dannosi attraverso la competizione per i nutrienti.

4.2 Screening dell'attività antiossidante dei rivestimenti

Uno screening preliminare relativo alla capacità antiossidante dei film Al/VIN/5%EG e Al/VIN/5%EG/SBA-15 è stato eseguito esponendoli a soluzioni di DPPH[•] e ABTS^{•+}. I risultati, riportati nella tabella 2 ed espressi come RS %, sono stati calcolati in riferimento al controllo negativo (Al/VIN).

Tabella 2. Attività *radical scavenging* di DPPH[•] e ABTS^{•+} (%) ± deviazione standard (n=3) registrata dai film Al/VIN/5%EG e Al/VIN/5%EG/SBA-15.

	Radical scavenging %	
	DPPH [•]	ABTS ^{•+}
Al/VIN/5%EG	81,53 ± 0,80	1,37 ± 1,83
Al/VIN/5%EG/SBA-15	65,64 ± 1,52	6,63 ± 0,71

Entrambi i rivestimenti attivi sono stati in grado di eliminare il radicale DPPH di oltre il 50%, dimostrando un'elevata efficacia. La solubilizzazione dell'eugenolo in

soluzioni radicaliche svolge probabilmente un ruolo chiave nel determinare la sua attività antiossidante (AO), infatti la soluzione metanolica di DPPH[•] potrebbe favorire l'estrazione dell'eugenolo che è un composto lipofilo. Al contrario, l'acqua è un solvente non idoneo alla solubilizzazione dell'eugenolo, ciò potrebbe spiegare le basse percentuali di RS registrate nel saggio ABTS^{•+} (soluzione acquosa). Il materiale contenente eugenolo libero (circa 0,5 g/m² di foglio di alluminio) ha mostrato una maggiore efficacia nello scavenging del DPPH[•] rispetto al materiale contenente eugenolo caricato in nanocarrier SBA-15, probabilmente a causa del basso rilascio di eugenolo determinato dal carrier. Risultati simili sono stati ottenuti da Navikaite-Snipaitiene e collaboratori (2018) che hanno sviluppato film di polipropilene rivestiti con acetato di cellulosa additivato con eugenolo (0,44 ± 0,09 g/m²) causando un'inibizione del 60% del radicale DPPH dopo 30 minuti di incubazione. Inoltre, è interessante confrontare l'attività scavenger del materiale Al/VIN/5%EG in questo lavoro con quella dell'eugenolo in quanto molecola pura. A tal proposito, Orlo e collaboratori (2021) hanno osservato che l'eugenolo era in grado di eliminare il radicale DPPH del 50% alla concentrazione di 0,152 mM. Se si considera che nel saggio DPPH ci sia stata una solubilizzazione dell'eugenolo a partire dal coating, ottenendo una concentrazione ≤ 0,246 mM (calcolata facendo riferimento alla quantità di EG, pari a 9,5 µg presente sulla superficie di 0,19 cm² testata, e al volume di soluzione di DPPH a contatto, pari a 235 µL) si può assumere che l'incorporazione della molecola nel materiale non ne riduce l'attività (50% RS a 0,153 mM di eugenolo singolo e 81,53% RS a ≤ 0,246 mM di eugenolo incorporato nel coating).

4.3 Attività antiossidante dell'eugenolo rilasciato

In questo studio sono stati effettuati test di rilascio dell'eugenolo dai coating messi a contatto con simulanti alimentari (etanolo al 50% e 95%) secondo la legislazione UE 10/2011 per 0, 1, 3 e 7 giorni a 5 °C e 25 °C. I tempi e la temperatura sono stati importanti per stabilire l'influenza di queste variabili sulla cinetica di rilascio della molecola. Il rilascio dell'eugenolo è stato monitorato utilizzando l'analisi spettrofotometrica e le concentrazioni migrate sono state riportate nella tabella 3.

Tabella 3. Concentrazioni (mM) di eugenolo migrate dai film Al/VIN/5%EG e Al/VIN/5%EG/SBA-15 in etanolo al 50% e 95% (EtOH), dopo esposizione per 0, 1, 3 e 7 giorni (G) a 5 °C e 25 °C. I risultati sono riportati come media \pm deviazione standard (n=3).

Coating	T °C	Tempo	[mM]	
			50% EtOH	95% EtOH
Al/VIN/5%EG	5°C	G 0	0,0000 \pm 0,0000	0,0000 \pm 0,0000
		G 1	0,0110 \pm 0,0004	0,0474 \pm 0,0019
		G 3	0,0245 \pm 0,0021	0,0743 \pm 0,0004
		G 7	0,0619 \pm 0,0010	0,1294 \pm 0,0217
	25°C	G 0	0,0000 \pm 0,0000	0,0000 \pm 0,0000
		G 1	0,0313 \pm 0,0005	0,0715 \pm 0,0123
		G 3	0,0877 \pm 0,0070	0,1129 \pm 0,0096
		G 7	0,0979 \pm 0,0003	0,1598 \pm 0,0558
Al/VIN/5%EG/SBA-15	5°C	G 0	0,0000 \pm 0,0000	0,0000 \pm 0,0000
		G 1	0,0018 \pm 0,0002	0,0340 \pm 0,0017
		G 3	0,0114 \pm 0,0043	0,0483 \pm 0,0050
		G 7	0,0216 \pm 0,0035	0,0626 \pm 0,0019
	25°C	G 0	0,0000 \pm 0,0000	0,0000 \pm 0,0000
		G 1	0,0284 \pm 0,0066	0,0411 \pm 0,0052
		G 3	0,0430 \pm 0,0267	0,0539 \pm 0,0175
		G 7	0,0684 \pm 0,0334	0,0987 \pm 0,0166

Quando il materiale Al/VIN/5%EG/SBA-15 è stato esposto ai simulanti alimentari, è stata registrata una quantità inferiore di eugenolo migrato rispetto a quella migrata dal materiale Al/VIN/5%EG. I risultati hanno evidenziato che il nanocarrier SBA-15 è stato in grado di ridurre il rilascio dell'eugenolo fino al 65% (ottenuto confrontando 0,0216 vs. 0,0619 mM, nella tabella 3) dopo 7 giorni di esposizione all'etanolo al 50% a 5 °C, dimostrando il potenziale uso del materiale Al/VIN/5%EG/SBA-15 per preservare la durata di conservazione degli alimenti per un tempo più lungo. A 25 °C, dopo 7 giorni di esposizione, il nanocarrier SBA-15 ha ridotto il rilascio di eugenolo del 30% e 38%, quando il materiale è stato esposto rispettivamente al 50% e al 95% di etanolo. Pazos e co-autori (2016) hanno studiato la migrazione dell' α -tocoferolo dai film di chitosano e hanno affermato che le migrazioni di sostanze fitochimiche dai rivestimenti sono rese più facili a 25 °C, in linea con questo studio. Ciò significa che la temperatura gioca un ruolo chiave nel rilascio di sostanze fitochimiche. López-De-Dicastillo e co-autori (2011) hanno incorporato i flavonoidi quercetina, catechina e gli estratti di tè verde in matrici polimeriche contenenti un copolimero di alcol etilenevinilico e hanno studiato il loro rilascio in simulanti alcolici e acquosi, trovando migrazioni più elevate in etanolo al 95%, presumibilmente a causa della migliore

solubilità dei flavonoidi e degli estratti di tè verde in questo simulante alimentare. Il presente lavoro dimostra che il nanocarrier SBA-15 è in grado di ridurre il rilascio di eugenolo principalmente a 5 °C, estendendo la durata di conservazione degli alimenti grassi. Per valutare l'efficacia antiossidante delle concentrazioni di eugenolo rilasciate dai materiali Al/VIN/5%EG e Al/VIN/5%EG/SBA-15 esposti ai simulanti, sono state saggiate aliquote di questi ultimi (contenenti la molecola) utilizzando i saggi DPPH e ABTS. Le figure 9 e 10 mostrano i risultati dell'attività antiossidante.

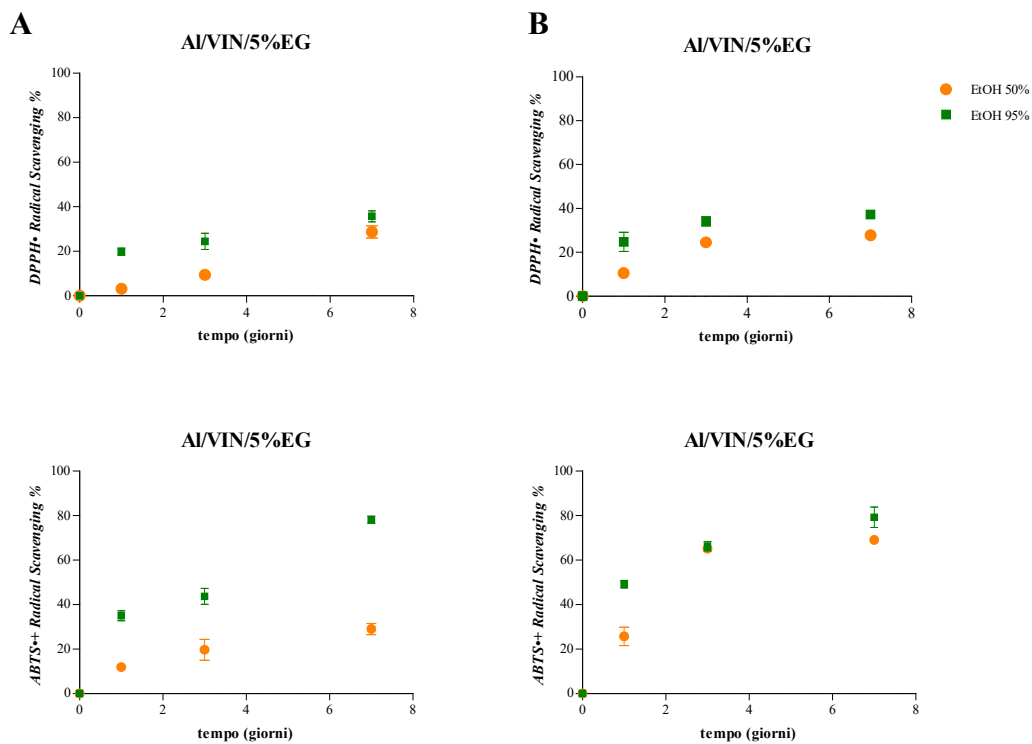


Figura 9. Attività *radical scavenging* di DPPH[•] e ABTS^{•+} (%) del materiale Al/VIN/5%EG dopo contatto con simulanti alimentari per 0, 1, 3 e 7 giorni, a 5 °C (A) e 25 °C (B). Le barre rappresentano l'errore standard (n = 3).

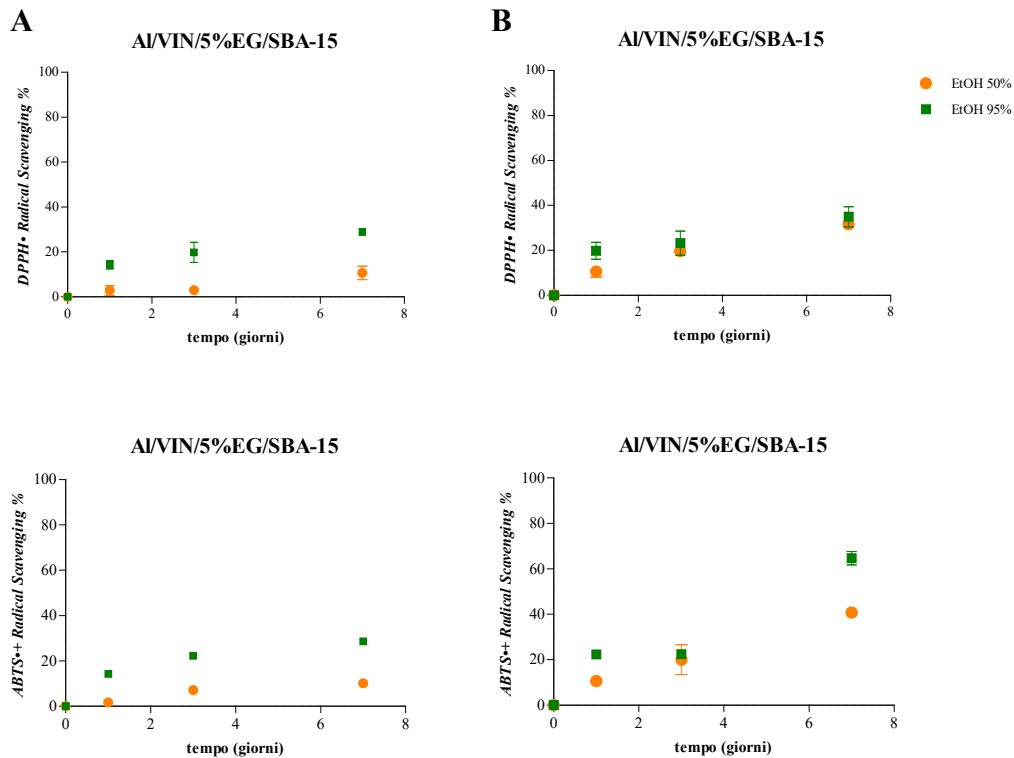


Figura 10. Attività *radical scavenging* di DPPH• e ABTS•+ (%) del materiale Al/VIN/5%EG/SBA-15 dopo contatto con simulanti alimentari per 0, 1, 3 e 7 giorni, a 5 °C (A) e 25 °C (B). Le barre rappresentano l'errore standard (n = 3).

L'attività antiossidante di entrambi i coating è stata maggiore nei confronti dell'ABTS•+. Dopo 7 giorni di esposizione del materiale Al/VIN/5%EG all'etanolo al 50% le percentuali di scavenging dei radicali hanno raggiunto più del 30% e del 70% a 5 °C e 25 °C, rispettivamente, mentre quando il materiale è stato esposto all'etanolo al 95%, la percentuale di RS è stata pari all'80%. Per quanto riguarda il materiale Al/VIN/5%EG/SBA-15, è stato determinato uno scavenging del radicale ABTS di circa il 30% e 70% dopo 7 giorni di esposizione all'etanolo al 95%, rispettivamente a 5 °C e 25 °C. Diversi studi hanno riportato che i materiali attivi funzionano alla temperatura di refrigerazione. Un valido contributo è lo studio di Echeverría e collaboratori (2018) in cui sono stati studiati film con isolato proteico di soia (SPI)-montmorillonite (MMT) contenenti olio essenziale di chiodi di garofano per la conservazione dei filetti di tonno rosso a temperatura di refrigerazione. Gli autori hanno riscontrato che tali film sono stati in grado di diminuire l'ossidazione lipidica dei filetti di tonno durante il periodo di conservazione studiato. Torrieri e collaboratori (2011) hanno proposto la combinazione di atmosfera modificata e packaging attivo antiossidante contenente α -tocoferolo. Con questo sistema combinato, dopo 18 giorni di conservazione a 3 °C è stato registrato un basso tasso di ossidazione dei filetti

freschi di tonno. Al giorno d'oggi, la scienza dei nanomateriali è di grande interesse e l'uso di nanocarrier, per promuovere un rilascio controllato di composti attivi nel tempo, migliora l'applicabilità di film/rivestimenti bioattivi-incapsulati, garantendo la stabilità della *shelf life* degli alimenti (Liu *et al.*, 2018). Heirlings e collaboratori (2004) hanno studiato l'attività antiossidante di LDPE e etilene vinil acetato contenente α -tocoferolo libero e α -tocoferolo adsorbiti su SBA-15, al fine di garantire un rilascio controllato durante la durata di conservazione dell'alimento. Gli autori hanno riscontrato che la quantità migrata di α -tocoferolo veniva ritardata per 3 giorni rispetto all' α -tocoferolo libero, suggerendo possibili applicazioni alimentari del film attivo studiato. Un altro studio condotto da Gámez e collaboratori (2020) riporta che solo il 27% del timolo veniva rilasciato da SBA-15 dopo 24 ore e che il carrier promuove il rilascio del composto attivo fino a 31 giorni, raggiungendo il 69% del rilascio. Gli sviluppi nel campo della nanoincapsulazione di composti bioattivi naturali per sistemi di imballaggio alimentare sono in costante crescita (Beltrán & Valdés, 2021). Al giorno d'oggi, in Europa, l'uso di nanocarrier per applicazioni di imballaggio alimentare, è regolato dall'UE 10/2011 che approva nanoparticelle di carbone nero, nitrato di titanio e silice. Tra questi ultimi, SBA-15 svolge un ruolo chiave nelle applicazioni di imballaggio alimentare, in termini di facilità di complessazione e maggiore biodisponibilità di molecole attive. A questo proposito, Guntero e collaboratori (2018) hanno riportato che l'incapsulamento di bis-eugenolo nelle nanoparticelle di silice mesoporosa SBA-15 ha migliorato l'attività antiossidante della molecola, poiché il bis-eugenolo incapsulato ha mostrato un'attività superiore a quella esercitata dall'eugenolo libero. Analogamente, Morante-Zarero e collaboratori (2022) hanno dimostrato che grazie alle particelle di silice mesoporosa aumentava la biodisponibilità di quercetina e naringenina poiché la loro attività antiossidante è stata superiore a quella dei composti non incapsulati. Questi studi, insieme agli aspetti positivi di SBA-15 come la sua biocompatibilità e la sua facile funzionalizzazione superficiale, incoraggiano l'uso di questi carrier (Gámez *et al.*, 2020).

5 CONCLUSIONI

I temi trattati nel mio lavoro di tesi si inseriscono perfettamente nell'obiettivo numero 2: "Porre fine alla fame, raggiungere la sicurezza alimentare, migliorare la nutrizione e promuovere un'agricoltura sostenibile" dell'Agenda 2030 per lo Sviluppo Sostenibile, programma d'azione *per le persone, il pianeta e la prosperità* sottoscritto nel settembre 2015 dai governi dei 193 Paesi membri dell'ONU. Per il raggiungimento dell'obiettivo 2, uno dei numerosi approcci adottati è il costante miglioramento e aggiornamento degli imballaggi alimentari. In particolare, negli ultimi anni, l'imballaggio alimentare attivo che utilizza gli oli essenziali è stato riconosciuto dalla comunità scientifica come un approccio promettente che crea una barriera che protegge gli alimenti dal deterioramento, prolungando la durata di conservazione degli stessi. Il mio lavoro di tesi si inserisce in un progetto, portato avanti dal mio gruppo di ricerca, che ha avuto l'obiettivo di valutare l'efficacia dell'eugenolo incorporato in coating polimerici. Nello specifico, ho incrementato il numero di ceppi batterici su cui è stata valutata l'attività antibatterica dei materiali studiati. I miei risultati dimostrano che entrambi i materiali Al/VIN/5%EG e Al/VIN/5%EG/SBA-15 hanno ridotto significativamente il numero delle cellule vitali di *L. monocytogenes*, mentre la presenza della silice mesoporosa SBA-15 contribuisce a veicolare più facilmente il composto attivo nella parete cellulare batterica di *S. typhimurium*, riducendone la carica vitale. Tali risultati confermano l'importanza dell'utilizzo della silice mesoporosa SBA-15 che aumenta l'efficacia antibatterica dell'eugenolo nei confronti di tutti i batteri testati. In questo lavoro, inoltre, è stata dimostrata l'attività antiossidante dei materiali e si è visto che questa dipende dal tempo e dalla temperatura di esposizione dei materiali attivi e che i due coating sono particolarmente adatti per essere utilizzati per la conservazione e l'estensione della durata di conservazione degli alimenti grassi. Anche in questo caso, il materiale contenente SBA-15 si è dimostrato essere più efficace nell'aumentare la durata di conservazione degli alimenti. In futuro, per garantire la sicurezza per la salute umana, sarà importante approfondire lo studio valutando l'attività antibatterica e antiossidante dei coating ponendoli direttamente a contatto con alimenti veri e propri e valutando la migrazione globale e specifica della molecola attiva incorporata nei coating (secondo il Regolamento UE 10/2011). Un ultimo aspetto da valutare sarà

sicuramente l'impatto economico che la messa in produzione a livello industriale dei coating proposti nel presente lavoro di tesi potrà avere.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmed M., Pickova J., Ahmad T., Liaquat M., Farid A., Jahangi M., (2016). Oxidation of lipids in foods. *Sarhad Journal of Agriculture*, 32, 230-238.
- Ait-Ouazzou A., Espina L., Gelaw T. K., de Lamo-Castellví S., Pagán R., García-Gonzalo D., (2013). New insights in mechanisms of bacterial inactivation by carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 114, 1: 173–185.
- Ali B., Al-Wabel N.A., Shams S., Ahamad A., Khan S.A., Anwar F., (2015). Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5, 8: 601-611.
- Altay Ö., Köprüalan Ö., İlter I., Koç M., Ertekin F. K., Jafari S. M., (2022). Spray drying encapsulation of essential oils; process efficiency, formulation strategies, and applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-19.
- Appendini P., Hotchkiss J. H., (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3, 2: 113-126.
- Atarés L., Chiralt A., (2016). Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 48, 51-62.
- Barry C. S., Giovannoni J. J., (2007). Ethylene and Fruit Ripening. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26, 143–159.
- Beltrán S. A., Valdés G. A., (2021). New Trends in the Use of Volatile Compounds in Food Packaging. *Polymers*, 13, 1053.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C., (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Burt S., (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
- Calo J. R., Crandall P. G., O’Bryan C. A., Ricke S. C., (2014). Essential Oils as Antimicrobials in Food Systems—A Review. *Food Control*, 54, 111-119.
- Cenci-Goga B. T., Fattori che influenzano la crescita e la sopravvivenza dei microrganismi negli alimenti. *Igiene e Tecnologie Degli Alimenti di Origine Animale*, 2nd ed.; Le Point Vétérinaire Italie: Milano, Italy, 2012; pp. 19–25.

- Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152. Norme in materia ambientale.
- Dhifi W., Bellili S., Jazi S., Bahloul N., Mnif W., (2016). Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. *Medicines*, 3, 1-16.
- Echeverría I., López-Caballero M. E., Gómez-Guillén M. C., Mauri A. N., Montero M. P., (2018). Active nanocomposite films based on soy proteins-montmorillonite- clove essential oil for the preservation of refrigerated bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 266, 142-149.
- Falleh H., Jemaa M. B., Saada M., Ksouri R., (2020). Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. *Food Chemistry*, 330, 127268.
- Fang Z., Zhao Y., Warner R. D., Johnson S. K., (2017). Active and intelligent packaging in meat industry. *Trends in Food Science & Technology*, 61, 60-71.
- Felix de Andrade M., Diego de Lima Silva I., Alves da Silva G., David Cavalcante P.V., Thayse da Silva F., Bastos de Almeida Y.M., Vinhas G. M., Hecker de Carvalho L., (2020). A study of poly (butylene adipate-co-terephthalate)/orange essential oil films for application in active antimicrobial packaging. *LWT*, 125, 109148.
- Firouz M. S., Mohi-Alden K., Omid M., (2021). A critical review on intelligent and *active packaging* in the food industry: Research and development. *Food Research International*, 141, 110113.
- Food and Drug Administration (2018). Part 182. Substances Generally Recognized as Safe. *Code of Federal Regulations*, 21, 433–46.
- Friedman M., Henika P. R., Mandrell R.E, (2002). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 65, 10: 1545-60.
- Gaikwad K. K., Singh S., Ajji A., (2019). Moisture absorbers for food packaging applications. *Environmental Chemistry Letters*, 17, 2: 609-628.
- Gaikwad K.K., Singh S., Negi Y. S., (2020). Ethylene scavengers for *active packaging* of fresh food produce. *Environmental Chemistry Letters*, 18, 2: 269-284.
- Galán J. E., (2021). *Salmonella typhimurium* and inflammation: a pathogen-centric affair. *Nature Reviews Microbiology*, 19, 716–725.

- Gámez E., Elizondo-Castillo H., Tascon J., García-Salinas S., Navascues N., Mendoza G., Arruebo M., Irusta S., (2020). Antibacterial Effect of Thymol Loaded SBA-15 Nanorods Incorporated in PCL Electrospun Fibers. *Nanomaterials*, 1-13.
- Gemili S., Yemenicioğlu A., Altinkaya S. A., (2010). Development of antioxidant food packaging materials with controlled release properties. *Journal of Food Engineering*, 96, 3: 325-332.
- Gibis D., Rieblinger K., (2011). Oxygen scavenging films for food application. *Procedia Food Science*, 1, 229-234.
- Gracia A., de-Magistris T., (2016). Consumer preferences for food labeling: What ranks first? *Food Control*, 61, 39-46.
- Guntero V. A., Ferretti C. A., Mancini P. M. E., Kneeteman M. N., (2018). Synthesis and Encapsulation of bis-eugenol in a Mesoporous Solid Material: Enhancement of the Antioxidant Activity of a Natural Compound from Clove Oil. *Chemical Science International Journal*, 22, 4: 1-10.
- Hansen A. Å., Moen B., Rødbotten M., Berget I., Pettersen M. K., (2016). Effect of vacuum or modified atmosphere packaging (MAP) in combination with a CO₂ emitter on quality parameters of cod loins (*Gadus morhua*). *Food Packaging and Shelf life*, 9, 29-37.
- Hasheminya S. M., Mokarram R. R., Ghanbarzadeh B., Hamishekar H., Kafil H. S., Dehghannya J., (2019). Development and characterization of biocomposite films made from kefiran, carboxymethyl cellulose and Satureja Khuzestanica essential oil. *Food Chemistry*, 15, 289: 443-452.
- Heirlings L., Siró I., Devlieghere F., Bavelvan E., Cool P., de Meulenaer B., Vansant E. F., Debevere J., (2004). Influence of polymer matrix and adsorption onto silica materials on the migration of α -tocopherol into 95% ethanol from active packaging. *Food Additives and Contaminants*, 21, 1125-1136.
- Hosseini M. H., Razavi S. H., Mousavi M. A., (2009). Antimicrobial, Physical And Mechanical Properties Of Chitosan-Based Films Incorporated With Thyme, Clove And Cinnamon Essential Oils. *Journal of Food Processing and Preservation*, 33, 6: 727-743.
- Hosseini M. H., Razavi S. H., Mousavi S. M. A., Yasaghi S. A. S., Hasansaraei A. G., (2008). Improving antibacterial activity of edible films based on

chitosan by incorporating thyme and clove essential oils and EDTA. *Journal of Applied Sciences*, 8, 16: 2895-2900

- Jamróz E., Juszczak L., Kucharek M., (2018). Investigation of the physical properties, antioxidant and antimicrobial activity of ternary potato starch-furcellaran-gelatin films incorporated with lavender essential oil. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 1094-1101.
- Jamshidi A., Zeinali T., (2019). Significance and Characteristics of *Listeria monocytogenes* in Poultry Products. *International Journal of Food Science*, 2019, 7.
- Janjarasskul T., Suppakul P., (2018). Active and intelligent packaging: The indication of quality and safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58, 5: 808-831.
- Jia C., Cao D., Ji S., Zhang X., Muhoza B., (2020). Tannic acid-assisted cross-linked nanoparticles as a delivery system of eugenol: The characterization, thermal degradation and antioxidant properties. *Food Hydrocolloids*, 104.
- Júnior L. M., Vieira R. P., Jamróz E., Anjos C.A.R., (2021). Furcellaran: An innovative biopolymer in the production of films and coatings. *Carbohydrate Polymers*, 252, 117221.
- Kawacka I., Olejnik-Schmidt A., Schmidt M., Sip A., (2020). Natural Plant-Derived Chemical Compounds as *Listeria monocytogenes* Inhibitors In Vitro and in Food Model Systems. *Pathogens*, 10, 12.
- Larki A., Saghanezhad S. J., Ghomi M., (2021). Recent advances of functionalized SBA-15 in the separation/preconcentration of various analytes: A review. *Microchemical Journal*, 169, 106601.
- Lavorgna M., Pacifico S., Nugnes R., Russo C., Orlo E., Piccolella S., Isidori, M., (2021). *Theobroma cacao* Criollo var. Beans: Biological Properties and Chemical Profile. *Foods*, 10 (3), 571.
- Li M., Yu H., Xie Y., Guo Y., Cheng Y., Qian H., Yao W., (2021). Fabrication of eugenol loaded gelatin nanofibers by electrospinning technique as *active packaging* material. *Lwt*, 139, 110800.
- Lianou A., Panagou E. Z., Nychas, G. J. E., (2016). Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. *The stability and shelf life of food* (Second Edition, 3–42).

- Liu Y., Liang X., Wang S., Qin W., Zhang Q., (2018). Electrospun Antimicrobial Polylactic Acid/Tea Polyphenol Nanofibers for Food-Packaging Applications. *Polymers*, 10, 561.
- López-De-Dicastillo C., Nerín C., Alfaro P., Catala R., Gavara R., Hernandez-Munoz P., (2011). Development of new antioxidant *active packaging* films based on ethylene vinyl alcohol copolymer (EVOH) and green tea extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 14: 7832-7840.
- Lu W., Cui R., Zhu B., Qin Y., Cheng G., Li L., Yuan M., (2021). Influence of clove essential oil immobilized in mesoporous silica nanoparticles on the functional properties of poly(lactic acid) biocomposite food packaging film. *Journal of Materials Research and Technology*, 11, 1152-1161.
- Maisanaba S., Llana-Ruiz-Cabello M., Gutiérrez-Praena D., Pichardo S., Puerto M., Prieto A. I., Jos A., Cameán A. M., (2017). New advances in *active packaging* incorporated with essential oils or their main components for food preservation. *Food Reviews International*, 33, 5: 447-515.
- Marchese A., Barbieri R., Coppo E., Orhan I. E., Daglia M., Nabavi S. F., Izadi M., Abdollahi M., Nabavi S. M., Ajami M., (2017). Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. *Critical Reviews in Microbiology*, 43, 668–689.
- Melendez-Rodriguez B.; Figueroa-Lopez K. J.; Bernardos A.; Martínez-Máñez R.; Cabedo L.; Torres-Giner S.; Lagaron M. J., (2019). Electrospun Antimicrobial Films of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) Containing Eugenol Essential Oil Encapsulated in Mesoporous Silica Nanoparticles. *Nanomaterials*, 9, 227.
- Melo R. S., Albuquerque Azevedo Á. M., Gomes Pereira A. M., Rocha R. R., Bastos Cavalcante R. M., Carneiro Matos M. N., Ribeiro Lopes P. H., Gomes G. A., Soares Rodrigues T. H., Santos H. S. D., Ponte I. L., Costa R. A., Brito G. S., Catunda Júnior F. E. A., Carneiro V. A., (2019). Chemical Composition and Antimicrobial Effectiveness of *Ocimum gratissimum* L. Essential Oil Against Multidrug-Resistant Isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Molecules*, 24, 21: 3864.
- Memar M. Y., Yekani M., Ghanbari H., Shahi S., Sharifi S., Dizaj S. M., (2020). Biocompatibility, cytotoxicity and antibacterial effects of meropenem-loaded mesoporous silica nanoparticles against carbapenem-resistant

Enterobacteriaceae. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 48: 1, 1354-1361.

- Mills A., Doyle G., Peiro A. M., Durrant J., (2006). Demonstration of a novel, flexible, photocatalytic oxygen-scavenging polymer film. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 177, 2: 328-331.
- Morante Zarcero S., Endrino A., Casado N., Pérez Quintanilla D. I. S., (2022). Evaluation of mesostructured silica materials with different structures and morphologies as carriers for quercetin and naringin encapsulation. *Journal of Porous Materials*, 29, 33-48.
- Mozuraityte R., Kristinova V., Rustad T., (2016). Oxidation of Food Components. *Encyclopedia of Food and Health*, 186-190.
- Muriel-Galet V., López-Carballo G., Gavara R., Hernández-Muñoz P., (2012). Antimicrobial food packaging film based on the release of LAE from EVOH. *International Journal of Food Microbiology*, 157, 2: 239-244.
- Nair D. V. T., Nannapaneni R., Kiess A., Schilling W., Sharma C. S., (2014). Reduction of *Salmonella* on Turkey Breast Cutlets by Plant-Derived Compounds. *Foodborne Pathogens and Disease*, 981-987.
- Navikaite-Snipaitiene V., Ivanauskas L., Jakstas V., Rüegg N., Rutkaite R., Wolfram E., Yilidrim S., (2018). Development of antioxidant food packaging materials containing eugenol for extending display life of fresh beef. *Meat Science*, 145, 9-15.
- Nazzaro F., Fratianni F., De Martino L., Coppola R., De Feo V., (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals (Basel)*, 6, 12: 1451-1474.
- Nerín C., (2010). Antioxidant active food packaging and antioxidant edible films. *Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications*, 16, 496-515.
- Nisar T., Wang Z. C., Yang X., Tian Y., Iqbal M., Guo Y., (2018). Characterization of citrus pectin films integrated with clove bud essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106: 670-680.
- Nonsee K., Supitchaya C., Thawien W., (2011). Antimicrobial activity and the properties of edible hydroxypropyl methylcellulose based films incorporated

with encapsulated clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) oil. *International Food Research Journal*, 18, 4: 1531-1541

- Olumide A. O., Oluwadara O. A., Mariyana S., Deyan S., (2020). Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19, 2: 311-331.
- Orlo E., Russo C., Nugnes R., Lavorgna M., Isidori M., (2021). Natural methoxyphenol compounds: antimicrobial activity against food-borne pathogens and -spoilage bacteria, and role in the antioxidant processes. *Foods*, 10, 1807.
- Orlo E., Stanzione M., Lavorgna M., Isidori M., Ruffolo A., Sinagra C., Lavorgna M., (2023). Novel eugenol-based antimicrobial coatings on aluminium substrates for food packaging applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 140, 9.
- Pazos P. O., Sendon R., Blanco-Fernandez B., Blanco-Dorado S., Alvarez-Lorenzo C., Concheiro A., Angulo I., Paseiro-Losada P., Rodriguez-Bernaldo de Quiros A., (2016). Preparation of antioxidant active films based on chitosan: diffusivity study of α -tocopherol into food simulants. *Journal of Food Science and Technology*, 53, 6: 2817-2826.
- Piergiovanni L., Limbo S., (2010). Food packaging: Materiali, tecnologie e soluzioni, 1: 4-6.
- Pisoschi A. M., Pop A., Gajaila I., Iordache F., Dobre R., Cazimir I., Serban A.I., (2020). Analytical methods applied to the assay of sulfur-containing preserving agents. *Microchemical Journal*, 155, 104681.
- Place F., Meybeck A., (2013). Food security and Sustainable Resource Use—What are the Resource Challenges to Food Security? *Food Security Futures: Research Priorities for the 21st Century*.
- Regolamento (CE) n. 1334/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2008, relativo agli aromi e ad alcuni ingredienti alimentari con proprietà aromatizzanti destinati a essere utilizzati negli e sugli alimenti.
- Regolamento (CE) N. 1935/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 27 ottobre 2004 riguardante i materiali e gli oggetti destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari e che abroga le direttive 80/590/CEE e 89/109/CEE.

- Regolamento (CE) N. 450/2009 della Commissione del 29 maggio 2009 concernente i materiali attivi e intelligenti destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari.
- Regolamento (UE) N. 10/2011 della Commissione del 14 gennaio 2011 riguardante i materiali e gli oggetti di materia plastica destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari.
- Rodriguez-Garcia I., Silva-Espinoza B. A., Ortega-Ramirez L. A., Leyva J. M., Siddiqui M. W., Cruz-Valenzuela M. R., Gonzalez-Aguilar G. A., Ayala-Zavala J. F., (2016). Oregano essential oil as an antimicrobial and antioxidant additive in food products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, 1717-1727.
- Ščetar M., Kurek M., Galić K., (2010). Trends in fruit and vegetable packaging – a review. *Hrvatski Časopis Za Prehrambenu Tehnologiju, Biotehnologiju i Nutricionizam*, 5 (3–4), 69-86.
- Sharma S., Barkauskaite S., Duffy B., Jaiswal A. K., Jaiswal S., (2020). Characterization and Antimicrobial Activity of Biodegradable *Active packaging* Enriched with Clove and Thyme Essential Oil for Food Packaging Application. *Foods*, 9, 1117.
- Sharma S., Barkauskaite S., Jaiswal A. K., Jaiswal S., (2021). Essential oils as additives in active food packaging. *Food Chemistry*, 343, 128403.
- Sibanda T.; Buys E.M., (2022). *Listeria monocytogenes* Patogenesi: il ruolo dell'adattamento allo stress. *Microorganismi*, 10, 1522.
- Snyder A. B., Worobo R. W., (2018). The incidence and impact of microbial spoilage in the production of fruit and vegetable juices as reported by juice manufacturers. *Food Control*, 85, 144–150.
- Song N.-B., Lee J.-H., Mijan M. A., Song K. B., (2014). Development of a chicken feather protein film containing clove oil and its application in smoked salmon packaging. *LWT - Food Science and Technology*, 57, 2: 453-460.
- Stanzione M., Gargiulo N., Caputo D., Liguori B., Cerruti P., Amendola E., Lavorgna M., Buonocore G. G., (2017). Peculiarities of vanillin release from amino-functionalized mesoporous silica embedded into biodegradable composites. *European Polymer Journal*, 89, 88-100.
- Teixeira B., Marques A., Ramos C., Neng N. R., Nogueira J. M., Saraiva J. A., Nunes M. L., (2013). Chemical composition and antibacterial and antioxidant

properties of commercial essential oils. *Industrial crops and products*, 43, 587-595.

- Torrieri E., Carlino P. A., Cavella S., Fogliano V., Attianese I., Buonocore G. G., Masi P., (2011). Effect of modified atmosphere and *active packaging* on the *shelf life* of fresh bluefin tuna fillets. *Journal of Food Engineering*, 105, 429-435.
- Valderrama F., Ruiz F., (2018). An optimal control approach to steam distillation of essential oils from aromatic plants. *Computers and Chemical Engineering*, 117, 27-31.
- Vilela C., Kurek M., Hayouka Z., Röcker B., Yildirim S., Antunes M. D. C., Nilsen-Nygaard J., Pettersen M. K., Freire C.S.R., (2018). A concise guide to active agents for active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 80, 212-222.
- Wang H., He A., Yang X., (2018). Dynamics of microflora on conveyor belts in a beef fabrication facility during sanitation. *Food Control*, 85, 42–47.
- Wang Z. C., Lu Y., Yan Y., Nisar T., Fang Z., Xia N., Guo Y., Chen D. W., (2019). Effective inhibition and simplified detection of lipid oxidation in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets during ice storage. *Aquaculture*, 511, 634183.
- World Health Organization (2015). Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group.
- World Health Organization, (2018).
- Wu Z., Zhou W., Pang C., Deng W., Xu C., Wang X., (2019). Multifunctional chitosan-based coating with liposomes containing laurel essential oils and nanosilver for pork preservation. *Food Chemistry*, 295, 16-25.
- Wyrwa J., Barska A., (2017). Innovations in the food packaging market: *Active packaging*. *European Food Research and Technology*, 243, 10: 1681-1692.
- Yildirim S., Röcker B., Pettersen M. K., Nilsen-Nygaard J., Ayhan Z., Rutkaite R., Radusin T., Suminska P., Marcos B., Coma V., (2018). *Active packaging* applications for food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17, 1: 165-199.
- Zhang H., Hortal M., Jordá-Beneyto M., Rosa E., Lara-Lledo M., Lorente I., (2017). ZnO-PLA nanocomposite coated paper for antimicrobial packaging application. *LWT*, 78, 250-257.