UNIMORE
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MODENA E REGGIO EMILIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA

Corso di Laurea Magistrale in

CONTROLLO E SICUREZZA DEGLI ALIMENTI (LM-70)

Sviluppo di packaging attivi per la valutazione dell'attività antimicrobica nei confronti di lieviti alteranti isolati da robiola

Laureando

Luca La Torre

Relatore

Prof. Andrea Pulvirenti

Prof.ssa Patrizia Fava

Correlatore

Dott. Enrico Maurizzi

Dott.ssa Emanuela Lo Faro

Anno accademico 2025/2026

Abstract

La shelf-life dei prodotti lattiero-caseari freschi rappresenta una delle principali criticità per l'industria alimentare, soprattutto a causa dello sviluppo di microrganismi alteranti in grado di compromettere la qualità e l'accettabilità del prodotto. La robiola, per l'elevata attività dell'acqua e la composizione favorevole alla crescita microbica, può essere interessata durante la conservazione da fenomeni di alterazione, tra cui lo sviluppo di lieviti e muffe.

Nel presente studio sono stati isolati e purificati le popolazioni microbiche associate alle principali alterazioni osservate sul prodotto. Le analisi hanno, infatti, evidenziato il coinvolgimento prevalente di due ceppi di lievito, denominati SAB e RB, che sono stati successivamente utilizzati come microrganismi target per valutare l'efficacia e lo sviluppo di sistemi di packaging attivo in grado di prevenire l'eventuale comparsa di alterazioni sul prodotto finito.

A tale scopo sono state investigate diverse sostanze ad azione antimicrobica - eugenolo, acido laurico, estratto di semi di pompelmo (GSE) e ossido di zinco (ZnO)- incorporate in differenti matrici polimeriche biodegradabili e/o compostabili, costituite da acido polilattico (PLA), poli(3-idrossibutirrato-co-3-idrossiesanoato) (PHBH), polibutilen succinato (PBS) e alcol polivinilico (PVA). I materiali attivati ottenuti sono stati sottoposti a prove *in vitro* nei confronti dei microrganismi precedentemente isolati, al fine di verificarne il rilascio e l'attività antimicrobica.

Le metodiche utilizzate sono quelle degli standard CLSI, AST ed EUCAST, in riferimento ai microrganismi target impiegati sia delle molecole o sostanze utilizzate e testate come principio attivo. Nello specifico sono state applicate, al fine di determinare la MIC (concentrazione minima inibitoria), le tecniche MBC (concentrazione minima battericida) quali micro- e macrodiluizione e la tecnica di sfida DDa (saggio di diffusione in dischetto).

I risultati hanno evidenziato differenze significative nell'efficacia delle combinazioni sperimentate. A partire dalla comprovata efficacia antimicrobica dei principi eugenolo ed acido laurico tal quali, GSE e ossido di zinco, invece, non hanno dimostrato una spiccata capacità antimicrobica nei confronti dei ceppi di lievito isolati. Per quanto concerne l'inclusione dei principi attivi in film, è stato possibile riconoscere una lieve attività batteriostatica da parte dell'ossido di zinco, nei confronti del solo ceppo RB, quando incluso in

PLA alla concentrazione di 1,0 mg/mL. Notevole efficacia antimicrobica è stata invece dimostrata dal film polimerico polivinilalcol attivato con il 2% p/v di eugenolo, per entrambe le combinazioni di tensioattivo (1:1 e 1:0,5) in grado di ridurre la carica iniziale di 10^7 UFC/mL dei due ceppi ad una finale di 10^4 UFC/mL e inferiore per RB (fino a 10^3 UFC/mL), potendo essere considerato potenzialmente battericida. L'attività dei sistemi è risultata influenzata sia dalla natura del composto antimicrobico sia dalle caratteristiche della matrice polimerica, confermando il ruolo delle interazioni tra polimero, sostanza attiva e matrice alimentare nel determinare la disponibilità e l'efficacia del principio attivo.

Nel complesso, lo studio evidenzia le potenzialità dei sistemi di packaging attivo basati su polimeri biodegradabili e/o compostabili nel contenimento dei microrganismi responsabili dell'alterazione della robiola. L'approccio proposto può rappresentare una strategia promettente per prolungare la conservabilità del prodotto, coniugando il controllo dello sviluppo microbico con l'impiego di materiali caratterizzati da un profilo di sostenibilità potenzialmente migliore rispetto alle soluzioni convenzionali.

Indice

1 Introduzione 5

1.1 Food Packaging 5

1.2 Polimeri “green” 8

1.2.1 Acido polilattico (PLA) 11

1.2.2 Polibutilen succinato (PBS) 13

1.2.3 Poli(3-idrossibutirrato-co-3-idrossiesanoato) (PHBH) 14

1.2.4 Polivinil alcol (PVA) 15

1.3 Additivi 16

1.3.1 Polisorbato 80 (Tween 80) 17

1.4 Active packaging 18

1.4.1 Molecole antimicrobiche 19

1.4.1.1 Acido laurico 20

1.4.1.2 Eugenolo 22

1.4.1.3 Estratto di semi di pompelmo (Grapefruit Seed Extract - GSE) 24

1.4.1.4 Ossido di zinco (ZnO) 26

1.5 Test antimicrobici 30

1.5.1 Minimum Inhibitory Concentration (MIC) 30

1.5.1.1 Disk Diffusion assay (DDa) 31

1.5.1.2 Minimal Bactericidal Concentration (MBC) 31

2 Scopo della tesi 34

3 Materiali e Metodi 36

3.1 Materiali 36

3.1.1Terreni di coltura 36

3.1.1.1 Sabouraud Dextrose Agar (SDA) 36

3.1.2 Matrici polimeriche 37

3.1.2.1 Acido polilattico (PLA) 37

3.1.2.2 Poli(3-idrossibutirrato-co-3-idrossiesanoato) (PHBH) 38

3.1.2.3 Polibutilen succitano (PBS) 39

3.1.2.4 Polivinil alcol (PVA) 39

3.1.3 Molecole bioattive 40

3.1.3.1 Eugenolo 40
3.1.3.2 Acido Laurico 41
3.1.3.3 Estratto di semi di pompelmo (Grapefruit Seed Extract – GSE) 42
3.1.3.4 Ossido di zinco 42
3.2 Metodi 43
3.2.1 Ricezione campioni e identificazione degli alteranti 43
3.2.1.1 Campionamento 43
3.2.1.2 Isolamento e purificazione 44
3.2.2 Verifica attività antimicrobica 45
3.2.2.1 MIC 45
3.2.2.1.1 DDa 45
3.2.2.1.2 MBC 45
3.2.3 Inclusione molecole attive in polimeri 47
3.2.3.1 Realizzazione 47
4 Risultati 51
4.1 Carica microbica dei contaminanti 51
4.2 Isolamento e purificazione 51
4.3 Verifica attività antimicrobica 52
4.3.1 MIC 52
4.3.1.1 DDa 52
4.3.1.1.1 Eugenolo 52
4.3.1.1.2 Acido laurico 55
4.3.1.1.3 Estratto di semi di pompelmo – GSE 56
4.3.1.1.4 Ossido di zinco 56
4.3.1.2 MBC 57
4.3.1.2.1 Eugenolo 57
4.3.1.2.2 Acido laurico 59
4.3.1.2.3 Estratto di semi di pompelmo – GSE 59
4.3.1.2.4 Ossido di zinco 63
5 Discussioni e conclusioni 66
Bibliografia 69

1 Introduzione

1.1 Food Packaging

Storicamente, lo studio dei materiali e degli alimenti sono state due principali contributori allo sviluppo degli imballaggi alimentari. La scienza dei materiali è importante per comprendere la resistenza meccanica, le proprietà barriera, l'aspetto e altre proprietà fisiche e chimiche di carta, vetro, metallo polimeri e materiali compositi, che sono importanti per la produzione e le prestazioni degli imballaggi stessi. Le scienze alimentari sono importanti per comprendere la cinetica di deterioramento degli alimenti (come la crescita microbica, l'ossidazione lipidica, l'assorbimento o la perdita di umidità) che regola la shelf life degli alimenti.

Il *food packaging*, al giorno d'oggi, rappresenta un elemento onnipresente e imprescindibile nell'industria alimentare moderna e nella gestione della *supply chain*. Questa scienza si occupa di studiare qualsiasi tipologia di imballaggio in grado di avvolgere, valorizzare e proteggere i beni che acquistiamo, dalla lavorazione e produzione, passando per la movimentazione e lo stoccaggio, fino al consumatore finale (Gordon L. Robertson, 2012). Addirittura, secondo Lockhart (1997) la tecnologia degli imballaggi è stata definita come una disciplina socio-scientifica che opera nella società per garantire la consegna dei beni al consumatore finale nelle migliori condizioni previste per il suo utilizzo.

Da un punto di vista normativo, il Packaging Institute International (Glossary of Packaging Terms, 1988) definisce l'imballaggio come «l'incapsulamento di prodotti, articoli o confezioni in una busta, borsa, scatola, tazza, vassoio, lattina, tubo, bottiglia o altro contenitore avvolto, al fine di svolgere una o più delle seguenti funzioni: contenimento, protezione, conservazione, comunicazione, utilità e prestazione».

L'obiettivo del confezionamento alimentare è quello di contenere gli alimenti in modo economicamente vantaggioso che soddisfi i requisiti del settore e i desideri dei consumatori, mantenga la sicurezza alimentare e minimizzi l'impatto ambientale (Lee, Yam & Piergiovanni, 2008).

Di solito seguendo il principio del Food Packaging è corretto effettuare una distinzione tra i diversi "livelli" di imballaggio: l'imballaggio primario è quello posto a diretto contatto con il prodotto contenuto. Rappresenta la barriera protettiva iniziale e spesso, essendo solo

l'imballaggio primario che il consumatore acquista nei punti vendita al dettaglio, la sua efficacia è cruciale. Esempi di imballaggi primari includono lattine di metallo, bottiglie di vetro, buste e confezioni rigide di plastica. L'imballaggio secondario, ad esempio una scatola o una cassa di cartone ondulato, contiene diversi imballaggi primari ed è il contenitore fisico per eccellenza per la distribuzione. L'imballaggio terziario è composto da diversi imballaggi secondari, l'esempio più comune è un pallet di scatole di cartone ondulato avvolto con pellicola estensibile. La progettazione tecnologica del *food packaging* richiede di bilanciare le proprietà dei materiali con le specifiche cinetiche di degradazione dell'alimento. I materiali tradizionali si dividono in quattro macrocategorie: vetro, metalli (alluminio e acciaio), materiali cellulosici (carta e cartone) e polimeri plastici (come PET, PE, PP e PVC). Ognuno di questi offre specifici profili di permeabilità, resistenza termica e interazione chimica con la matrice alimentare (Lee, Yam & Piergiovanni, 2008).

Oltre alla sua funzione primordiale di contenimento, il confezionamento svolge ruoli cruciali nella protezione e conservazione degli alimenti, prevenendo alterazioni chimiche, biochimiche e microbiologiche durante le fasi di trasporto, stoccaggio e vendita al dettaglio (Shin & Selke, 2014). Tradizionalmente, le funzioni del packaging possono essere suddivise in quattro categorie fondamentali interconnesse e che devono essere valutate e considerate simultaneamente nel processo di sviluppo dell'imballaggio.

1) Contenimento

   Il ruolo basilare che permette di raggruppare il prodotto alimentare in unità di volume o peso standardizzate, facilitandone la manipolazione, il trasporto e lo stoccaggio, ed evitando dispersioni. I requisiti dell'imballaggio dipendono da dimensioni, peso, forma e struttura dell'alimento contenuto. Da un punto di vista della sostenibilità l'imballaggio protegge o conserva anche gran parte dell'energia spesa durante la produzione e la lavorazione del prodotto.

2) Protezione

   Questa è considerata la funzione più importante dell'imballaggio, essenziale per il processo di conservazione. Garantisce una protezione dell'alimento contenuto da tutte quelle che possono essere le influenze esterne in grado di provocare alterazione/modificazione dello stesso, come: interventi fisici, danni meccanici, quali urti, vibrazioni, compressioni, generalmente durante la fase logistica; fenomeni chimici ambientali a carico di ossigeno, vapore acqueo (umidità), gas, luce (radiazioni UV);

agenti biologici, quali microrganismi (batteri, lieviti, muffe) o macrorganismi (insetti e roditori).

3) Comunicazione

   La funzione comunicativa è importante per creare l'identità del marchio e influenzare le decisioni di acquisto dei consumatori. L'imballaggio è l'interfaccia diretta con il consumatore, comunica con esso attraverso testi scritti, descrizioni e grafiche. Fondamentali sono le informazioni legali, ormai ben regolamentate a livello europeo ed internazionale, che devono essere obbligatoriamente riportate sulle confezioni in modo da garantire, prioritariamente, la sicurezza e la tracciabilità del prodotto. Inoltre, è da considerare che lo scopo comunicativo degli imballaggi non risulta utile solo al consumatore finale, ma è di fondamentale importanza anche per le figure intermedie del settore alimentare che si occupano della movimentazione, stoccaggio e distribuzione, normalmente dei packaging secondari e terziari.

4) Praticità d'uso

   Con il cambiamento degli stili di vita odierni, basata sull'esigenza di consumare pasti veloci e di avere una preparazione semplificata, si è arrivati ad una domanda di maggiore praticità dei prodotti alimentari. Pertanto, il food packaging cerca costantemente di innovare in maniera da offrire maggiore comodità senza sacrificare la qualità.

Facendo un passo nel passato, il concetto di confezionamento alimentare affonda le proprie radici nelle prime necessità umane di trasportare, immagazzinare e proteggere il cibo. Se nelle epoche preindustriali si ricorreva a materiali di origine naturale (come pelli, foglie, legno e vasellame in terracotta), la vera genesi del *food packaging* moderno coincide con la Rivoluzione Industriale. All'inizio del XIX secolo, gli studi pionieristici di Nicolas Appert sulla sterilizzazione termica e il successivo sviluppo dei contenitori in metallo (banda stagnata) hanno segnato il primo traguardo tecnologico nella conservazione a lungo termine degli alimenti (Paine & Paine, 1992).

Tuttavia, il punto di svolta decisivo si è verificato nel secondo dopoguerra con l'introduzione e la diffusione su larga scala dei polimeri sintetici. La plastica ha rivoluzionato l'industria alimentare, offrendo per la prima volta un materiale leggero, flessibile, modellabile a livello industriale e dotato di eccellenti e modulabili proprietà barriera contro gas e umidità, permettendo la nascita della moderna distribuzione al dettaglio (Gordon L. Robertson, 2012).

Tuttavia, le moderne sfide globali legate alla sostenibilità e alla sicurezza alimentare hanno spinto la ricerca scientifica verso soluzioni che non si limitino a essere una barriera inerte.

1.2 Polimeri “green”

Per decenni, l'industria del food packaging ha fatto esclusivo affidamento su matrici polimeriche derivate dalla raffinazione del petrolio, quali polietilene (PE), polipropilene (PP), polistirene (PS) e polietilene tereftalato (PET) (Peelman et al., 2013). Il successo di queste macromolecole sintetiche risiede nelle loro eccezionali proprietà termomeccaniche, nell'elevata inerzia chimica e nell'ottima barriera ai gas e al vapore acqueo, ottenute a costi di produzione estremamente ridotti (Lee et al., 2008). Tuttavia, l'uso massiccio e l'elevata inerzia chimico-strutturale di queste plastiche sintetiche di origine fossile hanno generato un'emergenza ecologica globale senza precedenti. La loro struttura chimica, caratterizzata da catene carboniose ad alto peso molecolare, forte idrofobicità e assenza di gruppi funzionali reattivi, le rende intrinsecamente recalcitranti alla degradazione enzimatica e microbica (Geyer et al., 2017). In aggiunta, a causa della difficoltà di separazione dei film multistrato e della contaminazione da residui alimentari, meno del 10% di tali imballaggi viene effettivamente avviato a riciclo meccanico (Peelman et al., 2013). Di conseguenza, l'imponente accumulo di questi materiali nell'ambiente e la progressiva dipendenza da fonti fossili esauribili hanno reso imperativa la transizione verso i cosiddetti polimeri green (Siracusa et al., 2008).

In ambito accademico e normativo, il termine "bioplastica" o "polimero green" è un concetto che richiede una rigorosa distinzione su due aspetti indipendenti quali l'origine della materia prima e il fine vita del materiale (Peelman et al., 2013). Un polimero si definisce:

- **bio-based**, se i monomeri che lo costituiscono derivano, interamente o in parte, da biomasse rinnovabili (es. amido, canna da zucchero, cellulosa);
- **biodegradabile**, se la sua struttura chimica è suscettibile alla scissione idrolitica ed enzimatica da parte di microrganismi (batteri, funghi, alghe) in prodotti come acqua, anidride carbonica (o metano) e biomassa, indipendentemente dalla sua origine (fossile o rinnovabile);
- **compostabile**, se la biodegradazione avviene in condizioni specifiche e controllate (come quelle del compostaggio industriale: temperature elevate, umidità definita e

presenza di ossigeno) entro tempistiche stabilite dalle normative internazionali, senza rilasciare residui tossici.

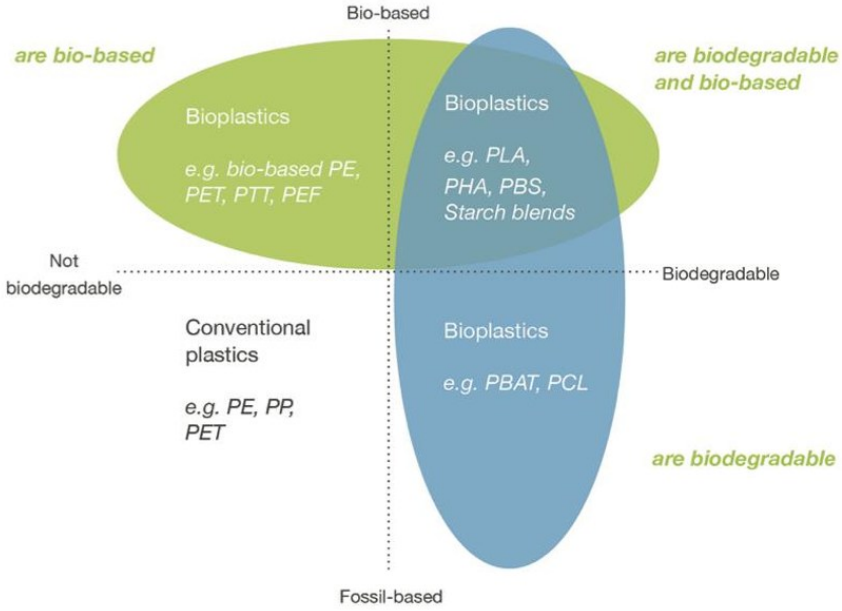


Fig. 1 – Sistema di coordinate dei materiali delle bioplastiche (European Bioplastic, 2024)

L'associazione European Bioplastics (EUBP) definisce le bioplastiche come materiali che possono essere bio-based (derivati da biomassa rinnovabile), biodegradabili, o dotati di entrambe le caratteristiche. I biopolimeri rispondono perfettamente alla necessità di impiegare materiali green nel confezionamento degli alimenti, a condizione che garantiscano il rigoroso rispetto dei criteri di idoneità al contatto alimentare sanciti dal Regolamento (CE) N. 1935/2004 e dal Regolamento (UE) N. 10/2011, volti a tutelare la salute del consumatore ed evitare la migrazione di sostanze nocive nella matrice alimentare (Dainelli et al., 2008).

L'ampio spettro delle bioplastiche disponibili nell'industria del food packaging viene suddiviso in tre insiemi, sulla base della loro fonte di derivazione (Vilela et al., 2018). Di seguito sono descritti i bio-materiali più rappresentativi di ciascun raggruppamento.

1. Polimeri estratti direttamente da biomassa

- Amido: è il polisaccaride di riserva più abbondante nel regno vegetale. Esso viene estratto principalmente da grano, mais, riso, patata ed avendo una struttura costituita da amilosio, prevalentemente lineare, e amilopectina, altamente ramificata, allo stato nativo non è plastico. Tuttavia, se applicata una gelatinizzazione, tale da rompere la matrice di amilopectina rilasciando amilosio, se miscelato con plastificanti per incrementare le qualità meccaniche e sottoposto a stress termomeccanico si ottiene il

TPS (Thermoplastic Starch). Risulta essere un polimero biodegradabile, economico, dotato di una ridotta barriera all'ossigeno e a causa della sua idrofilia di una scarsissima barriera all'umidità (Cazón P. et al., 2017);

- Cellulosa e derivati: è il bio-polimero strutturale per eccellenza delle pareti cellulari vegetali, infatti è ricavato prevalentemente da legno, canapa e cotone. Caratterizzata da facile deperibilità microbica e insolubilità in acqua, difficilmente nelle formulazioni viene impiegata tal quale. Per questo motivo viene modificata chimicamente per produrre derivati filmogeni idro- e termo-plastici, come acetato di cellulosa (CA), metilcellulosa (MC) o carbossimetilcellulosa (CMC). Tali materiali sono in grado di offrire buone proprietà meccaniche e una trasparenza comparabile alle plastiche fossili, mantenendo, però, una scarsa barriera ai gas e un'alta permeabilità al vapore d'acqua (E. Maurizzi et al., 2022).

- Chitosano: derivato della chitina (esoscheletro dei crostacei) è il secondo polisaccaride più abbondante in natura e il primo biopolimero di origine animale. Il chitosano è un polisaccaride cationico di straordinario interesse tecnologico in quanto biodegradabile, non tossico, edibile e biocompatibile, dotato, anche, di una straordinaria attività antimicrobica intrinseca nei confronti di batteri e funghi. D'altro canto, però, non garantisce una stabilità meccanica e termica ed è limitato dalla notevole sensibilità all'umidità (H. Haghighi et al., 2020; Elsabee & Abdou, 2013).

2. Polimeri sintetizzati da microrganismi

- Poliidrossialcanoati (PHA) e Poliidrossibutirrato (PHB): sono poliesteri alifatici bio-based, totalmente biodegradabili, sintetizzati tramite fermentazione microbica di biomassa organica, usando come substrato zuccheri e lipidi (K. Y. Perera et al., 2023). A differenza dei polisaccaridi, i PHA presentano un grado di idrofobicità e proprietà termomeccaniche molto simili a quelle di polimeri petrolio derivati. Tra i PHAs più discussi e studiati in materia di food packaging vi sono il poliidrossibutirrato (PHB), molto interessante per le sue elevate prestazioni barriera, il poli(3-idrossibutirrato-co-3-idrossiesanoato) (PHBH), il poli(3-idrossibutirrato-co-3-idrossivalerato) (PHBV), che presenta una minore cristallinità e rigidità. Sebbene le loro caratteristiche li rendano tecnicamente ideali per il packaging alimentare, la loro diffusione su larga scala è

tuttora limitata dagli alti costi dei substrati di fermentazione e dei processi di estrazione e purificazione (Sharma et al., 2021).

3. Polimeri sintetizzati chimicamente da monomeri bio-derivati

- Acido polilattico (PLA): È attualmente il polimero biocompatibile di maggior successo nel mondo degli imballaggi alimentari. Il PLA viene sintetizzato a partire da fonti agricole rinnovabili quali, generalmente, mais, tapioca e canna da zucchero. Gli zuccheri di queste risorse vegetali sono consumati e utilizzati a livello microbico per ottenere l'acido L-lattico (LA), precursore fondamentale delle unità monomeriche del biopolimero (M. P. Arrieta et al., 2017). Il PLA presenta una buona rigidità ed elasticità, una discreta stabilità termica e permeabilità ai gas, in parte paragonabili a quelle dei polimeri convenzionali. Grazie alla sua economicità, sta diventando un'alternativa sempre più diffusa come materiale ecologico per il confezionamento alimentare e garantisce, inoltre, una migliore lavorabilità termica rispetto agli altri biopolimeri termoplastici (Auras et al., 2004).

Nei seguenti capitoli dedicati saranno analizzati e descritti più nel dettaglio quelli che sono stati effettivamente i biopolimeri impiegati per lo sviluppo dei film indispensabili per questo studio.

1.2.1 Acido polilattico (PLA)

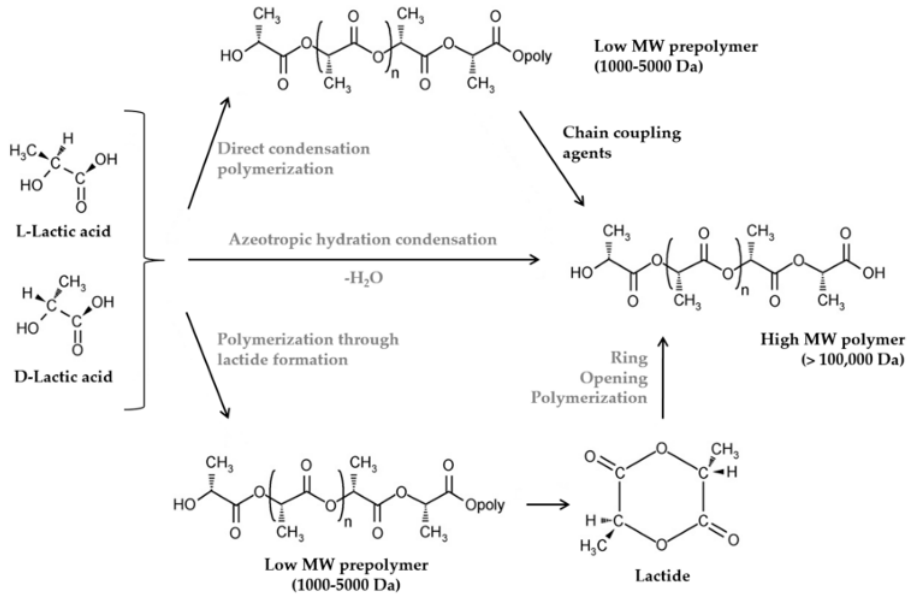


Fig. 2 – Reazioni di sintesi del PLA ad alto peso molecolare (molecola a destra) partendo dai due stero-monomeri lattici (molecole a sinistra) (Auras R. et al., 2004)

Il PLA è un poliestere alifatico rinnovabile ormai ben noto per le sue proprietà competitive rispetto ai consueti polimeri a base petrolio e la sua prima scoperta e caratterizzazione risale al 1932 per merito del chimico Carothers (T. Angelin Swetha et al., 2023). Il principale metodo di ottenimento del biopolimero è costituito dalla sintesi chimica a partire da risorse biologiche. Secondo J.R. Dorgan et al. (2000) i vantaggi associati alla produzione di PLA, rispetto ad altri biopolimeri, risiedono nel fatto che:

- il monomero lattidico è prodotto dall'acido lattico, ottenuto a sua volta dalla fermentazione (*Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus amylophilus, Lactobacillus leichmanii, Lactobacillus delbrueckii*) di matrici rinnovabili come granoturco, canna da zucchero e patate;
- il procedimento è meno energivoro, quindi garantisce una maggiore sostenibilità energetica;
- gode di un facile iter di smaltimento, riducendo, così, il volume delle discariche;
- può essere impiegato nella creazione di imballaggi compostabili ibridi carta-plastica o di altra formulazione, migliorandone le proprietà fisiche.

Inoltre, sulla base degli standard di garanzia emanati dalla Food and Drug Administration (FDA), il PLA è stato classificato come GRAS (Generally Recognised As Safe) ed è risultato sicuro per tutte le applicazioni come imballaggio alimentare (FDA, FDA/CFSAN/OPA: Agency Response Letter: GRAS Notice No. GRN 000065, 2001).

Rispetto ad altri biopolimeri, il PLA ha attirato maggiore attenzione nell'industria degli imballaggi perché la tecnologia esistente disponibile per le plastiche convenzionali può essere utilizzata per la sua lavorazione senza alcuna modifica (Kumari S.V.G. et al., 2022).

Nonostante gli ampi sforzi per migliorarne le proprietà utilizzando diverse tecniche, i materiali derivati dai biopolimeri spesso non possiedono le caratteristiche prestazionali delle plastiche tradizionali in termini di resistenza, flessibilità e proprietà di barriera. (Hojatoleslami M. et al., 2022).

A sostegno di quanto dichiarato Jeong, E.W. et al (2023) e Khan S. et al (2023) affermano che i principali svantaggi del PLA, soprattutto per le applicazioni di imballaggi alimentari flessibili, sono la sua fragilità e la temperatura di distorsione termica, nonché le sue scarse proprietà di barriera al vapore acqueo. Per giunta, quando si seleziona un polimero per un'applicazione specifica, è importante considerare la vulnerabilità all'invecchiamento da raggi ultravioletti.

Rispetto ad altre matrici polimeriche biodegradabili paragonabili, il PLA spesso presenta una cinetica di rilascio più lenta degli agenti attivi, che può prolungare l'efficacia antimicrobica e antiossidante durante la conservazione degli alimenti (Sakshi Jasrotia et al., 2026). In aggiunta, Jamshidian M. et al. (2013), considerando composti bioattivi idrofobici e sulla base di test mediante simulanti, affermano che maggiore è la polarità del mezzo minore è la velocità di rilascio. Oltre ciò, quest'ultima è fortemente limitata dal peso molecolare dei composti stessi.

1.2.2 Polibutilen succinato (PBS)

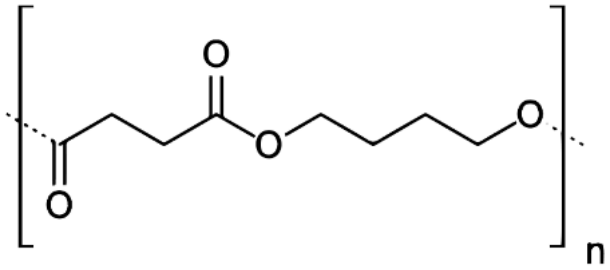


Fig. 3 – Struttura molecolare ripetitiva dei polimeri di PBS (Thurber H. and Curtzwiler W.G., 2020)

Il PBS è un poliestere alifatico semicristallino biocompatibile dotato di buone proprietà meccaniche ed un'eccellente processabilità termica che lo rendono un ottimo potenziale packaging per la conservazione degli alimenti, paragonabile ai convenzionali polimeri petrol-based. (N. Petchwattana et al., 2016). Inoltre, in accordo con il Biodegradable Products Institute, è stato listato come materiale compostabile e certificato per il contatto alimentare diretto. Il primo evento di sintesi risale agli anni '30 per merito del pioniere dei polimeri Wallace H. Carothers, ma i suoi primi utilizzi come imballaggio o coating nell'industria alimentare risalgono al 1993 (S. Ayu Rafigah et al., 2021).

Il PBS viene generalmente ottenuto da una reazione di policondensazione dell'acido succinico e dell'1,4-butandiolo, dove i monomeri possono essere ottenuti da risorse fossili o rinnovabili. Recenti studi, infatti, hanno identificato determinate specie di microrganismi in grado di produrre acido succinico, a partire da matrici zuccherine, mediante processo fermentativo e sono: *Anaerobiospirillum succiniciproducens, Actinobacillus succinogenes e Mannheimia succiniciproducens* (Nejib Kasmi et al., 2018). A seguire, il costituente appena ottenuto permette di ottenere l'1,4-butandiolo attraverso un processo di idrogenazione catalitica (Matteo Gigli et al., 2016).

Ricordando la sua destinazione d'uso e considerando la possibilità di essere incorporato con molecole bioattive, risulta ragionevole valutare la capacità di ritenzione di tali composti. Sukkaneewat et al. (2025) sostiene che il grado di cristallinità del polimero determina il trattenimento delle molecole e quindi influenzi la velocità di rilascio. Maggiore è la cristallinità maggiore sarà la ritenzione, viceversa per le porzioni di polimero più amorfe.

Analogamente al caso del PLA le molecole attive che possono essere incluse all'interno della matrice polimerica esercitano, in funzione della loro polarità e struttura, un'influenza sul tempo di rilascio di sé stesse nel mezzo.

1.2.3 Poli(3-idrossibutirrato-co-3-idrossiesanoato) (PHBH)

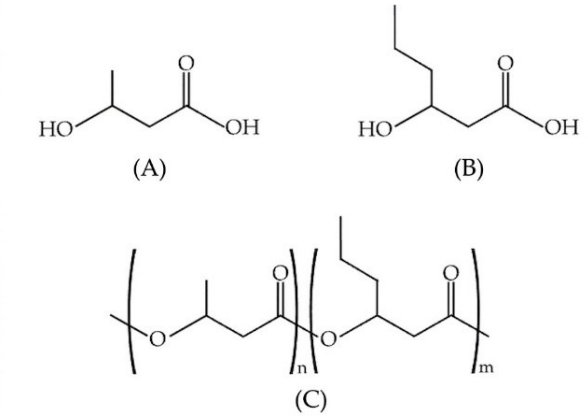


Fig. 4 – (A) Unità monomerica 3-idrossibutirrato; (B) unità monomerica 3-idrossiesanoato; (C) unità polimerica ripetuta in PHBH (Juan Ivorra-Martinez et al., 2020)

Il PHBH è un biopolimero appartenente alla famiglia dei poliidrossialcanoati (PHAs), prodotti attraverso fermentazione microbica di fonti di carbonio rinnovabili (Winnacker M., 2019). I poliidrossialcanoati sono poliesteri di origine biologica, biodegradabili e biocompatibili adattati a una vasta gamma di applicazioni applicazioni legate ad alimenti, cosmetici, somministrazione di farmaci e salute umana (G. Fernandez-Bunster and P. Pavez, 2022; Kerim Eraslan et al., 2022). *Rhodospirillum rubrum* è stato il primo microrganismo identificato, nel 1989, in grado di produrre PHBH in presenza di butirrato o esanoato come unica fonte di carbonio (Sängerlaub S. et al., 2019). Le unità monomeriche costituenti il PHBH sono il 3-idrossibutirrato e il 3-idrossiesanoato che differiscono per dimensioni e caratteristiche; pertanto, la loro combinazione conferisce al polimero risultante il miglior compromesso di proprietà (Y.M. Corre et al., 2012).

Approfondendo questa tematica il PHBH è dotato di buone proprietà barriera, ottima stabilità termica e ottime prestazioni meccaniche che hanno rivelato un margine di lavorazione più ampio con una degradazione termica minimizzata (R. Turco et al., 2021). Inoltre, sulla base di quanto sostenuto da Philip S. et al. (2007), il biopolimero mostra un'elevata resistenza chimica agli oli vegetali, grassi alimentari ed alcoli a catena corta, giustificandone l'impiego nel settore del food packaging.

1.2.4 Polivinil alcol (PVA)

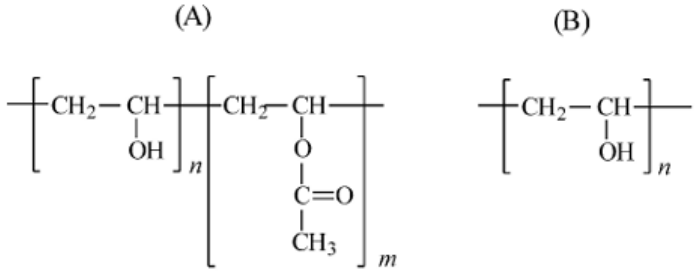


Fig. 5 – (A) Struttura molecolare del PVA parzialmente idrolizzata; (B) struttura molecolare del PVA completamente idrolizzata (C.C. DeMerlis, D.R. Schoneker, 2003)

L'alcol polivinilico (PVA) è un polimero di sintesi che gode di ottime proprietà biocompatibili. Fu ottenuto per la prima volta nel 1924 per merito dei chimici Hermann e Haehnel che a partire dal monomero stabile e non tossico acetato di vinile, in solvente alcolico e base forte catalizzante, sono riusciti ad ottenere questo importante polimero idrosolubile (Nagarkar & Patel, 2019).

Al fine di essere impiegato come packaging/coating in ambito alimentare, diversi studi hanno rivelato che il poli-vinil alcol possiede accettabili proprietà meccaniche, termiche e di processabilità, anche se non sono sufficienti per impiegarlo come imballaggio primario puro (Ishrat Gowsia et al., 2022). D'altro canto, però, Nagarkar & Patel (2019) e C.C. DeMerlis & D.R. Schoneker (2003) hanno valutato e riscontrato buone proprietà barriera ai gas e di resistenza/inerzia chimica.

Essendo un polimero fortemente idrofilo e rigonfiabile in ambienti acquosi, la velocità di rilascio di composti bioattivi o antimicrobici additivati è direttamente influenzata dalla polarità del simulante alimentare e dal grado di idrolisi del polimero stesso (Gavernet et al., 2021). Nei simulanti alimentari a base acquosa (ad alto valore di a_w), il PVA subisce un rapido

rigonfiamento (*swelling*) o una parziale dissoluzione della matrice polimerica, determinando una cinetica di rilascio dell'agente attivo molto veloce (*burst release*), efficace per un'azione antimicrobica immediata ma meno prolungata nel tempo rispetto a matrici poliesteriche alifatiche-aromatiche (S.C. de Oliveira et al., 2014).

In linea con le valutazioni di sicurezza, l'alcol polivinilico è stato approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) e dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) per l'impiego in rivestimenti ed imballaggi a contatto con alimenti, ed è ampiamente riconosciuto come polimero biocompatibile, non tossico e biodegradabile in specifici ambienti acquatici grazie all'azione di enzimi microbici (C.C. DeMerlis & D.R. Schoneker, 2003; Baker et al., 2012).

1.3 Additivi

Le matrici biopolimeriche presentano spesso limitazioni applicative, quali un'eccessiva rigidità, scarsa flessibilità meccanica e difficoltà nel disperdere uniformemente sostanze idrofobiche. Per superare tali svantaggi e sviluppare imballaggi che considerino anche il prolungamento della shelf life degli alimenti confezionati, risulta cruciale l'integrazione di opportuni additivi chimico-fisici funzionali (Dissanayake T. et al., 2026). Per garantire il mantenimento del principio biobased degli imballaggi e della food safety degli stessi, sarebbe opportuno impiegare degli additivi di origine per quanto più possibile naturale, eco-friendly e biosostenibile.

Gli additivi, generalmente, impiegati per la loro efficacia sono:

- plastificanti (come glicerolo, sorbitolo, polietilenglicole, olio di soia epossidato), necessari per incrementare il volume libero intercatena e migliorare la lavorabilità del materiale (Atarés & Chiralt, 2016);
- agenti rinforzanti (come nanocellulosa), che svolgono un ruolo cruciale nel migliorare la resistenza meccanica, la stabilità termica e secondariamente le proprietà di barriera degli imballaggi filmogeni (Picot-Allain and Emmambux, 2023);
- antiossidanti (come polifenoli, flavonoidi, tocoferoli), sostanze in grado sia di ritardare l'ossidazione lipidica degli alimenti sia di proteggere gli stessi biopolimeri dalla degradazione ossidativa che può intervenire durante la produzione e nel ciclo di vita (Rodríguez-Roque et al., 2021; Dintcheva N.T., D'Anna F., 2019);

- agenti antimicrobici (come composti fenolici, oli essenziali, nanometalli, peptidi), che intervengono direttamente sull'alimento preservandolo da possibili microrganismi patogeni e/o alteranti (Dissanayake T. et al., 2026);
- emulsionanti (come lecitine, polisorbati), che possono ridurre la tensione interfacciale e migliorare le proprietà filmogene dei packaging, stabilizzare "miscele" di formulazioni costituite da fasi immiscibili e omogeneizzare dispersioni di composti (es. molecole bioattive lipofile in matrici polimeriche prevalentemente idrofile/idrosolubili o di natura invertita) (Otoni et al., 2014).

1.3.1 Polisorbato 80 (Tween 80)

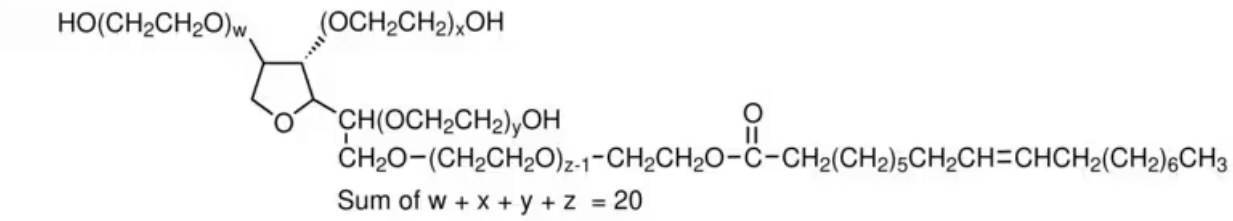


Fig. 6 – Struttura chimica completa del tensioattivo Tween 80 (Gaëlle Andreatta et al., 2007)

Il poliossietilene sorbitano monooleato (Tween 80) è un tensioattivo non-ionico utilizzato generalmente in ambito food packaging come plasticizzante (Ewa Olewnik-Kruszkowska et al., 2025). Questo suo impiego è garantito dal riconoscimento da parte della Food and Drug Administration (FDA) e secondo il Regolamento (CE) N. 1333/2008 del Parlamento Europeo e del Consiglio, come sostanza non tossica e idonea al contatto alimentare. Da un punto di vista chimico, Gemili S. et al. (2009) sostengono che la porzione idrofila della molecola tensioattiva possiede una certa affinità a legare acqua (solvente per PVA), mentre le restanti porzioni idrofobe della struttura sarebbero in grado di esplicare una buona funzione barriera al vapor d'acqua (Gemili, S. et al., 2009). In merito a tali caratteristiche molecolari si aggiungono le osservazioni di Luo K. et al. (2023) e Luo K. et al. (2019) secondo cui il Tween 80 risulta un ottimo stabilizzatore sterico capace di regolare efficacemente la nucleazione omogenea separandola dalla crescita delle particelle durante la reazione di autoassemblaggio di biopolimeri, che risulteranno ben disperse. Il polisorbato 80 possiede un ulteriore interessante ruolo, utile per tale sperimentazione, ovvero quello di favorire la dispersione di molecole bioattive lipidiche o

idrofobiche incluse nella matrice biopolimerica (Jonas Hilbig et al., 2016) e di regolare il loro rilascio nel tempo (Kehong Hou et al., 2021).

1.4 Active packaging

L'industria alimentare contemporanea si trova ad affrontare la complessa sfida di estendere la *shelf-life* dei prodotti e garantirne la sicurezza igienico-sanitaria, rispondendo al contempo alla crescente domanda dei consumatori per alimenti "freschi", minimamente processati e privi di conservanti o additivi aggiunti nella formulazione (Realini & Marcos, 2014). In questo scenario, le tecnologie di confezionamento hanno subìto una profonda evoluzione concettuale e tecnologica, superando la tradizionale funzione di barriera inerte e divenendo protagonista attraverso l'incorporazione di composti attivi (E. Maurizzi et al., 2022).

Si è così affermato il paradigma dell'active packaging, definito dalla letteratura scientifica e dalle normative europee, come un sistema in cui il materiale di confezionamento, l'ambiente interno (spazio di testa) e l'alimento interagiscono in modo deliberato e controllato, garantendo le migliori condizioni di conservazione al fine di prolungare la durabilità del prodotto e mantenere inalterate le qualità sensoriali e nutrizionali (Yildirim et al., 2018). L'introduzione di materiali attivi sul mercato europeo è strettamente regolamentata per garantire la sicurezza del consumatore. Il Regolamento (CE) N. 450/2009 stabilisce requisiti specifici per i materiali attivi e intelligenti destinati al contatto con gli alimenti, integrando il regolamento quadro (CE) N. 1935/2004. Un principio normativo fondamentale è che l'azione del packaging attivo non deve mai mascherare il deterioramento dell'alimento (fuorviando così il consumatore sulla sua reale freschezza) e che le sostanze rilasciate devono essere autorizzate come additivi alimentari, rispettando i limiti di migrazione globale e specifica (Dainelli et al., 2008).

Dal punto di vista dei meccanismi di azione, le modalità di intervento si classificano in due gruppi fondamentali:

1. sistemi di assorbimento (*scavengers* o *absorbers*): progettati per rimuovere dall'interno della confezione sostanze indesiderate che accelerano il decadimento dell'alimento, come l'ossigeno residuo, l'etilene, l'umidità in eccesso o molecole responsabili di off-flavors;

2. sistemi a rilascio (*emitters* o *releasers*): ingegnerizzati per veicolare in modo controllato, molecole bioattive dalla matrice polimerica verso la superficie dell'alimento o lo spazio di testa (Gómez-Estaca et al., 2014).

Un errore comune nella letteratura è assumere che l'efficacia antimicrobica dimostrata *in vitro* su terreni di coltura si replichi identicamente sul cibo reale. In realtà, la complessa composizione chimico-fisica degli alimenti gioca un ruolo determinante. In matrici ricche di lipidi e proteine o strutturate come emulsioni (ad esempio, i prodotti caseari), i composti bioattivi, spesso lipofili, tendono a ripartirsi e legarsi alla frazione grassa. Questo fenomeno può ridurre la loro concentrazione e disponibilità nella fase acquosa dell'alimento, che è proprio il sito in cui proliferano tipicamente lieviti e batteri (Hyldgaard et al., 2012).

Allo stesso modo è fondamentale ribadire che nei sistemi di imballaggio attivo, l'efficacia dell'inibizione risulta strettamente condizionata dalla tipologia di materiale, di matrice polimerica utilizzata che interviene, sempre, sulle fenomenologie di migrazione e sulla cinetica di rilascio del principio attivo verso la superficie dell'alimento o la fase acquosa del terreno (Suppakul et al., 2003).

1.4.1 Molecole antimicrobiche

In ambito sperimentale, l'attenzione della ricerca si sta concentrando fortemente sulla funzionalizzazione di film polimerici con agenti antimicrobici. L'obiettivo primario di tali molecole è migrare in modo controllato dalla matrice polimerica verso la superficie dell'alimento, rallentando, o meglio, inibendo la proliferazione di microrganismi patogeni e alteranti su un alimento confezionato (Appendini & Hotchkiss, 2002).

L'attuale panorama scientifico offre un ampio ventaglio di sostanze bioattive, prevalentemente di origine naturale, classificabili in base alla loro struttura chimica e al meccanismo d'azione.

Tra i composti più ampiamente studiati figurano gli oli essenziali (Essential Oils - EOs) e i loro costituenti fenolici e terpenici puri. Quasi il 90% di tutti gli oli essenziali è composto da monoterpeni. Le molecole maggiormente discusse e testate dai gruppi di ricerca a livello mondiale sono l'eugenolo (estratto dai chiodi di garofano), il timolo e il carvacrolo (presenti in timo e origano) (M. Angane et al., 2022). Gli oli essenziali possono interagire con la parete e la membrana cellulare dei microrganismi, alterandone l'integrità e la permeabilità, inibire i

processi enzimatici e compromettere la sintesi di proteine e acidi nucleici, portando a morte (Hyldgaard et al., 2012). L'incorporazione di oli essenziali può modificare, inoltre, le proprietà meccaniche, strutturali e antiossidanti dei film (Sharma S. et al., 2021).

Un'altra classe di elevato interesse tecnologico è costituita dagli acidi grassi a catena media (MCFAs). Tra i più importanti si riconoscono acido laurico e il suo monoestere monolaurina (derivati dal cocco); in secondo piano si ritrovano acido caproico ($C_6H_{12}O_2$), acido caprilico ($C_8H_{16}O_2$) e acido caprico ($C_{10}H_{20}O_2$) (derivati da latte bovino) (H.B. Jadhav & U.S. Annapure, 2023). Tali composti lipofili esercitano un'efficace azione antibatterica e antimicotica grazie alla capacità di interagire e disgregare le strutture lipidiche delle membrane e interferendo con i processi metabolici cellulari (Desbois & Smith, 2010). A questi si affiancano i sali organici di grado alimentare (es. potassio sorbato e sodio benzoato), impiegati tradizionalmente per il controllo mirato di lieviti e muffe in matrici ad alta attività dell'acqua (a_w) (Appendini & Hotchkiss, 2002).

Infine, crescente attenzione è stata rivolta alle batteriocine che sono molecole proteiche dotate di capacità antimicrobica, derivanti dal metabolismo di altri microrganismi (batteri lattici). Molecola per eccellenza è la nisina, prodotta da una precisa specie di lattococchi e attiva primariamente contro batteri Gram-positivi (Sarkhel, 2025).

1.4.1.1 Acido laurico

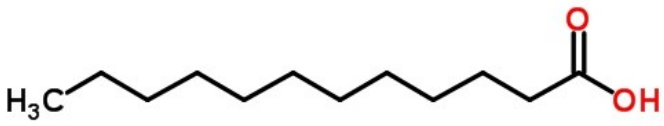


Fig. 7 – struttura chimica della molecola acido laurico (oleosessnsiais.org)

L' acido laurico consiste in un acido grasso (C12:0) saturo a media catena, dotato di un basso punto di fusione (40°C c.a.), insolubile in acqua e si presenta come una massa solida bianco-giallastra. La principale fonte naturale di estrazione di questa molecola è rappresentata dall'olio di cocco, ricavata dai frutti della pianta di cocco fresco (*Cocos Nucifera*). Noto per essere impiegato come ingrediente alimentare, viste le sue molteplici attività biologiche e come ingrediente per prodotti di cosmesi, è stato valutato e selezionato, anche, per la sua attività antibatterica, antifungina e antivirale. È stato riscontrato che la forma monogliceridica

dell'acido laurico (monolaurina) risulta essere la vera molecola attiva dell'attività antimicrobica (Olaide Olawunmi Ajibola, 2026). La si ottiene mediante esterificazione a caldo (150°C) con glicerina e in presenza di catalizzatore.

Fatty acids	Percentage [%]
Saturated:	
Lauric acid (C12:0)	45–52
Myristic acid (C14:0)	16–21
Palmitic acid (C16:0)	7–10
Caprylic acid(C8:0)	5–10
Capric acid (C10:0)	4–8
Stearic acid (C18:0)	2–4
Caproic acid	0.5–1
Palmitoleic acid	In traces
Unsaturated:	
Oleic acid (C18:1)	5–8
Linoleic acid (C18:2)	1–3
Linolenic acid (C18:3)	Up to 0.2

Tab. 1 – Contenuto in acidi grassi dell'olio di cocco vergine (VCO) (Nitbani et al., 2022)

Per conoscere come la molecola di acido laurico venga ricavata dalla eterogenea miscela di acidi grassi che costituiscono l'olio di cocco vergine, è opportuno avere un'idea del procedimento di estrazione: a partire dalla macinazione della polpa fresca, si procede con uno step di pressatura su setaccio, per ritenere la porzione fibrosa e ricavare il cosiddetto "latte di cocco" (emulsione bianca di olio in acqua). A questo punto si lascia fermentare il permeato per 48h in condizioni anaerobiche in ambiente fresco e asciutto, ottenendo, così, una fase acquosa, una lipidica ed una proteica. Allontanando la fase lipidica contenente l'olio, si prosegue riscaldando la stessa, in maniera da eliminare l'umidità residua e filtrando ulteriormente. Infine, sulla base delle differenti temperature di congelamento dell'acido laurico rispetto al resto della soluzione lipidica è possibile separare il composto attivo di interesse (Abbas Abel Anzaku et al. 2017).

Le proprietà antimicrobiche che risiedono nella molecola di acido laurico sono state testate e verificate sperimentalmente contro ceppi patogeni standard quali *S. aureus*, *B. cereus* (Gram-positivi) e S. *enterica serovar Thypimurium* ed *E. coli* (Gram-negativi). Nello studio di Febri Odel Nitbani et al. (2016) è stata effettuata una Disk Diffusion modificata, dove i campioni costituiti

da acido laurico (5% - 10% - 15% - 20%), solubilizzato in n-esano, hanno riscontrato inibizione nei confronti di tutti i ceppi considerati, anche alla minima concentrazione della molecola attiva.

Il meccanismo di azione antimicrobica è ancor oggi sconosciuto, ma da osservazioni eseguite al microscopio elettronico (caso specifico del *Clostridium perfrigens*) è stato possibile osservare come la molecola occorra a disgregare la membrana cellulare e a compromettere il sistema citoplasmatico (Skrivanova et al., 2005).

Pensando di valutare la possibilità di includere la molecola attiva all'interno di un packaging alimentare, al fine di preservare il prodotto confezionato; Raluca Nicoleta Darie-Nită et al. (2023) hanno testato l'efficienza antimicrobica dell'olio di cocco in combinazione con il bio-polimero PLA (poly-lactic acid). Considerando i ceppi patogeni *S. aureus* ed *E. coli*, avendo utilizzato il metodo Disk Diffusion e preparato una soluzione campione al 3% (v/v) di olio di cocco, sono riusciti a riscontrare un buon alone inibitorio, indice di funzionalità nel rilascio del principio attivo da parte del materiale.

1.4.1.2 Eugenolo

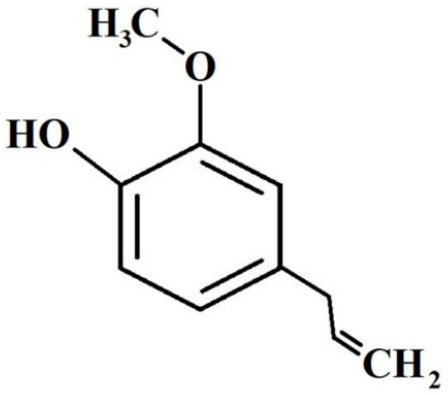


Fig. 8 – Struttura chimica della molecola aromatica Eugenolo (Magdalena Ulanowska and Beata Olas, 2021)

L'eugenolo ($C_{10}H_{12}O_2$) si presenta come un liquido limpido incolore o giallo, oleoso, dall'odore speziato. È un composto aromatico fenolico di origine naturale, insolubile in acqua, ma molto bene in solventi organici, volatile e dotata di una certa instabilità all'ossidazione e alle interazioni con altre specie chimiche (Magdalena Ulanowska and Beata Olas, 2021). La molecola, già, ampiamente impiegata nel settore cosmetico, farmacologico e medico per le

sue numerose proprietà bioattive, come quelle antiossidante, antimutagena, antiaggregante, antiallergica, antiedema e antinfiammatorie (Magdalena Ulanowska & Beata Olas, 2021), è stata anche riconosciuta, in accordo con Sharifzadeh A. et al. (2021), come molecola dotata di una buona attività antimicrobica ad ampio spettro, soprattutto nei confronti di batteri e funghi.

Le fonti di isolamento di eugenolo risiedono in una vasta varietà di piante appartenenti alla famiglia delle *Lamiaceae* (tulsi), *Lauraceae* (cannella), *Myrtaceae* e *Myristicaceae* (noce moscata), dalle quali si utilizzano diverse porzioni delle piante stesse come foglie, corteccia, fiori, frutti, boccioli. La principale fonte, però, è costituita dalla pianta del chiodo di garofano (*Syzygium aromaticum*, anche nota come *Eugenia caryophyllata*), nella quale risiede dal 45 al 90% della molecola attiva, prevalentemente nei fiori non ancora sbocciati.

Le due tecniche di estrazione più utilizzate sono: 1. distillazione in corrente di vapore, associata ad una separazione cromatografica liquida ad alta pressione (HPLC); 2. estrazione con solvente, selezionato in funzione della migliore affinità chimica, mediante estrattore Soxlhet, seguito da una fase di concentrazione in Rotavapor.

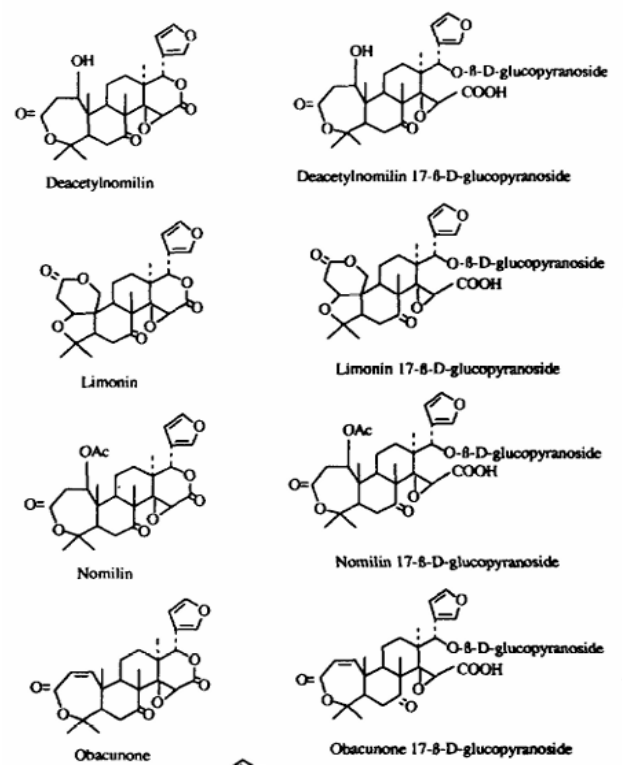
L'azione antimicrobica che rende l'eugenolo efficace contro le popolazioni batteriche sia di gram+ (*Enterococcus spp., Staphylococcus spp., Streptococcus., Listeria monocytogenes, Bacillus spp.*) sia di gram- (*E. coli, Proteus vulgaris, Salmonella spp., Pseudomonas spp., Helicobacter pylori, Yersinia enterocolitica*) è da ricondurre alla sua capacità di interagire con le componenti lipidiche delle membrane cellulari con conseguente lisi della stessa (Anees Ahmed Khalil et al., 2017). Per lo stesso principio risulta essere efficace anche contro il genere fungino, come nei confronti di *Penicillium spp., Aspergillus spp., Candida spp.*, intervenendo ulteriormente sul trasporto di ioni e ATP al di fuori della cellula e favorendo la produzione di ROS (Reactive Oxygen Species) (Jainabh Kerosenewala et al., 2022). Inoltre, grazie alla presenza del gruppo ossidrilico riesce ad interagire e ad alterare la funzionalità di enzimi quali: ATPasi, istidina decarbossilasi, amilasi e proteasi (Thoroski, 1989; Wendakoon e Morihiko, 1995).

Sulla base delle ricerche condotte in letteratura è stato possibile affermare che l'eugenolo è potenzialmente adatto all'incorporazione nei polimeri, permettendogli di esplicare un rilascio controllato a lunga durata che può aiutare ad aumentare la shelf-life di prodotti alimentari. In particolare, la presenza dell'anello aromatico e del gruppo allilico garantisce stabilità e

resistenza ai fattori che favoriscono la colonizzazione microbica sulla superficie del prodotto (Jainabh Kerosenewala et al., 2022).

Come dimostrato da Xueying Huang et al. (2022), mediante disk diffusion test, l'inclusione di eugenolo nell'ordine del 5% e 10% all'interno di film polimerici a base di PLA (poly-lactic acid), PEG (poly-ethilene glicol) e zeina esplicherebbe un ottimo effetto inibitorio nei confronti di E. coli ed invece, un moderato effetto su *S. aureus*. Inoltre, sulla base di test di migrazione è stato possibile osservare come l'eugenolo dal film polimerico migri più velocemente verso il simulante di origine lipidica etanolo 50% v/v). Questo comportamento è da attribuire alla maggiore affinità che vi è tra la molecola attiva e la natura del simulante, rispetto a quanto accadrebbe avendo un simulante di natura idrofila (Xueying Huang et al., 2022).

1.4.1.3 Estratto di semi di pompelmo (Grapefruit Seed Extract - GSE)



Number	Formula	Compound Identification	Class
1	$C_7H_6O_5$	Gallic acid	Phenolic acid
2	$C_{30}H_{26}O_{12}$	Procyanidin B_3	Proanthocyanidin
3	$C_{30}H_{26}O_{12}$	Procyanidin B_1	Proanthocyanidin
4	$C_{15}H_{14}O_6$	(+)-catechin	Flavonanol
5	$C_{30}H_{26}O_{12}$	Procyanidin B_4	Proanthocyanidin
6	$C_{15}H_{14}O_6$	(epi)catechin	Flavanol
7	$C_{45}H_{38}O_{18}$	Procyanidin C_1	Proanthocyanidin
8	$C_{30}H_{26}O_{12}$	Procyanidin B_2	Proanthocyanidin
9	$C_{37}H_{30}O_{16}$	Gallate dimer	Proanthocyanidin
10	$C_{30}H_{26}O_{12}$	Procyanidin B_5	Proanthocyanidin
11	$C_{14}H_{12}O_3$	Resveratrol	Stilbene

Fig. 9 – Strutture molecolari dei principali costituenti limonoidi in GSE (Hideaki Ohta et al., 1993)

Tab. 2 – Tabella riassuntiva delle principali proantocianidine identificate in GSE (ChemicalBook.com)

Si tratta di una matrice lipidica di origine vegetale ricavata dai semi dei frutti della pianta di pompelmo *Citrus paradisi*. In linea generale, l'alimento è considerato una ricca fonte, principalmente, di limonoidi, proantocianidine e flavonoidi (naringenina), ma anche di

polifenoli, tocoferoli, fitosteroli, carotenoidi, acidi organici (acido ascorbico) e altri oligoelementi che conferiscono allo stesso le notevoli caratteristiche antimicrobiche e antiossidanti (Swarup Roy et al., 2023; Long-Feng Wang et al., 2016). La composizione di questo olio vede come costituenti bioattivi secondari più comuni gli acidi grassi palmitico (*C 16:0*), stearico (*C 18:0*), oleico (*C 18:1*) e linoleico (*C 18:2*). A conferma di ciò, i sottoprodotti di tale frutto (principalmente buccia e semi), in funzione delle loro proprietà, costituiscono delle ottime materie prime per la produzione di cosmetici, integratori alimentari, biodiesel e packaging attivi (Anwar et al., 2008).

Trattandosi anche in questo caso di una soluzione di natura lipidica il metodo tradizionale e comunemente applicato per estrarre il "siero" dai semi di pompelmo consiste in una estrazione Soxlhet con solvente (generalmente etanolo o esano), seguita da una fase di allontanamento di quest'ultimo mediante evaporazione, terminando con vari step di separazione per purificare l'estratto (Umer Rashid et al., 2013).

Le modalità d'azione antimicrobica da parte delle molecole costituenti il GSE sono ancora oggi sconosciute, ma molto discusse in letteratura. Secondo Aloui et al. (2014) la capacità antimicrobica del GSE è da attribuire ai composti fenolici come catechina, epicatechina, epicatechina-3-O-gallato, procianidine dimeriche, trimeriche e tetrameriche. Terry Kim et al. (2021) considera attivi i prodotti di riorganizzazione e stabilizzazione dei polifenoli, derivanti dal processo di produzione del GSE, quali cloruro di benzetonio e il cloruro di benzalconio. Analogamente Markus Ganzera et al. (2006) hanno concluso, sulla base di un'analisi GC ad ampio spettro, che le molecole aventi capacità antimicrobica fossero per la maggior derivati dell'acido benzoico o 4-OH acido benzoico e ammine quaternarie, come il cloruro di benzetonio e il cloruro di benzalconio. Per quanto concerne la modalità di azione delle molecole bioattive di GSE nei confronti dei microrganismi Kanmani P. et al. (2014) e Roy S. et al. (2021) hanno esposto, sulla base dei loro studi, che combinazioni di polifenoli, come naringina e limonina, siano in grado di penetrare le membrane cellulari e di interagire con le proteine, inibendole, impedendo, così, la crescita e la sopravvivenza cellulare.

Considerando sempre come obiettivo centrale la volontà di ottenere dei packaging attivi, al fine di preservare più a lungo possibile la conservabilità degli alimenti, Swarup Roy et al. (2021) hanno testato l'attività antibatterica nei confronti di *L. monocytogenes* ed *E. coli* utilizzando film polimerici di PVOH al 5% (pt) di GSE. I risultati hanno dimostrato una forte capacità

battericida verso il batterio gram-positivo, rispetto alla ottima capacità batteriostatica verso il batterio gram-negativo. Spostandosi verso l'impiego di un biopolimero come PLA, Long-Feng Wang et al. (2016) hanno dimostrato come un coating attivo al ~3,6% (pt) di GSE potesse andare a bloccare la crescita microbica di una popolazione di *E. coli*, esplicando quindi una buona attività batteriostatica. Un altro articolo (A. Oun et al., 2019) ha riportato un'efficace attività antibatterica per film di imballaggio a base di carbossimetilcellulosa con aggiunta del 5% (pt) di GSE. L'esito delle prove ha mostrato un totale azzeramento della crescita di *L. monocytogenes* ed *E. coli*.

Tan et al. (2015) hanno, anche, valutato l'attività antifungina di una pellicola a base di chitosano includendo diverse concentrazioni di GSE. Le osservazioni sull'alimento (prodotto da forno) a fine esperimento hanno evidenziato che la pellicola all'1,5% (v/v) di molecola bioattiva era in grado di ritardare la crescita di muffe di circa dieci giorni rispetto al controllo. Una valutazione più approfondita è stata condotta da Pankaj Jha (2020) che ha testato l'attività antifungina del GSE contro l'*Aspergillus niger* impiegando pellicole a base di chitosano nanoparticellare e amido di mais. La pellicola risultata più funzionale è stata quella con addizione dell'1,5% di GSE, capace di ritardare lo sviluppo del fungo fino a quasi tre settimane. Inoltre, la medesima ricerca sostiene che l'attività sia dovuta alla presenza del gruppo $-NH_2$, $C=O$ e dei composti aromatici/fenolici di GSE durante l'interazione con i funghi.

1.4.1.4 Ossido di zinco (ZnO)

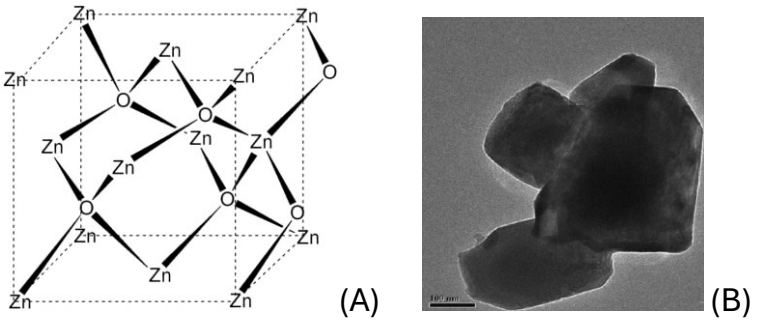


Fig. 10 – (A) Rappresentazione dell'organizzazione spaziale dell'ossido di zinco nanoparticellare (chimichiamo.org) e (B) sua osservazione al microspcopio elettronico (Guy Applerot et al., 2009)

L'ossido di zinco è una specie chimica inorganica, altamente reattiva e versatile con un'ampia gamma di applicazioni. Sono economiche, funzionali e regolabili, il che le rende particolarmente importanti tra le nanoparticelle metalliche, trovando impiego in numerosi

settori, come industria della gomma e delle infrastrutture, tessile, biomedicina, farmacologia, biosensori, cosmetica, gestione delle acque reflue, agricoltura, industria alimentare (Xian-Qing Zhou et al., 2023)

Le nanoparticelle di ZnO possono essere sintetizzate attraverso metodi fisici, chimici o biologici. I primi due permettono di ottenere particelle di dimensioni uniformi ad elevata purezza, basandosi però sull'utilizzo di reagenti tossici e di abbondante energia. In alternativa, recentemente, stanno vedendo diffondersi metodi più sostenibili ed ecocompatibili che impiegano matrici vegetali o microbiche come composti di reazione e prevedono un consumo energetico nettamente inferiore (Suddhasattya Dey et al., 2025).

Tornando ai campi di applicazione di queste nanoparticelle, proprio nel settore alimentare si è mossa una notevole curiosità da parte dei ricercatori, soprattutto per la loro efficace capacità antimicrobica. L'attività in questione è dovuta sostanzialmente a tre meccanismi:

1. Interazione diretta con la membrana cellulare.
   Esaminando la morfologia cellulare e l'integrità della membrana in *C. jejuni* Yanping Xie et al. (2011) hanno scoperto un drastico cambiamento nella morfologia microbica. Le cellule trattate con ZnO hanno subito una modificazione di forma, passando da spiraliformi a cocciche, risultando non colturabili in brodo. Inoltre, le nanoparticelle attive hanno determinato la formazione di superfici cellulari irregolari e la formazione di vescicole sulla membrana, nonché un aumento della permeabilità della stessa. Questa perdita di organizzazione di membrana è stata costantemente osservata anche nelle sperimentazioni su *E. coli O157:H7* da parte di Liu Y. et al. (2009). A supporto di tale studio, nel lavoro di Brayner R. et al. (2006) le nanoparticelle di ZnO hanno mostrato un'attività battericida, nei confronti dello stesso microrganismo, per via di un'interazione diretta (adsorbimento e adesione) capace di alterare l'integrità della parete cellulare, compromettendo la vitalità del patogeno.
2. Produzione di ROS (reactive oxygen species).
   Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) possono danneggiare le proteine, alterare le membrane cellulari e modificare il DNA dei batteri, causando potenzialmente la morte cellulare. I radicali idrossilici ($\cdot OH$) e superossidi ($\cdot O_2$-) sono in grado di provocare danni per contatto diretto, in quanto incapaci di penetrare la parete cellulare batterica, carica negativamente. Al contrario, il perossido di idrogeno (H_2O_2) è in grado di attraversare la

parete cellulare e a seguito di internalizzazione, portare alla morte microbica (Bruna Lallo da Silva et al., 2019). Poiché il principio generale è quello dello stress ossidativo, tale meccanismo risulta molto efficace sia contro i batteri Gram-positivi che contro quelli Gram-negativi (Suddhasattya Dey et al., 2025).

Lipovsky A. et al. (2011) hanno studiato l'attività antifungina delle nanoparticelle di ZnO mediata da ROS contro *Candida albicans*, suggerendo che tali specie reattive acquisiscono maggiore efficacia in mezzi acquosi e in presenza di luce VIS.

3. Rilascio di ioni Zn^{2+}.

   Un ulteriore modalità di azione antimicrobica delle nanoparticelle può essere, in maniera marginale, connessa alla presenza della specie ionica Zn^{2+}. Tali ioni derivano dalla parziale solubilizzazione dell'ossido di zinco o dei suoi sali in mezzo tendenzialmente acquoso e grazie agli studi di Julia Pasquet et al. (2015) è stato possibile osservare un'ottima attività microbicida contro vari ceppi di batteri e funghi.

   Più nel dettaglio, è stato dimostrato che gli ioni Zn^{2+} si legano alla parete cellulare batterica (*E. coli*) carica negativamente e penetrando all'interno della stessa, ne provocano la rottura causando morte cellulare (Jan Borovansky and Patrick A. Riley, 1989). Questi ioni, inoltre, avendo la capacità di raggiungere il DNA, possono causare danni nucleari come danni cromosomici irreversibili, che inducono la morte nel microrganismo (Shoeb M. et al., 2013).

Anjani P. et al. (2016) hanno recentemente sintetizzato nanoparticelle di ossido di zinco per via sonochimica e incorporate e stabilizzate nel biopolimero poli-vinil alcol. D'altro canto, però, hanno riscontrato che il polimero ha avuto un'influenza negativa sulle proprietà antibatteriche dello ZnO, agendo in una certa misura, come scavenger dei radicali idrossilici che generalmente si generano in grandi quantità.

Raghupathi et al. (2011) hanno studiato l'effetto della dimensione delle particelle di ZnO in termini di attività antibatterica. I risultati testati su *S. aureus* hanno mostrato che la vitalità cellulare diminuiva significativamente con la diminuzione della dimensione diametrale delle particelle. Con dimensioni dell'ordine delle centinaia di nanometri sono stati in grado di ottenere un'inibizione incompleta, quindi, una funzione batteriostatica limitata; d'altra parte, dimensioni corrispondenti alle decine di nanometri non solo inibivano la crescita, ma possedevano la capacità di uccidere l'intera popolazione microbica.

A.M. Hezma et al. (2019) si sono occupati, invece, dello studio dell'attività antimicrobica e antifungina da parte del ZnO incluso in polimeri a base Chitosano/PVA. Le soluzioni composite utilizzate sono state sviluppate a concentrazioni crescenti di ossido di zinco e gli esperimenti hanno permesso di concludere che il migliore effetto si avesse con i film polimerici al 10% e 15% pt di ZnO. Sulla base del metodo di analisi del Disk Diffusion, tutte le specie testate, quali *S. aureus, E. coli, C. albigans* e *A. niger*, risultano essere medialmente inibite, a differenza del microrganismo gram-negativo (*E. coli*) che ha mostrato la sua maggiore suscettibilità dovuta alla biologia della parete.

Sempre in merito alla capacità inibitoria dell'ossido di zinco verso le specie fungine, Tazib Rahaman Syed et al. (2025) hanno osservato che l'incorporazione di nanoparticelle di ZnO al 3% v/v ha esplicato una discreta attività, ottenendo una riduzione logaritmica nei confronti di popolazioni di *A. flavus* e *P. commune*. Spingendosi verso una dose di ZnO incluso del 5% v/v, è stata osservata una migliore e quasi completa soppressione della crescita fungina tale da garantire una staticità di sviluppo.

N.P. Rybalchenko et al. (2025), al fine di verificare l'efficacia dell'attività antimicrobica dell'ossido di zinco, incorporato sempre in PVA, hanno voluto effettuare dei test con un sale dello stesso principio attivo, quale acetato di zinco ($Zn(OOCCH_3)_2$). Valutando le zone di inibizione in piastra attribuibili al film contenente l'1,0% pt di molecola attiva, è stato possibile osservare un'attività antimicrobica efficace contro i batteri Gram-positivi *S. aureus* e *S. epidermidis* e parzialmente contro *Escherichia coli*, ma non contro *Pseudomonas aeruginosa* (concentrazione iniziale 2x10^5 UFC).

Hai Zhang et al. (2017) si sono occupati di testare la capacità antimicrobica delle nanoparticelle di ossido di zinco, nei confronti di microrganismi target quali *S. aureus* ed *E. coli*, utilizzando il PLA come biopolimero di inclusione. Dalle prove è emerso che *E. coli* risulta essere molto più suscettibile a tutte le concentrazioni testate (0,5% pt – 1% pt – 3% pt) e che quindi la sostanza bioattiva esplica un'ottima attività battericida. Mentre verso *S. aureus* l'unica attività battericida la si raggiunge solo alla concentrazione di zinco più alta, addirittura con maggiore intensità inibente che nel caso precedente. Questo risultato è paragonabile a quelli riportati in altre antecedenti pubblicazioni come nel caso dello studio di C.T. Martins et al. (2013), dove un rivestimento a base di amido contenente l'1,37% pt di nanoparticelle di ZnO ha indotto un'intensa azione batteriostatica contro *S. aureus*. In un analogo studio, un carico di

nanoparticelle del 3% pt ha ottenuto una forte attività battericida contro lo stesso ceppo batterico (Murariu et al., 2011).

1.5 Test antimicrobici

La selezione e la caratterizzazione delle molecole bioattive rappresentano lo stadio preliminare per la progettazione di sistemi di active packaging. Per verificare l'attività delle molecole antimicrobiche sopra citate, in microbiologia si utilizzano numerose tecniche. In linea generale, queste consentono di caratterizzare lo spettro d'azione e l'intensità dei principi attivi nei confronti dei microrganismi target, distinguendo tra un'azione microbiostatica (arresto della proliferazione) e un'azione microbiocida (completo abbattimento della carica microbica) (Pinto et al., 2003).

Nel contesto specifico di questo studio, la validazione *in vitro* dell'efficacia inibitoria dei film attivi nei confronti dei lieviti alteranti isolati da robiola si è avvalsa delle metodiche microbiologiche standard. L'impiego combinato di saggi in fase liquida e su terreno solido consente infatti di scindere la valutazione della potenza intrinseca della molecola bioattiva dalle prestazioni del film finito (Balaguer M.P. et al., 2011). Tali tecniche consentono di determinare le concentrazioni minime efficaci, valutare la diffusione spaziale del principio attivo e confrontare le prestazioni delle diverse combinazioni polimero-antimicrobico. Di seguito vengono descritti i principali saggi applicati nel presente lavoro sperimentale.

1.5.1 Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

La concentrazione minima inibitoria è la concentrazione più bassa, espressa in mg/L (o µg/mL) alla quale un agente antimicrobico è in grado di bloccare la crescita batterica o fungina, riscontrabile tramite torbidità, dopo un determinato periodo di incubazione *in vitro*. Può valutare sia l'effetto batteriostatico che battericida di una molecola attraverso tecniche differenti di seguito elencate (CLSI M07, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; ISO 20776-1:2019, *Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices* - adottato da EUCAST).

Nei test MIC, solitamente, si utilizzano diluizioni seriali di una sostanza per individuare la concentrazione più bassa alla quale essa mantiene la sua efficacia antibatterica (Vivek Devidas Mahale & Sonali Sharma, 2024).

1.5.1.1 Disk Diffusion assay (DDa)

Il metodo di diffusione su disco rappresenta una delle tecniche di routine più consolidate e diffuse nei laboratori per i test di sensibilità antimicrobica (AST), in grado di fornire risultati qualitativi affidabili. Grazie ad un'elevata versatilità, semplicità operativa ed economicità, consente di valutare un'ampia gamma di agenti antimicrobici su diverse specie patogene e alteranti, batteriche e non, senza richiedere apparecchiature complesse.

Come definito a livello internazionale dal CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) e dall'EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), il principio si basa sulla diffusione radiale di una dose predefinita di antimicrobico da un disco di carta da 6 mm posizionato su piastra d'agar. Il gradiente di concentrazione che si genera inibisce la crescita microbica, determinando un'area libera da colonie (zona di inibizione). I diametri di tali zone vengono poi misurati tramite software di elaborazione di immagine ImageJ [v. 1.53a, National Institutes of Health, Bethesda, USA] (Schneider C. et al., 2012) e categorizzati in livelli di sensibilità secondo i breakpoint aggiornati da parte delle linee guida ufficiali (*Susceptible* [S], *Susceptible- increased exposure* [I], *Resistant* [R]). L'interpretazione manuale dei diametri comporta, però, un certo grado di errore e variabilità inter-osservatore. L'ampiezza dell'alone di inibizione, inoltre, è influenzata da diversi fattori fisici e biologici: la dinamica del principio antimicrobico (carico del disco, velocità di diffusione, attività specifica), le proprietà dell'agar (spessore, composizione), i parametri di incubazione (temperatura, durata, atmosfera) e le caratteristiche dell'inoculo (densità, velocità di crescita).

1.5.1.2 Minimal Bactericidal Concentration (MBC)

È la concentrazione più bassa di agente antimicrobico in grado di uccidere ≥99,9% (≥3log10 CFU/mL) dell'inoculo batterico originale in un lasso di tempo determinato. Si misura subcoltivando aliquote dei pozzi privi di crescita visibile (dal test della MIC) su terreno agarizzato privo di antibiotico (Pankey G. A. & Sabath L. D., 2004).

Come anche sostenuto da Rajashekaraiah KR et al. (1980), l'effettivo valore quantitativo in UFC/mL dell'inoculo finale deve essere determinato i giorni successivi il periodo di incubazione per poter calcolare la concentrazione che ha raggiunto il 99,9% di eliminazione. Il volume da subcolturare si basa sulla dimensione finale dell'inoculo e deve essere determinato quantitativamente.

Il metodo di diluizione in brodo considera la relazione tra il livello di crescita del microrganismo in esame nel mezzo liquido, brodo, e la concentrazione della sostanza attiva analizzata. Generalmente la valutazione dell'analisi viene effettuata con uno standard di riferimento biologico (caso clinico). L'esito risultante dalla relazione sopracitata è inteso come densità di torbidità causata dalla crescita microbica (Pinto et al., 2003). Il metodo fornisce risultati quantitativi e non è influenzato dal tenore di crescita dei microrganismi. Il suo svantaggio è la difficoltà nel rilevare la contaminazione durante l'analisi di materiali clinici. Come controllo positivo (C+) si utilizzano brodo e principio bioattivo, senza sospensione del microrganismo in esame, mentre come controllo negativo (C-) si utilizza il terreno di coltura con il solvente utilizzato per sciogliere il campione attivo (o altro generico solvente) e la sospensione microbica (Sahm & Washington, 1991). Si possono impiegare due metodologie:

- la **macrodiluizione** è un metodo laborioso poichè richiede molto tempo, un ampio spazio di lavoro e genera una grande quantità di rifiuti, quindi, generalmente, si tende ad utilizzare un numero limitato di repliche (Sahm & Washington, 1991; Zgoda & Porter, 2001). Esso prevede un test in eppendorf o provetta, con volumi di terreno di coltura che vanno da 1 a 10 mL. La macrodiluizione in brodo rappresenta la tecnica classica di riferimento (*gold standard* storico) per la determinazione della sensibilità batterica agli antimicrobici;
- il metodo di **microdiluizione** in brodo condivide con il metodo precedentemente menzionato lo stesso principio biologico per determinare la MIC. La differenza fondamentale risiede nella scala dei volumi impiegati e nel supporto fisico utilizzato, che ottimizza lo schema di lavoro. Tale metodo, inoltre, possiede il vantaggio di poter essere automatizzato, garantendo una risposta di analisi precisa e rapida. Il saggio in piastra microplate da 96 pozzetti (Costar-Corning Incorporated, Corning, NY, USA) rappresenta il metodo di riferimento per applicare una microdiluizione in brodo per determinare la MIC, come definito dagli standard CLSI, ISO 20776-1/EUCAST.

A causa dell'imprecisione dovuta alla variazione casuale del numero di microrganismi in un campione di piccolo volume, il volume della subcoltura dovrebbe essere sufficientemente grande da fornire un punto finale di almeno dieci colonie, ma non così grande da far sì che l'agente antimicrobico venga trasferito in una concentrazione tale da continuare ad inibire le cellule vitali (Taylor P.C. et al., 1983).

2 Scopo della tesi

Negli ultimi decenni, il settore del confezionamento alimentare (food packaging) ha vissuto un'importante evoluzione ed innovazione spinta dall' esigenza di ridurre lo spreco alimentare prolungando la shelf-life dei prodotti deperibili e dalla pressante richiesta di contenere l'impatto ambientale legato all'uso massivo delle plastiche tradizionali di origine fossile. In questo contesto, il packaging attivo e sostenibile si attesta come una delle strategie tecnologiche più promettenti. Le matrici polimeriche "green", idonee al contatto alimentare, sono in grado di interagire in modo dinamico con l'alimento o con lo spazio di testa della confezione, rilasciando gradualmente sostanze funzionali (come agenti antimicrobici o antiossidanti) per inibire i processi di degrado senza dover addizionare conservanti o altre sostanze preservanti direttamente nel prodotto.

Il presente lavoro di tesi si inserisce perfettamente in questo scenario di innovazione tecnologica applicata alla sicurezza e alla conservazione degli alimenti, ponendosi come obiettivo principale la progettazione e la formulazione di film polimerici attivi e sostenibili, studiati per contrastare lo sviluppo microbico alterativo e prolungare la shelf-life di prodotti lattiero-caseari freschi ad elevata deperibilità, con specifico riferimento alla robiola. La robiola, infatti, a causa dell'elevata attività dell'acqua e della composizione nutrizionale favorevole, è soggetta a fenomeni di deterioramento durante la conservazione, primariamente riconducibili alla proliferazione di lieviti in grado di provocare il rigonfiamento indesiderato delle confezioni. Nello specifico, la ricerca si è basata su un approccio metodologico progressivo, articolato in diverse fasi operative e sperimentali. In primo luogo, è stato necessario selezionare i microrganismi target, campionando le confezioni di robiola e identificando i ceppi di lievito dominanti responsabili delle alterazioni (denominati ceppi RB e SAB), da impiegare per i successivi saggi di attività antimicrobica. Si è proceduti, poi con la vera e propria formulazione e realizzazione di "pellicole" attive tramite la tecnica di solution casting, valutando differenti matrici biodegradabili e/o compostabili, quali acido polilattico (PLA), poli(3-idrossibutirrato-co-3-idrossiesanoato) (PHBH), polibutilene succinato (PBS) e alcol polivinilico (PVA). Indispensabile è stato l'ausilio del tensioattivo Tween 80 per favorire l'omogeneità e la struttura delle matrici e favorire la distribuzione e la stabilizzazione di diverse sostanze bioattive funzionali, naturali o inorganiche, impiegate come molecole antimicrobiche, quali eugenolo, acido laurico, estratto di semi di pompelmo (GSE) e ossido di

zinco (ZnO), incorporate con differenti dosaggi. Infine, per valutare l'efficacia inibitoria e delle dinamiche di rilascio dei principi attivi dalle matrici polimeriche nei confronti dei lieviti isolati, sono stati eseguiti *in vitro* dei saggi microbiologici quali il Disk Diffusion assay (DDa), la determinazione della Concentrazione Minima Inibente (MIC) e della Concentrazione Minima Battericida (fungicida) (MBC).

L'obiettivo finale di tale studio consiste, quindi, nell'individuare e dimostrare la fattibilità e l'efficacia tecnologica di combinazioni polimero-antimicrobico capaci di inibire la crescita dei lieviti alteranti nella robiola, ponendo le basi per lo sviluppo di imballaggi funzionali e sostenibili offrendo una soluzione innovativa per l'estensione della vita commerciale del prodotto senza alterarne la formulazione con additivi diretti.

3 Materiali e Metodi

3.1 Materiali

3.1.1Terreni di coltura

3.1.1.1 Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

Dal punto di vista microbiologico, il materiale più utilizzato per consentire la crescita microbica dei nostri isolati *in vitro* e che ha accompagnato tutta la sperimentazione è senz'altro il terreno di coltura Sabouraud, acquisito dalla fornitura italiana di Biolife. È stato storicamente utilizzato come mezzo di coltura standard per l'isolamento e l'identificazione dei funghi ed è tuttora ampiamente utilizzato. Nella sua formulazione, notevole apporto hanno il digestato peptico animale, che fornisce nutrienti azotati come amminoacidi, peptidi e il destrosio, che rappresenta la principale fonte di carbonio e di energia necessari al metabolismo microbico.

Di seguito sono riportate porzioni delle schede tecniche del terreno, che evidenziano le principali caratteristiche di composizione e destinazione d'uso.

1-DESTINAZIONE D'USO
Diagnostico *in vitro*. Terreno d'uso generale per l'isolamento e la coltivazione di lieviti e muffe, da campioni clinici e non clinici.

2 - COMPOSIZIONE
FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIOGLIMENTO IN ACQUA)*

Digerito pancreatico di caseina	5 g
Digerito peptico di carne	5 g
Glucosio	40 g
Agar	15 g

4 - METODO DI PREPARAZIONE
Sospendere 65 g di polvere in 1000 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione ed autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a circa 47-50°C, mescolare con cura e distribuire in piastre di Petri sterili.
Note:
Non eccedere nei tempi e nelle temperature di ebollizione e di sterilizzazione.
In alternativa distribuire in provette con tappo a vite prima della sterilizzazione e lasciare solidificare a becco di clarino.

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea, beige
Aspetto della soluzione ed in piastra	terreno limpido di colore giallo
pH finale a 25 °C	5,6 ± 0,2

Fig. 11 – Paragrafi descrittivi le caratteristiche e proprietà del terreno Sabouraud Dextrose Agar (Biolife Italiana s.r.l)

Per soddisfare i requisiti tecnici delle varie metodiche di analisi utilizzate, tale substrato non è stato impiegato solo nella sua forma solida, agarizzata, ma anche nella sua forma liquida, come brodo (**Sabouraud Broth**). Tutte le caratteristiche compositive, selettive e di preparazione di questa versione risultano le medesime del terreno Sabouraud agarizzato,

all'infuori dell'agar come ingrediente di preparazione, che in questo caso, per garantire la fluidità, viene omesso.

1- DESTINAZIONE D'USO
Diagnostico *in vitro*. Terreno liquido per la coltivazione di lieviti e muffe.

2- COMPOSIZIONE*
FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIOGLIMENTO IN ACQUA

Digerito peptico di tessuti animali	5 g
Digerito pancreatico di caseina	5 g
Glucosio	20 g

4 – PREPARAZIONE
Sospendere 30 g di polvere in 1000 mL di acqua purificata fredda. Agitare con cura e, se necessario, scaldare fino a completa solubilizzazione del terreno. Distribuire in provette o in flaconi e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Non eccedere nei tempi e nelle temperature di riscaldamento.

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea, gialla
Aspetto del terreno in soluzione ed in provetta	giallo, limpido.
pH (20-25°C)	5,6 ± 0,2

Fig. 12 – Paragrafi descrittivi le caratteristiche e proprietà del mezzo di coltura Sabouraud Broth (Biolife Italiana s.r.l)

In entrambe le modalità di preparazione dei terreni di coltura, le formulazioni possono essere compensate e/o corrette per adeguare le loro prestazioni alle specifiche del caso.

3.1.2 Matrici polimeriche

3.1.2.1 Acido polilattico (PLA)



Fig. 13 – Pellet del biopolimero PLA

L'acido polilattico (PLA, grado commerciale Luminy® [L130]) è stato fornito da TotalEnergies Corbion B.V. (Gorinchem, Paesi Bassi). La matrice polimerica, sintetizzata a partire da canna da zucchero 100% bio-basata e certificata Bonsucro, è stata ricevuta sotto forma di pellet sferoidali di colore bianco-semitrasparente. Questo grado commerciale di PLA è conforme alle normative sull'idoneità al contatto alimentare (Regolamento UE 10/2011 e FDA) e agli standard

di compostabilità industriale (EN 13432). Secondo le specifiche tecniche fornite dal produttore, il polimero presenta una densità di 1,24 g/cm3, una temperatura di transizione vetrosa (Tg) di 55–60 °C e una temperatura di fusione (Tm) compresa tra 155 e 175 ∘C in funzione della purezza stereochimica. Prima della trasformazione, i granuli di PLA sono stati essiccati in un deumidificatore a 80–100 ∘C per 4–6 ore al fine di eliminare l'umidità residua e prevenire fenomeni di degradazione idrolitica.

3.1.2.2 Poli(3-idrossibutirrato-co-3-idrossiesanoato) (PHBH)



Fig. 14 – Pellet del biopolimero PHBH

Il poli(3-idrossibutirrato-co-3-idrossiesanoato) (PHBH, grado commerciale Green Planet™ X131A) è stato fornito da Kaneka Corporation (Tokyo, Giappone). Questo poliidrossialcanoato (PHA) 100% di origine vegetale è sintetizzato tramite fermentazione microbica di oli vegetali e si presentava sotto forma di pellet sferoidali di colore giallo chiaro. Il PHBH X131A unisce una buona flessibilità e resistenza termica a una stabilità all'idrolisi durante l'uso e a una comprovata biodegradabilità in compost, nel suolo e in ambiente marino (certificato TÜV Austria OK Biodegradable MARINE). Secondo le specifiche tecniche del produttore, il polimero presenta una densità di 1,19–1,20 g/cm3, una temperatura di transizione vetrosa (Tg) compresa tra −5 e 0 °C e un punto di fusione (Tm) di 120–145 °C. Prima del processo di trasformazione, i granuli di PHBH sono stati essiccati a 60–70 °C per 4–6 ore in un deumidificatore per prevenire fenomeni di degradazione termo-idrolitica.

3.1.2.3 Polibutilen succitano (PBS)



Fig. 15 – Pellet del biopolimero PBS

Il polibutilen succinato (PBS) è stato fornito da Maip Compounding s.r.l. (Settimo Torinese, Italia). Il polimero si presentava sotto forma di pellet sferoidali di colore bianco. Questo poliestere alifatico semicristallino si caratterizza per elevata flessibilità, tenacità e spiccate proprietà filmogene, risultando idoneo alla preparazione di film mediante la tecnica di colata da soluzione (solution casting). In accordo con la scheda tecnica del produttore, la matrice presenta una densità di 1,25–1,26 g/cm3, una temperatura di transizione vetrosa (Tg) di circa −32 ∘C e un punto di fusione (Tm) compreso tra 110 e 115 °C. Il materiale soddisfa i requisiti di biodegradabilità e compostabilità industriale ai sensi della norma EN 13432.

3.1.2.4 Polivinil alcol (PVA)



Fig. 16 – Polvere del biomateriale PVA

Il polivinil alcol (PVA) è stato acquistato presso ITW Reagents / PanReac AppliChem (Darmstadt, Germania) sotto forma di polvere bianca molto fine. La matrice presenta un peso molecolare medio (Mw) di circa 72.000 g/mol, un grado di idrolisi dell'85–89% (grado parzialmente idrolizzato) e una perdita all'essiccamento ≤5%. Grazie all'elevata affinità per i solventi acquosi, la dissoluzione del polimero in acqua distillata mediante agitazione termica ha consentito di ottenere, tramite solution casting, film privi di solventi organici, caratterizzati da elevata trasparenza, omogeneità, buona elasticità e lavorabilità.

3.1.3 Molecole bioattive

3.1.3.1 Eugenolo

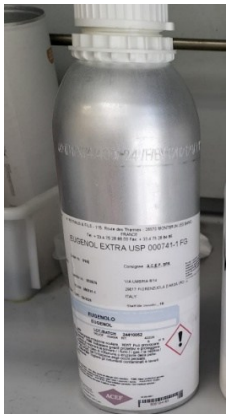


Fig. 17 – Bottiglia di stoccaggio dell'eugenolo puro

L'eugenolo (numero CAS 97-53-0, purezza ≥99,0%), prodotto da Reynaud & Fils e fornito da ACEF S.p.A. (Fiorenzuola d'Arda, Italia), è stato impiegato come principio attivo. Il materiale si

presentava sotto forma di liquido concentrato, da incolore a giallo paglierino, caratterizzato da una spiccata nota olfattiva speziata. In accordo con la specifica tecnica di prodotto, la sostanza presenta una densità a 20 °C di 1,066–1,072 g/mL e un indice di rifrazione compreso tra 1,540 e 1,542. Data l'elevata volatilità del composto, le fasi di manipolazione sono state condotte riducendo al minimo l'esposizione all'aria e operando a temperature inferiori a quella ambientale.

3.1.3.2 Acido Laurico



Fig. 18 – Polvere di acido laurico

L’acido laurico (acido dodecanoico, numero CAS 143-07-7, purezza ≥ 97,5%, peso molecolare 200,32 g/mol) è stato fornito da Molekula S.r.l. sotto forma di polvere bianca cristallina. La sostanza lipidica è stata impiegata come principio attivo nella formulazione dei film. In accordo con le specifiche del produttore, il composto presenta un punto di fusione di 44–46 °C e una temperatura di ebollizione di 225 °C, parametri termici considerati durante la fase di preparazione a caldo delle matrici. La manipolazione della sostanza è stata condotta adottando le opportune precauzioni di sicurezza in conformità con la relativa scheda di sicurezza (SDS).

3.1.3.3 Estratto di semi di pompelmo (Grapefruit Seed Extract – GSE)



Fig. 19 – Fiala del principio GSE puro

L'estratto di semi di pompelmo (GSE, *Grapefruit Seed Extract*) è stato acquistato presso l'azienda My Cosmetik (Francia) e impiegato come principio attivo naturale dalle proprietà antimicrobiche e antiossidanti. L'estratto si presentava sotto forma di liquido denso e viscoso di colore giallo-arancio intenso. La formulazione commerciale, standardizzata a 800 mg di bioflavonoidi di pompelmo per 100 mL, è costituita da glicerina vegetale biologica (≈ 84%), acqua e acido ascorbico (3 g/100 mL). L'estratto presenta un pH acido compreso tra 1,5 e 3,0 a 25 °C.

3.1.3.4 Ossido di zinco



Fig. 20 – Polvere di ossido di zinco nanoparticellare

La preparazione di tale molecola attiva si è basata sull'utilizzo del precursore acetato di zinco diidrato (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA). Dotato di una purezza ≥ 98%, un peso molecolare di 219.51 g/mol ed un pH di 6.0-7.0. Quest'ultimo parametro varia il proprio valore nel corso delle

fasi di preparazione in quanto soggetto ad un passaggio di alcalinizzazione per effetto di una base forte, utile per ottenere nanoparticelle più piccole e stabili.

3.2 Metodi

3.2.1 Ricezione campioni e identificazione degli alteranti

Campioni alterati e non, forniti dall'azienda, sono stati campionati per l'identificazione dei presunti contaminanti causa del problema del rigonfiamento delle confezioni. I campioni sono stati ricevuti in laboratorio e conservati alla temperatura di 5 °C per due settimane per favorire la crescita dei microrganismi alteranti.

3.2.1.1 Campionamento

Le confezioni sigillate, alterate e di controllo, sono state aperte in condizioni di sterilità in cappa microbiologica a flusso laminare Biohazard Asalair Atlantic (modello 1200 Atlantic, ASAL s.r.l., Milano) per il prelevamento di campioni superficiali di robiola. L'enumerazione della microflora alterante di interesse è stata effettuata in riferimento alle norme ISO 4833-1:2022 e 4833-2:2022, relative alle metodiche standard di campionamento di alimenti per identificazione di carica mesofila aerobia e anaerobia maggioritaria. Considerando diverse repliche biologiche per tipo (alterato e di controllo) ~10g di ciascun campione sono stati diluiti in rapporto 1:10 con soluzione fisiologica e omogeneizzati all'interno di buste sterili da stomacher. Gli omogeneizzati sono poi stati ulteriormente diluiti attraverso diluizioni decimali in tubi di fisiologica sterile seguendo la norma ISO 6887-1:2017, riferita alle diluizioni scalari per l'enumerazione dei microorganismi. Per quanto concerne l'inoculo in piastra, è stata utilizzata la tecnica di semina:

- per spatolamento, su terreno PCA (Plate Count Agar) per la conta totale aerobia (Total plate count – TPC) degli aerobi TPC (Total Plate Count), BHIA (Brain Heart Infusion Agar) con aggiunta di Cicloesimide (antifungino) per i batteri totali, SDA (Sabouraud Dextrose Agar) per i lieviti, e MRSA (de Man Rogosa Sharpe Agar) per i lattici;

- per inclusione invece, su terreno PCA (Plate Count Agar) per TPC di microorganismi anaerobi.

Tutte le piastre sono state poste in incubatore a 30°C per la crescita seguendo i rispettivi tempi di incubazione prima dell'enumerazione. I terreni MRSA e PCA anaerobia sono stati posti in giare di anaerobiosi per la crescita.

3.2.1.2 Isolamento e purificazione

I lieviti dominanti sono stati successivamente isolati e purificati nel rispetto dei riferimenti presenti nella norma ISO 21527-1:2008, che regolamenta i metodi di conta e isolamento di lieviti e muffe vitali in prodotti alimentari idratati ($\alpha_w > 0,95$).

Per la fase di isolamento primario, aliquote da 100 µL della sospensione madre e delle successive diluizioni decimali selezionate sono state inoculate in superficie su piastre di Rose Bengal Agar (RB), distribuendo l'inoculo in modo omogeneo mediante una spatola sterile di Drigalski. Le piastre sono state incubate a una temperatura controllata di 25°C in ambiente buio per un periodo compreso tra 2-5 giorni. Al termine dell'incubazione, si è proceduto all'osservazione macroscopica delle piastre per l'identificazione e la selezione delle colonie. I rilievi morfologici si sono focalizzati sulla ricerca di colonie dal profilo sferico od ovoidale, con superficie liscia o lievemente rugosa, margini ben definiti e una colorazione variabile dal bianco-crema al rosa (come nel caso di *Rhodotorula spp.*), caratteristiche tipiche delle popolazioni lieviti-formi. Le colonie ben isolate e rappresentative delle diverse tipologie morfologiche osservate sono state quindi prelevate mediante ansa sterile per condurre la fase di purificazione. Quest'ultima è stata realizzata applicando la tecnica della semina per esaurimento (quadrant streaking) su terreno *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) addizionato con cloramfenicolo. L'impiego dell'SDA ha fornito l'apporto nutrizionale ottimale per sostenere lo sviluppo della coltura, mentre il cloramfenicolo ha garantito il mantenimento della selettività nei confronti di eventuali contaminazioni batteriche. Le piastre purificate sono state successivamente incubate a 30°C per 36-48h, fino all'ottenimento di colonie singole. La conferma della purezza dei ceppi isolati, invece, è stata eseguita mediante controllo microscopico (Nikon Eclipse *Ci*, Nikon Corporation, Giappone) a fresco (400x), valutando l'omogeneità della citomorfologia cellulare, la presenza di strutture riproduttive tipiche quali gemme e la contestuale assenza di contaminanti batterici o miceliali (funghi filamentosi). I

ceppi puri così caratterizzati sono stati mantenuti a breve termine su terreno agarizzato inclinato (*slant*) a 4°C, per essere coltivati in laboratorio (eventuali altre analisi fenotipiche), seguentemente collocati in congelazione a ~ -20°C ed infine collocati in cella a -81°C (impiegando glicerolo come crioprotettore, 50% del volume in vial), come ceppi archivio per le ulteriori analisi.

I lieviti dominanti isolati e purificati che sono stati impiegati per i successivi test di sfida sono stati denominati RB (Rose Bengala) e SAB (Sabouraud), sulla base dei terreni di coltura utilizzati nelle fasi di isolamento sopra citate.

3.2.2 Verifica attività antimicrobica

3.2.2.1 MIC

3.2.2.1.1 DDa

Da un punto di vista operativo, per ciascun ceppo, è stata spatolata una quantità nota di coltura di lievito (100 µL) su piastre Petri da 90 mm di diametro di terreno SDA. Successivamente sono stati collocati, equispaziati, i dischi di packaging attivo o di carta filtro imbevuti di antimicrobico tal quale (10 µL) nelle rispettive posizioni identificate dai codici sperimentali. Tra i dischi posizionati è stato considerato anche il singolo spot di sola carta filtro indispensabile come controllo (C). Al fine di verificare la concentrazione di coltura inoculata, sono stati preparati dei terreni SDA di conta, andando a piastrare in maniera seriale delle diluizioni (10^{-3} ÷ 10^{-7}) della coltura tal quale impiegata nel precedente test. Tutte le piastre sono state collocate in incubatore a 30 °C per circa 36-48h.

3.2.2.1.2 MBC

Macrodiluizioni

Il seguente metodo è stato applicato per testare e valutare la capacità antimicrobica dei film polimerici considerati, combinati con le molecole bioattive di interesse. Negli specifici casi, i campioni sono testati negli intervalli di concentrazione 0,1% p/v ÷ 5% p/v per l'eugenolo; 2,5%

p/v - 5% p/v per l'acido laurico; 0,5% p/v ÷ 5% p/v per l'estratto di semi di pompelmo e 0,1mg/mL ÷ 1mg/mL per l'ossido di zinco.

L'ossido di zinco, essendo una matrice solida polverosa, è stato preventivamente necessario sospenderlo in 1mL di soluzione fisiologica, in modo tale da poter essere compatibile con il sistema di crescita microbico, e successivamente diluirlo per ottenere le concentrazioni da testare.

In primo luogo, sono state ottenute delle piccole porzioni (c.a. 6mm di diametro) dei film polimerici attivati, paragonabili e similari ai dischetti utilizzati nella metodica DDa sopracitata. I dischetti polimerici sono stati posizionati per 5 min per faccia sotto raggi UV, in modo tale da sterilizzare ciascuna porzione. In secondo luogo, sono stati preparati molteplici sistemi di coltura in varie eppendorf. In ciascuna è stata pipettata la corretta aliquota di brodo Sabouraud (900 µL o 990 µL) e la corretta aliquota di inoculo di lievito, così da ottenere in ognuna di esse, avvalendosi della tecnica delle diluizioni seriali, concentrazioni differenti di lievito (SAB o RB) contro cui testare la molecola attiva. A questo punto in ciascuna eppendorf è stata inserita il rispettivo dischetto di campione polimerico attivo da testare. Per verificare un'eventuale contaminazione dei singoli campioni, sono state ottenute delle eppendorf di controllo positivo (C+), nelle quali è stato pipettato solo brodo di coltura ed è stato inserito lo spot campione relativo a ciascun film. Per verificare, invece, la vitalità ed un corretto andamento di crescita della popolazione microbica, sono state realizzate delle eppendorf per il controllo negativo (C-), nelle quali è stato inserito brodo di coltura e 100 µL dell'inoculo impiegato alle rispettive diluizioni utilizzate nella presente metodica. Un'ulteriore e scrupolosa strategia di controllo è stata effettuata sul bianco (B), ovvero sul brodo Sabouraud, preparando delle eppendorf con solo quest'ultimo componente e un dischetto di cellulosa sterile, così da verificare che il terreno liquido impiegato non fosse contaminato a monte. Come solito, l'analisi è stata condotta in triplice replica per ogni campione e controllo. Dopo aver verificato che ciascun dischetto di campione fosse correttamente immerso/solubilizzato nel sistema di crescita l'intero set di eppendorf è stato posto ad incubare in stufa a 30 °C per 36-48h.

Microdiluizioni

Analogamente alle macrodiluizioni, il test MBC è stato effettuato alla medesima maniera ma con volumi più piccoli per essere compatibili con una piastra microplate. Quindi, in ognuno dei

pozzetti della piastra è stata creata una soluzione test da 100 µL totali, costituita da 10 µL di coltura microbica (ceppi), 10 µL di molecola bioattiva e 80 µL di brodo Sabouraud sterile. Ciascuna molecola attiva è stata utilizzata a concentrazioni note in funzione dei valori sfida di riferimento rilevati in letteratura. Per gli stessi principi di significatività e controllo applicati nella tecnica precedente, anche qui, le prove all'interno della microplate sono state effettuate sempre in triplice replica, accompagnate dai rispettivi controlli: positivo (C+), costituito da principio bioattivo, 10 µL, e Sabouraud Broth sterile; negativo (C-), costituito dal ceppo di lievito, 10 µL, e Sabouraud Broth sterile; bianco (B), costituito esclusivamente da brodo sterile. La microplate è stata incubata a 30°C per 36-48h e la crescita dei ceppi fungini è stata monitorata determinando, in questo caso, la densità ottica (OD600 nm) mediante misurazioni spettrofotometriche ogni 30 min a partire dal tempo zero (T0).

3.2.3 Inclusione molecole attive in polimeri

3.2.3.1 Realizzazione

Preparazione dei film attivi

La fabbricazione dei film polimerici attivi è stata condotta mediante la tecnica di colata da soluzione (Solution Casting), adattando il processo in base al solvente utilizzato e alla natura chimico-fisica della matrice e delle molecole bioattive.

Preparazione delle soluzioni in cloroformio (PLA, PHBH, PBS)

La prima fase ha previsto la dissoluzione dei polimeri idrofobi (PLA, PHBH e PBS) alla concentrazione, inizialmente, del 10% p/v e 5% p/v, a seguire, in cloroformio. La miscela è stata introdotta in un pallone in vetro monocollo, equipaggiato con ancoretta magnetica e collegato a un refrigerante a ricaduta per prevenire l'evaporazione del solvente e la conseguente alterazione del titolo della soluzione. Il pallone è stato immerso in un bagno ad acqua posizionato su un agitatore magnetico riscaldante (Instruments Lab Control, Reggio Emilia, Italia), al fine di evitare il contatto diretto con la piastra termica. La dissoluzione è stata condotta a una temperatura di piastra compresa tra 100 e 155 °C per 45–60 min. Una volta verificata la completa solubilizzazione del polimero, l'impianto è stato spento e la soluzione è stata lasciata raffreddare a temperatura ambiente (20–25 ◦C) sotto blanda agitazione.

Parallelamente, sono state pesate le aliquote predefinite di molecole bioattive e di tensioattivo (Tween 80), impostando i rapporti ponderali principio attivo:tensioattivo a 1:1 o 1:0,5 p/p, per poi integrarle nella fase polimerica.

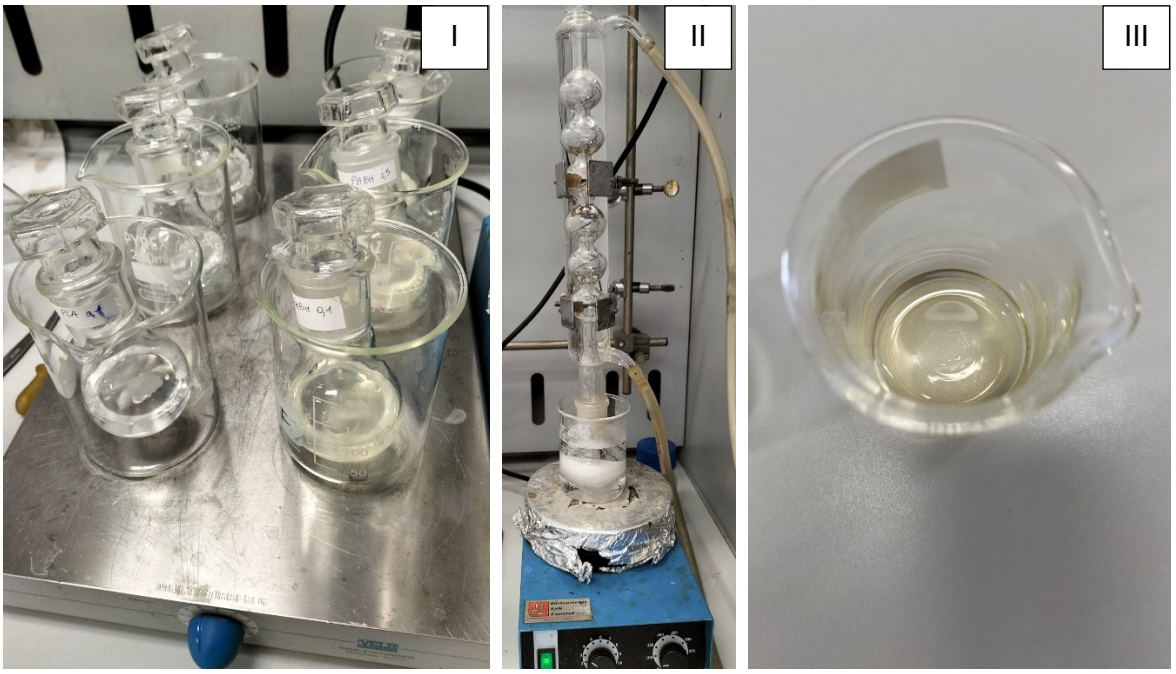


Fig. 21 – I) Palloni di vetro monocollo contenenti miscele dei materiali PLA e PHBH in cloroformio e ancoretta, su agitatore magnetico; II) sistema di riscaldamento costituito da una miscela campione in pallone di vetro posizionato su una piastra termica e collegato al tubo refrigerante a ricaduta; III) aliquota di principio attivo eugenolo in tween 80

Preparazione della soluzione idrofila (PVA) ed omogeneizzazione

Per la preparazione dei film a base di polivinil alcol (PVA) al 5% p/v in acqua distillata, il protocollo è stato opportunamente modificato. Il polimero e l'acqua distillata sono stati introdotti nel medesimo apparato a ricaduta e mantenuti in agitazione termostata a 80–90 ∘C fino a completa solubilizzazione. In parallelo, il Tween 80 e le molecole attive sono stati pre-miscelati sotto agitazione. Dopo aver unito la fase attiva alla soluzione polimerica di PVA, il sistema è stato sottoposto ad omogeneizzazione ad alto microtaglio mediante Ultra-Turrax (Witeg Labortechnik GmbH HG-15D, Germania) applicando cicli ripetuti da 30 s a 12.000 rpm. Per le formulazioni contenenti principi attivi ad elevata volatilità (Eugenolo e GSE), il becher di reazione è stato alloggiato all'interno di un bagno di ghiaccio per dissipare il calore generato dal processo di omogeneizzazione e minimizzare le perdite per evaporazione.

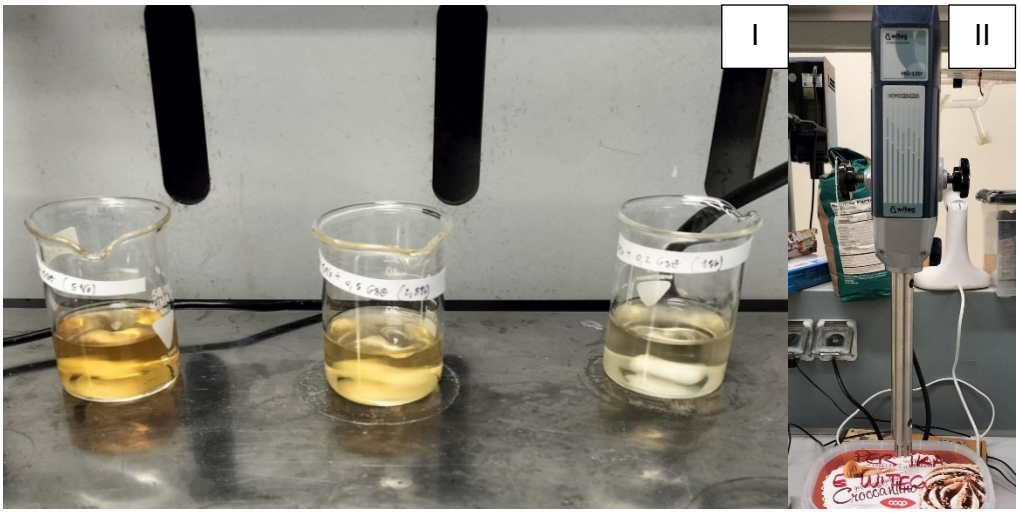


Fig. 22 – I) Soluzioni polimeriche di PVA 5% p/v in acqua e principio attivo GSE a differenti concentrazioni (5% p/v – 2,5% p/v – 1,0% p/v), in agitazione su piastra magnetica; II) omogeneizzatore Ultra-Turrax

Colata ed essiccamento dei film (Solution Casting)

Le soluzioni polimeriche attive così ottenute sono state colate sui rispettivi supporti. Le miscele in cloroformio (PLA, PHBH, PBS) sono state versate su piastre di vetro di dimensioni note, mentre le soluzioni acquose di PVA sono state ripartite in piastre Petri in polistirene (Ø=90 mm, volume di colata pari a circa 10 mL per piastra). Il volume di soluzione colato è stato rigorosamente standardizzato al fine di garantire l'omogeneità dello spessore e la riproducibilità tra i diversi campioni. I film sono stati lasciati essiccare spontaneamente a temperatura ambiente (20–25 °C) sotto cappa aspirante. Al termine del processo di evaporazione del solvente, i film sono stati delicatamente pelati dai supporti. Nello specifico, le formulazioni PLA-acido laurico (PLA-LA) e PBS-acido laurico (PBS-LA) hanno mostrato una marcata fragilità e un'elevata adesione al supporto rigido, richiedendo particolare cautela nella fase di distacco meccanico.

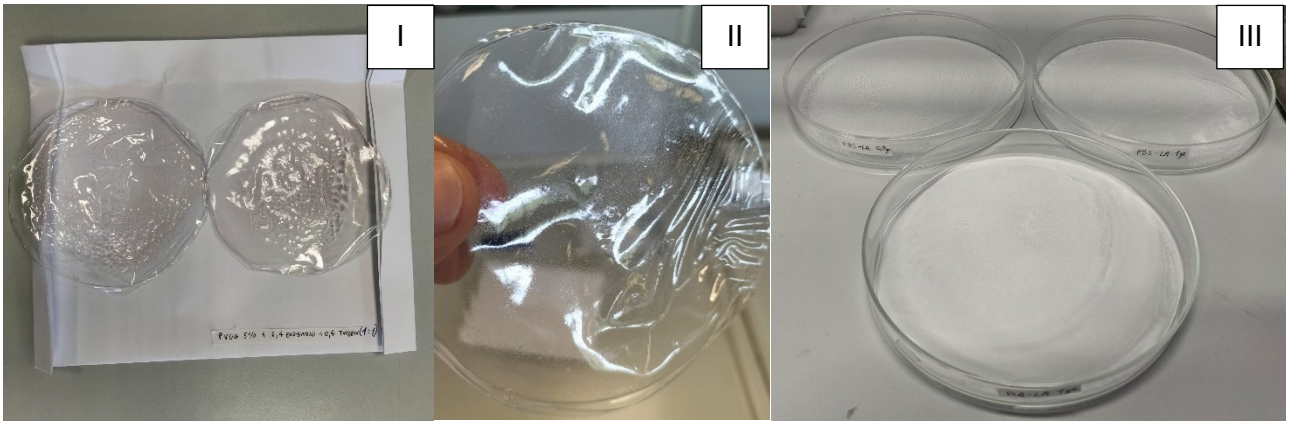


Fig. 23 – I) Film polimerico PVA 5% p/v + 2% eugenolo p/v + tensioattivo 1:1; II) film polimerico PVA 5% p/v + 0,5 mg/mL ossido di zinco, con particolato non solubilizzato visibile in trasparenza; III) film polimerici PBS 10% p/v + 2,5% p/v acido laurico, PBS 10% p/v + 5,0% p/v acido laurico (sopra) e PLA 10% p/v + 5,0% p/v (sotto)

Nella tabella che segue sono riportati, raggruppati per biomateriale, i campioni dei film polimerici realizzati e testati nella sperimentazione.

Tipo polimero	% p/v polimero	Principio attivo	principio attivo % p/v	tensioattivo [rapporto pr. attivo:tween 80]
PHBH	10%	eugenolo	1%	-
	10%	eugenolo	0,5%	-
	10%	eugenolo	0,1%	-
PBS	10%	eugenolo	1%	-
	10%	eugenolo	0,5%	-
	10%	eugenolo	0,1%	-
PLA	5%	eugenolo	2%	1:1
	5%	eugenolo	2%	1:0,5
	10%	eugenolo	1%	-
	10%	eugenolo	0,5%	-
	10%	eugenolo	0,1%	-
	10%	acido laurico	5%	-
	10%	acido laurico	2,50%	-
	5%	ossido d zinco	1 mg/mL	-
	5%	ossido d zinco	0,5 mg/mL	-
PVA	5%	eugenolo	2%	1:1
	5%	eugenolo	2%	1:0,5
	5%	GSE	5%	-
	5%	GSE	2,5%	-
	5%	GSE	1%	-
	5%	GSE	0,5%	-
	5%	acido laurico	1,25%	1:1
	5%	acido laurico	1,25%	1:0,5
	5%	acido laurico	2,50%	1:1
	5%	ossido d zinco	1 mg/mL	-
	5%	ossido d zinco	0,5 mg/mL	-

Tab. 3 – Quadro riassuntivo delle soluzioni polimeriche preparate e testate in laboratorio

4 Risultati

4.1 Carica microbica dei contaminanti

Attraverso i vari procedimenti di identificazione, isolamento e purificazione microbica, partendo dalla generica conta mesofila aerobia passando per la valutazione delle specie batteriche e/o anaerobie fino all'analisi di popolazioni fungine è stato possibile ottenere un quadro complessivo osservabile nella tabella riportata di seguito.

Alteranti (UFC/mL)	**Aerobi totali**	**Batteri totali**	**Lieviti**	**Lattici**	**Anaerobi**
Media ($>10^4$)	3.61E+06	0	6.10E+06	0	0
Dev.st	1.10E+05	0	8.00E+05	0	0
Controlli (UFC/mL)	**Aerobi totali**	**Batteri totali**	**Lieviti**	**Lattici**	**Anaerobi**
Media ($>10^4$)	9.10E+04	0	1.10E+02	0	0
Dev.st	4.00E+03	0	1.00E+01	0	0

Tab. 3 - Enumerazione in piastra della microflora maggioritaria identificata

Dai risultati riassunti nella seguente tabella siamo in grado di evincere che il rigonfiamento delle confezioni è con ogni probabilità associata alla presenza di lieviti alteranti basso fermentanti.

4.2 Isolamento e purificazione

I lieviti coltivati in piastre Sabouraud sono stati, conseguentemente, prelevati in singole colonie ed isolati, mediante striscio di purificazione, su altri nuovi terreni vergini di SDA. Questa operazione è stata eseguita in modo tale da ottenere una popolazione microbica quanto più pura possibile, dove per purezza si intende la totale rappresentanza, nel mezzo, di un unico ceppo microbico. Per confermare ciò, sono state effettuate delle osservazioni fenotipiche al microscopio ottico per la verifica della purificazione ottenuta e l'assenza di contaminanti batterici.

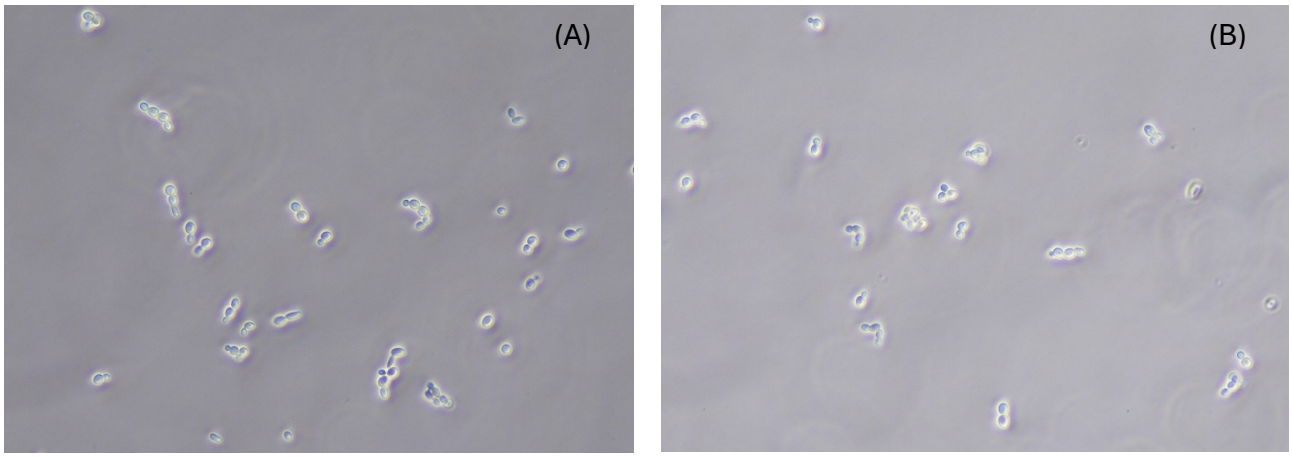


Fig. 24 – Immagini al microscopio ottico (400x) dei ceppi SAB (A) ed RB (B) isolati e purificati

I ceppi in questione sono stati nominati RB e SAB in corrispondenza dei terreni utilizzati per essere colturati e utilizzati per i successivi test sfida.

4.3 Verifica attività antimicrobica

4.3.1 MIC

4.3.1.1 DDa

Di seguito sono riportate le osservazioni sperimentali ottenute con questa metodica di analisi applicata a ciascun principio bioattivo testato.

4.3.1.1.1 Eugenolo

Con questo composto bioattivo, le cui potenzialità come molecola antimicrobica erano già ben note, si è partiti nell'includerlo in una serie di combinazioni polimeriche a base PLA, PHBH e PBS (10% p/v) a concentrazioni differenti (0,1% p/v – 0,5% p/v – 1,0% p/v), senza impiego di alcun tensioattivo. Come documentato nella Fig. 25, nessuno dei dischetti polimerici attivati con eugenolo ha espletato alcuna attività antimicrobica, riscontrabile con un visibile alone di inibizione.

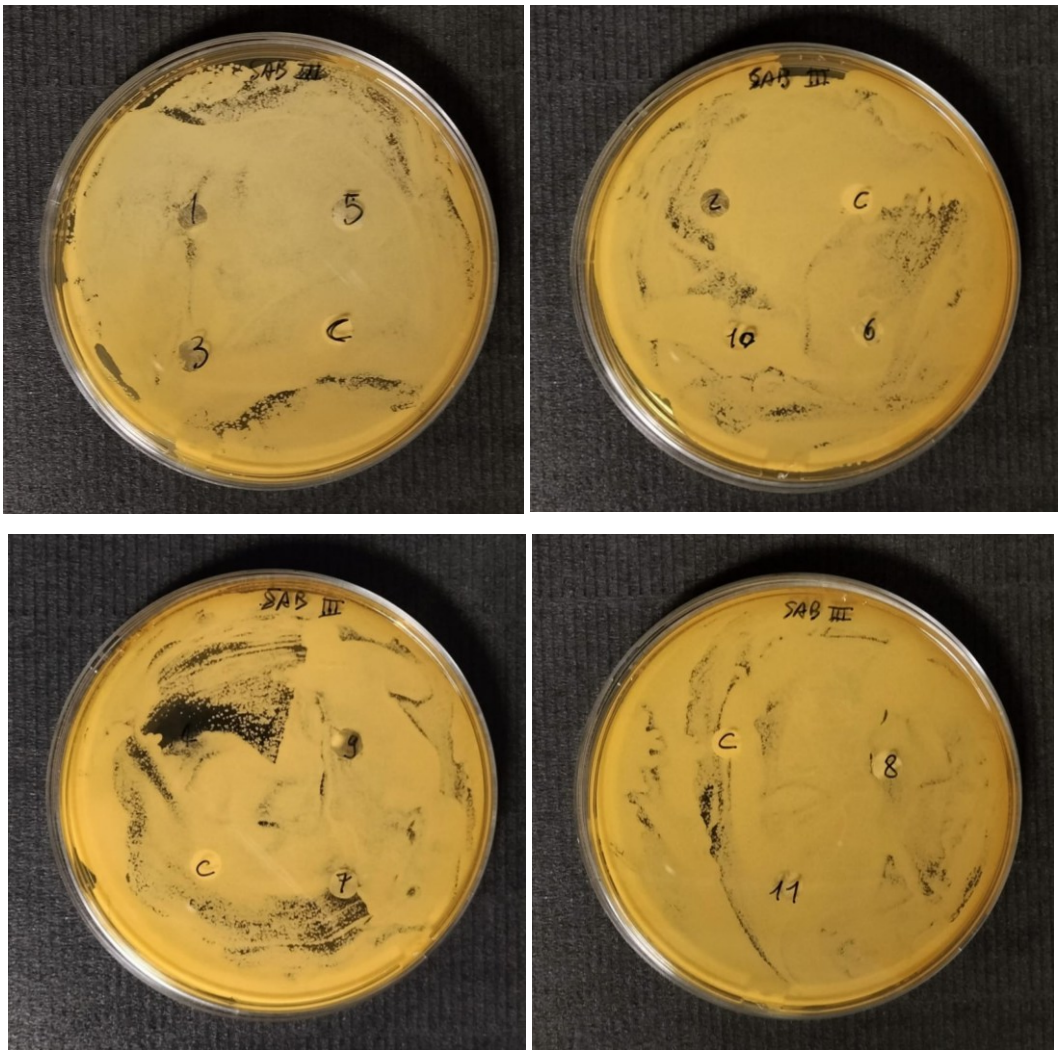


Fig. 25 – Piastre di ceppo SAB nei confronti del quale sono stati testati i polimeri attivati con eugenolo: 1) PLA 10% p/v + 1,0% p/v eug.; 2) PLA 10% p/v + 0,5% p/v eug.; 3) PLA 10% p/v + 0,1% p/v eug.; 4) PHBH 10% p/v + 1,0% p/v eug.; 5) PHBH 10% p/v + 0,5% p/v eug.; 6) PHBH 10% p/v + 0,1% p/v eug.; 7) PBS 10% p/v + 1,0% p/v eug.; 8) PBS 10% p/v + 0,5% p/v eug.; 9) PBS 10% p/v + 0,5% p/v eug.

Per questa ragione, si è preferito virare verso una strategia differente che ha previsto la riduzione della concentrazione di polimero in miscela (da 10% p/v a 5% p/v), l'utilizzo di un nuovo biopolimero idrosolubile come il PVA e l'aumento della concentrazione di eugenolo, così da incrementare la biodisponibilità e facilitare la diffusività della molecola attiva. Conseguenza diretta, però, è stata l'introduzione del tensioattivo come utile mediatore dell'interazione principio attivo-solvente-materiale.

Infatti, conseguentemente, i test DDa sulla molecola attiva eugenolo in concentrazione 2% p/v, inclusa nel polimero PVA, considerando entrambi i rapporti di principio attivo: tween80 (1:1 e 1:0,5) sono stati gli unici ad aver rivelato un esito positivo.

Mediante un'analisi Anova a due vie seguita da un Post Hoc test Tukey HSD, effettuata tramite software Jasp (versione 0.98.1, Amsterdam, Netherlands), ha rivelato la significatività statistica dei campioni polimerici con eugenolo 2% p/v, rispetto alle altre concentrazioni testate.

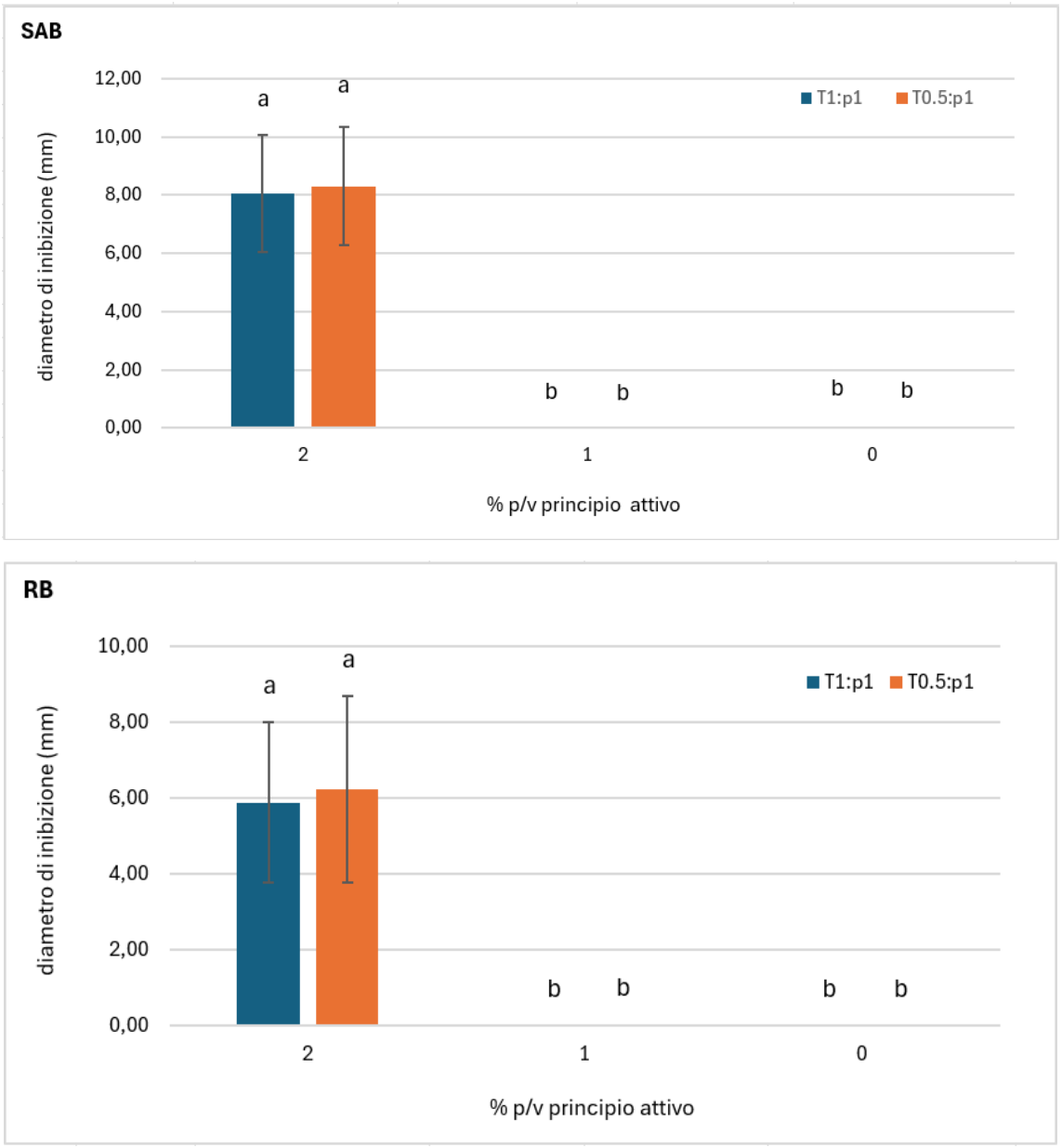


Fig. 26 – Elaborazione statistica campioni polimerici con eugenolo in due concentrazioni per entrambi i ceppi (SAB sopra; RB sotto)

Nei confronti di entrambi i ceppi, aventi una carica iniziale media di 5 x 10^6 UFC/mL, possiamo dire che vi è stata un'ottima capacità di antagonismo microbico come si può evincere dagli aloni di inibizione nella figura di seguito mostrata (Fig. 27).

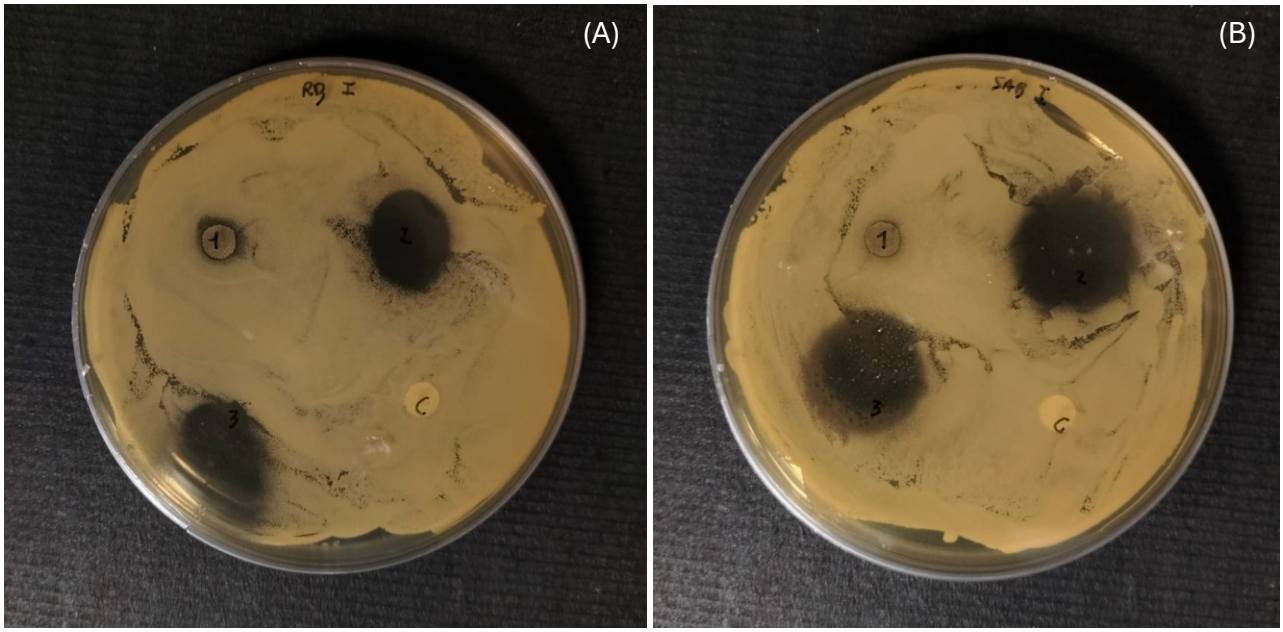


Fig. 27 – Piastre sfida verso entrambi i ceppi RB (A) e SAB (B) dei dischetti di polimero attivo con eugonolo: 1) PLA 5% p/v + 2,0% p/v eug. + tween 1:1; 2) PVA 5% p/v + 2% eug. p/v + tween 1:1; 3) PLA 5% p/v + 2% eug. p/v + tween 1:0,5; C) controllo di cellulosa

Una particolare nota è da spendere sul dischetto 1 (PLA 5% p/v + 2,0% p/v eug. Rapporto eugenolo: tween80 1:1) il quale in questo test ha dimostrato una minima zona di attivazione, inusuale per la sua mancanza di comportamento antimicrobico esplicato nei precedenti test. Nonostante ciò, è visibilmente netta la differenza nella capacità antimicrobica rispetto agli altri due dischetti polimerici testati (2 e 3) a base PVA. Sulla base di questa osservazione la conseguente deduzione è stata quella che probabilmente il PLA ha una maggiore affinità e predisposizione al trattenimento della molecola attiva all'interno della sua struttura, ostacolandone il rilascio. Per questa ragione i successivi test sfida si sono basati sull'impiego più mirato del biopolimero PVA.

4.3.1.1.2 Acido laurico

Per quanto concerne i test DDa per dischetti polimerici di acido laurico testati esclusivamente alle concentrazioni 0,5% p/v e 1,0% p/v e in combinazione con il biopolimero PLA, tutti i risultati hanno dato esito negativo. Come riportato dalle foto in Fig. 28 i campioni 10 e 11 per entrambi i ceppi di lievito non hanno mostrato alcuna capacità antimicrobica.

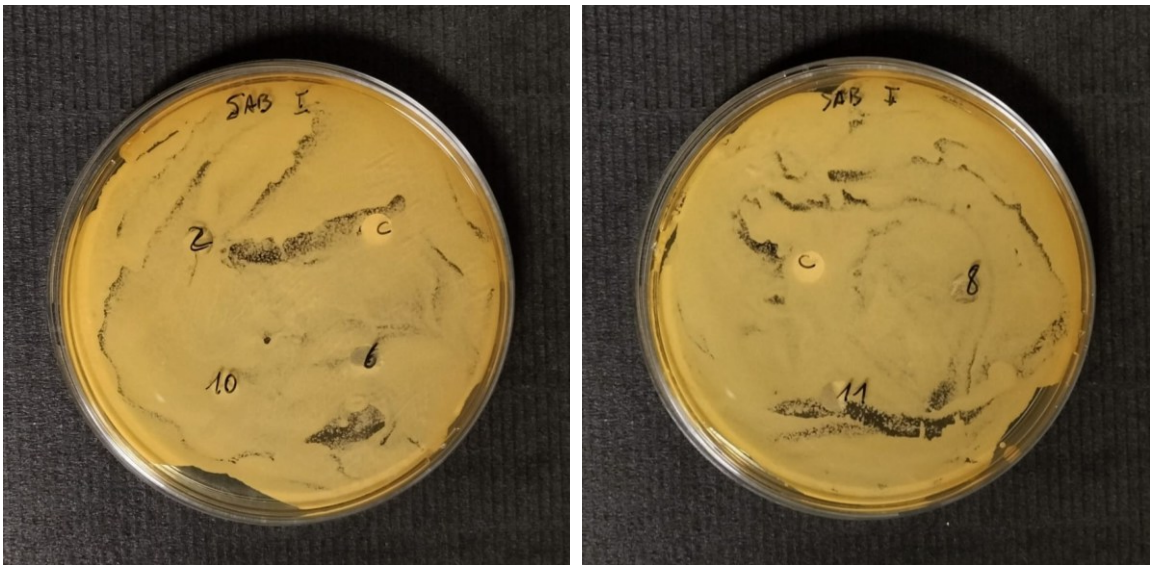


Fig. 28 - Piastre sfida DDa nei confronti del ceppo SAB dei dischetti di polimero attivo con acido laurico: 10) PLA 10% p/v + 5% p/v ac. laurico; 11) PLA 10% p/v + 2,5% p/v ac. laurico

Inoltre, è doveroso riportare, anche, che nel tentativo di includere il principio attivo acido laurico nei biopolimeri PHBH, PBS e PVA sono state riscontrate non poche problematiche nella fase di distacco dei film dai supporti di realizzazione (vetri e piastre Petri). Risultavano troppo "secchi" e adesi ai supporti stessi, particolarmente labili e fragili da non poter essere manipolati e adoperati per dei test sfida.

4.3.1.1.3 Estratto di semi di pompelmo – GSE

Il tentativo di impiegare il GSE come possibile principio antimicrobico nei confronti dei lieviti, testato nella sola combinazione con PVA, non ha rivelato alcuna efficacia attesa. Nonostante non sia stato impiegato il tensioattivo Tween 80 e siano state testate concentrazioni in linea di massima più alte (5% p/v - 2,5% p/v - 1% p/v) rispetto alle altre molecole bioattive, attraverso disk diffusion non è stato riscontrato alcun alone che testimoniasse un cenno di potenzialità antimicrobica.

4.3.1.1.4 Ossido di zinco

Sulla base della sua insolubilità in solventi acquosi e non, della bassa diffusività e della tendenza ad aggregare in particolato, abbiamo deciso di effettuare direttamente un test MBC

piuttosto che DDa, in quanto l'ossido inorganico non avrebbe espletato alcun tipo di attività come descritto già da Raghupathi et al. (2011), P. J. P. Espitia et al. (2012) e consigliato nel documento CLSI M07-A11 / M100 (Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically).

4.3.1.2 MBC

Per applicare la seguente tecnica, al fine di ottenere risultati significativi per la determinazione della concentrazione minima inibitoria (MIC), è consigliato l'impiego di macro- e microdiluizione in brodo (Sahm & Washington, 1991; Pankey G. A. & Sabath L. D., 2004; CLSI, ISO 20776-1/EUCAST). Generalmente, quest'utima, come nel caso di questa sperimentazione, viene effettuata per prima, come valutazione preliminare. In tal modo, i principi attivi in esame possono essere testati tal quali sui microrganismi target per identificare e selezionare le migliori concentrazioni attive degli stessi. Secondariamente, si procede con l'attuazione della macrodiluizione per verificare in vitro l'efficacia delle dinamiche di antagonismo ed inibizione, nei confronti dei microrganismi sfida, delle combinazioni materiale-polimero considerate nel caso sperimentale.

4.3.1.2.1 Eugenolo

Macrodiluizione

Tra i vari test di diluizione in brodo i campioni polimerici attivati con eugenolo al 2% p/v sono quelli che hanno fornito i risultati migliori, specialmente in combinazione con i biomateriali PLA e PVA. I grafici di seguito mostrano una reale differenza di carica microbica tra il T0, ovvero le condizioni tal quali di inoculo, rispetto ai campioni di PLA e PVA additivati di eugenolo al 2% p/v (S1, S2 e S3) dopo 36-48h di incubazione a 30 °C.

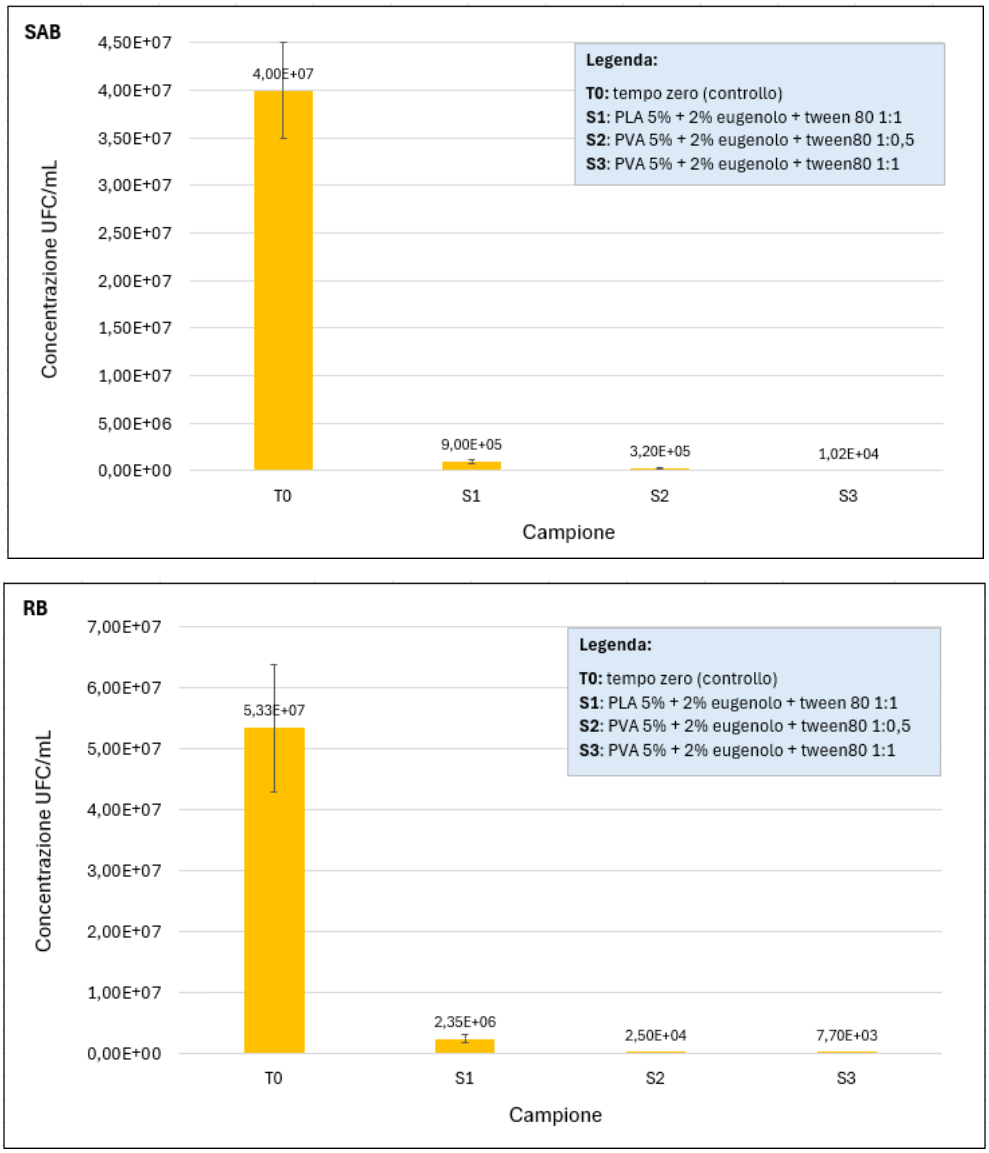


Fig. 29 – Elaborazione delle crescite microbiche in test MBC di campioni polimerici con eugenolo per entrambi i ceppi di lievito (SAB, grafico sopra; RB, grafico sotto)

Per entrambi i ceppi possiamo dire che i campioni S1 e S2 hanno espresso una notevole azione batteriostatica, rasentando quella battericida; mentre per il campione S3, in entrambi i casi, si riescono a raggiunge ed addirittura, di poco, superare i 3 *log* (cicli logaritmici) che permettono di definire un agente antimicrobico battericida.

4.3.1.2.2 Acido laurico

Macrodiluizione

L'attività antimicrobica dell'acido laurico, su entrambi i ceppi di lievito, è stata valutata con questa tecnica esclusivamente quando additivato al biopolimero polivinilalcol; infatti, ad essere testati sono stati i seguenti film: (I) PVA 5% p/v + 1,25% p/v acido laurico rapporto acido laurico: tween80 1:1; (II) PVA 5% p/v + 1,25% p/v acido laurico rapporto acido laurico: tween80 1:0,5; (III) PVA 5% p/v + 2,5% p/v acido laurico rapporto acido laurico: tween80 1:1. I sistemi di coltura trattati con il campione (III), non mostravano torbidità evidente alla diluizione 10^{-5}. Tuttavia, non è stato possibile stabilire con certezza se fosse presente una crescita microbica residua, poiché il dischetto si era parzialmente solubilizzato, rilasciando materiale particolato nella sospensione. Per tale motivo, al fine di valutarne la crescita microbica, le stesse sospensioni sono state sottoposte a semina su terreno agarizzato SDA alla diluizione precedente più bassa (10^{-3}). I campioni (I) e (II), invece, hanno mostrato torbidità già alla diluizione 10^{-5}; di conseguenza, anche in questo caso, aliquote di tali campioni sono state seminate su terreno agarizzato. Dopo il periodo di incubazione standard (36-48h a 30°C), per tutti i campioni piastrati e colturati, è stata osservata un'abbondante crescita microbica tale da rendere impossibile l'enumerazione delle colonie. Pertanto, nelle condizioni sperimentali adottate non è stato possibile dimostrare alcuna attività antimicrobica dell'acido laurico nei confronti dei ceppi di lievito sfidati.

4.3.1.2.3 Estratto di semi di pompelmo – GSE

Microdiluizione

Per il test di diluizione in brodo effettuato in microplate per il campione S2 e S0.2 della molecola bioattiva GSE, alle due concentrazioni "estreme" impostate di 0,2% p/v – 2,0% p/v, il quadro analitico è quello osservabile in Fig. 30. Dalle curve di crescita dei campioni del principio attivo tal quale nei confronti del ceppo SAB (diluito inizialmente fino a una carica iniziale 10^2 UFC/mL), si può riscontrare una minima azione antimicrobica da parte di entrambe le concentrazioni. Partendo dal presupposto che l'effetto antimicrobico dei campioni alle due

diverse concentrazioni è equiparabile, si può, però, riscontrare che per il campione S0.2 l'andamento ha avuto una attivazione più lenta.

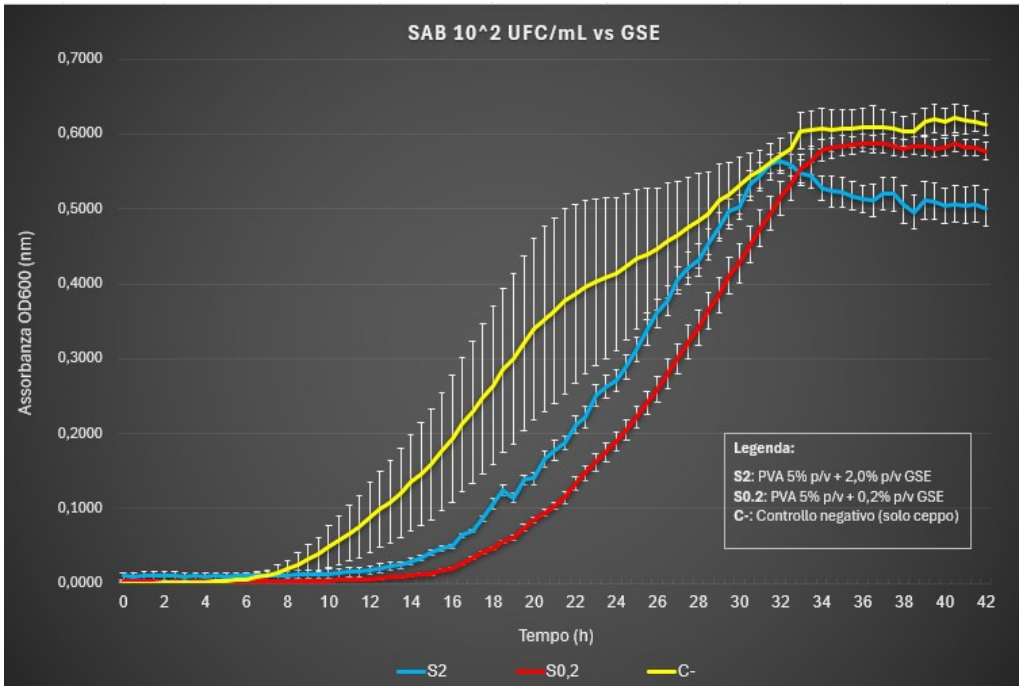


Fig. 30 – Grafico di elaborazione del test microdiluizione MBC per il principio attivo GSE alle concentrazioni testate, nei confronti di una carica iniziale del ceppo SAB di 10^2 UFC/mL

Nei confronti di una carica iniziale di 10^4 UFC/mL dello stesso ceppo, i campioni, per entrambe le concentrazioni testate, hanno risposto in maniera verosimile al caso precedentemente descritto. Le curve di crescita S2 e S0.2 sono del tutto simili a quelle della curva di controllo, differenziandosi da queste unicamente per il lag-time. Solo nelle ore finali dell'analisi si riscontra un moderato abbassamento e appiattimento (plateau) delle stesse, come a voler dimostrare una maggiore capacità di inibizione.

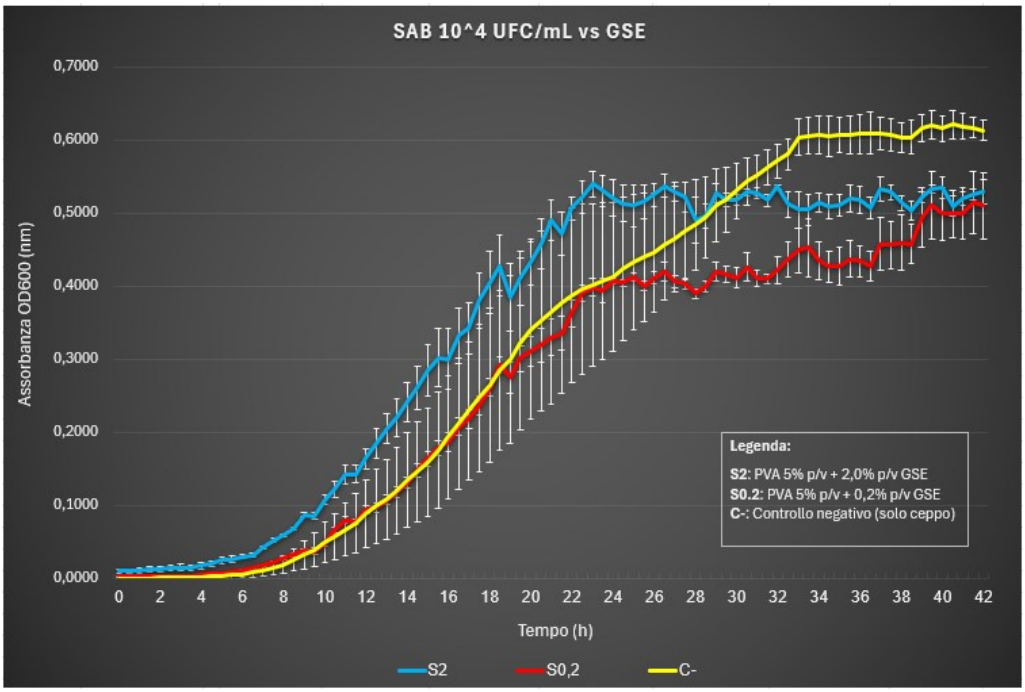


Fig. 31 – Grafico di elaborazione del test microdiluizione MBC per il principio attivo GSE alle concentrazioni testate, nei confronti di una carica iniziale del ceppo SAB di 10^4 UFC/mL

Analogamente ai casi sopra discussi per il ceppo SAB, anche in questa situazione i campioni di GSE alle due diverse concentrazioni hanno espletato una, possiamo dire migliore, attività antimicrobica nei confronti del ceppo RB con carica iniziale di 10^3 UFC/mL. Lo possiamo constatare e confermare dal raggiungimento anticipato della stabilizzazione del valore di assorbanza misurato e mantenuto tale per la maggior parte del tempo dell'analisi turbidimetrica.

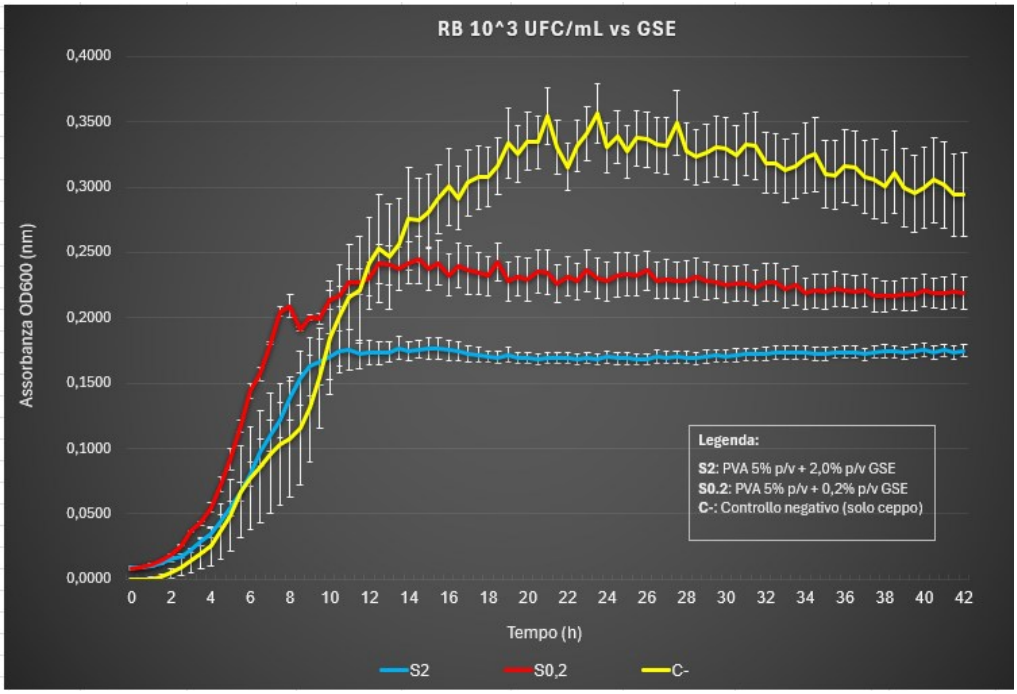


Fig. 32 – Grafico di elaborazione del test microdiluizione MBC per il principio attivo GSE alle concentrazioni testate, nei confronti di una carica iniziale del ceppo RB di 10^3 UFC/mL

Nella valutazione dell'ultima condizione di analisi per la molecola GSE nel test di microdiluizione MBC, nei confronti del ceppo RB con carica iniziale 10^5 UFC/mL è stato riscontrato sin da subito l'attività antimicrobica della molecola. A testimonianza di ciò possiamo sempre osservare l'andamento delle curve dei campioni S2 e S0.2, che, sin dalle prime ore di analisi, si mantengono ad un livello di assorbanza decisamente inferiore rispetto alla curva di controllo, soprattutto alla concentrazione maggiore del 2% p/v.

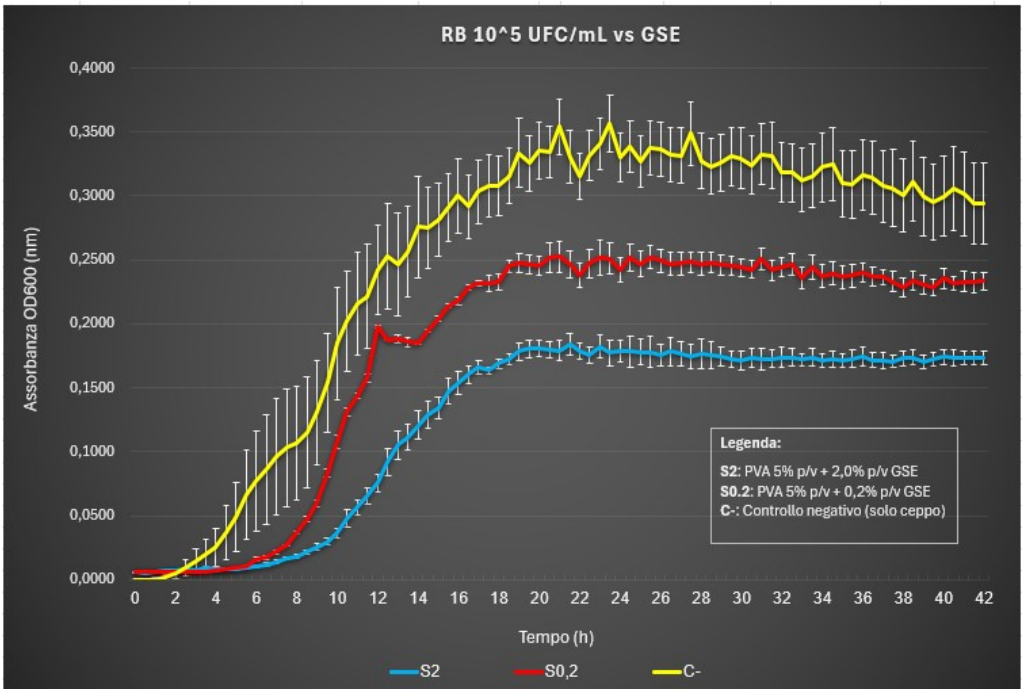


Fig. 33 – Grafico di elaborazione del test microdiluizione MBC per il principio attivo GSE alle concentrazioni testate, nei confronti di una carica iniziale del ceppo RB di 10^5 UFC/mL

Macrodiluizione

Per i test di macrodiluizione per la molecola bioattiva GSE possiamo dire che sebbene siano state testati film con un ampio spettro di concentrazione della stessa (0,5% p/v - 1,0% p/v - 2,5% p/v - 5,0% p/v) i risultati non hanno condotto ad alcun esito positivo. Questo è dimostrato dal fatto che ogni qualvolta si procedesse con la conta delle piastre, risultanti dalle 36-48h di incubazione a 30 °C previste dalla metodica MBC in eppendorf, queste possedevano una carica talmente alta da non poter essere numerate. Nonostante sia stato impiegato un biopolimero idrosolubile, quindi in grado di disperdere e rilasciare meglio il principio attivo, il risultato non è stato quello atteso.

4.3.1.2.4 Ossido di zinco

Microdiluizione

Nel test di microdiluizione dei campioni di ossido di zinco tal quale alle concentrazioni 0,1 mg/mL – 0,5 mg/mL – 1,0 mg/mL non sono state ottenute delle considerevoli conclusioni. Dall'elaborazione grafica dei dati ottenuti i risultati non hanno mostrato alcuna coerenza e significatività di comportamento antimicrobico da parte dell'ossido inorganico a nessuna delle

concentrazioni testate. Questo deriva certamente dalla peculiare problematica del composto attivo di essere altamente insolubile. Infatti, l'elevata tendenza ad aggregare e precipitare come sedimento ha interferito con l'analisi turbidimetrica, alterando le letture spettrofotometriche. Per tale ragione abbiamo deciso di proseguire solo con un test di macrodiluizione per meglio verificare l'efficacia per conta diretta in piastra Petri.

Macrodiluizione

Eseguendo la tecnica di macrodiluizione in brodo per i film PLA e PVA attivati con ossido di zinco alle due differenti concentrazioni (0,5 mg/mL – 1,0 mg/mL) e riportando i risultati su un grafico a colonne raggruppate (Fig. 34) è possibile valutare la scarsa efficacia della capacità antimicrobica di questo principio attivo.

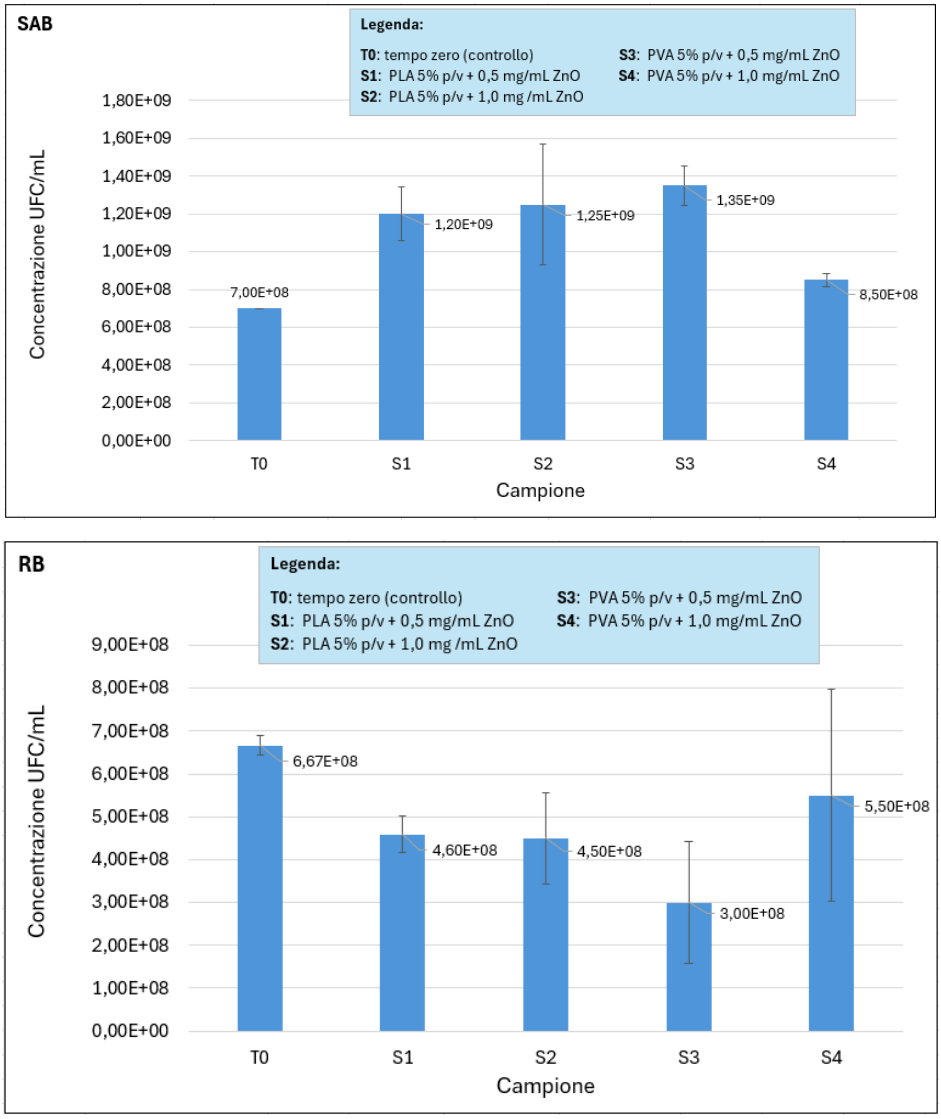


Fig. 34 – Elaborazione delle crescite microbiche in test MBC di campioni polimerici (PLA e PVA) con ossido di zinco, alle note concentrazioni, per entrambi i ceppi di lievito (SAB, grafico sopra; RB, grafico sotto)

Osservando il quadro analitico del ceppo SAB si può evincere che, sulla base del visibile aumento dei valori di concentrazione (UFC/mL) di ciascuna barra, tutti i campioni non sono stati in grado di svolgere alcuna azione inibente nei confronti della carica di lievito iniziale. Per quanto riguarda il ceppo RB, invece, è possibile notare, per tutti i campioni, una minima riduzione di carica rispetto al T0.

5 Discussioni e conclusioni

La presente trattazione sintetizza e rielabora in modo organico le valutazioni critiche e le conclusioni scientifiche emerse dallo studio dedicato allo sviluppo di sistemi di imballaggio attivo destinati al prolungamento della vita commerciale della robiola. L'obiettivo primario della ricerca è stato quello di contrastare il deterioramento precoce del prodotto lattiero-caseario causato dalla proliferazione di lieviti alteranti, identificati con i ceppi target denominatati come SAB e RB, mediante l'incorporazione di molecole bioattive di origine naturale o inorganica all'interno di matrici polimeriche bio-based o biodegradabili. La sperimentazione condotta si è articolata attraverso un percorso metodologico rigoroso, a partire dall'isolamento dei ceppi fungini dalla matrice casearia fino alla verifica dell'efficacia inibitoria e fungicida dei film formulati. L'analisi comparativa delle diverse combinazioni tra polimeri e principi attivi ha messo in luce una profonda dipendenza dell'efficacia microbiocida dalle proprietà chimico-fisiche della matrice e dalla cinetica di rilascio del composto attivo. Quando l'eugenolo è stato incorporato direttamente in poliesteri alifatici idrofobi quali acido polilattico, poliidrossibutirrato-co-esanoato e polibutilen succinato, in concentrazioni variabili tra lo 0,1% p/v e l'1,0% p/v e in assenza di tensioattivi, i film prodotti non hanno mostrato alcuna attività inibitoria nei saggi di diffusione in disco né un'azione batteriostatica efficace nei saggi di diluizione in brodo. Questo fenomeno è probabilmente riconducibile alla forte affinità idrofobica tra la matrice polimerica e la struttura chimica dell'eugenolo che ne impedisce un rilascio sufficiente ad espletare l'azione antimicrobica. Al contrario, l'impiego dell'alcol polivinilico al 5% p/v ha determinato un netto cambio di rotta nei risultati sperimentali. Trattandosi di un polimero idrofilo e idrosolubile, l'alcol polivinilico subisce significativi fenomeni di idratazione e rigonfiamento a contatto con il terreno di coltura o con ambienti ad elevata attività dell'acqua ($\alpha_w > 0,95$), tipici della superficie della robiola. Tale aumento del volume libero intercatena accelera la diffusione dell'eugenolo verso la fase acquosa circostante, generando un rapido rilascio iniziale fondamentale per abbattere l'elevata carica microbica inoculata nei saggi. Un ruolo determinante in questa formulazione efficace è stato svolto dal polisorbato 80, o Tween 80, impiegato in rapporti ponderali pari a 1:1 e 1:0.5 rispetto al principio attivo utilizzato. L'azione combinata dell'omogeneizzazione e della stabilizzazione sterica operata dal tensioattivo ha consentito di formare un'emulsione stabile priva di separazione di fase, permettendo la produzione di film omogenei. Nei saggi di concentrazione

minima fungicida, questa specifica formulazione in alcol polivinilico, eugenolo e Tween 80 ha dimostrato un'eccellente capacità antimicotica, ottenendo un abbattimento significativo della carica iniziale di lieviti. Per contro, le restanti molecole bioattive testate nella ricerca non hanno fornito i risultati sperati per ragioni legate sia alla compatibilità reologica sia alla sensibilità dei ceppi target. L'acido laurico, incorporato sia nell'acido polilattico sia nelle altre matrici polimeriche, è risultato del tutto inattivo nei saggi di inibizione e ha provocato un marcato effetto plastificante e di fragilità strutturale, determinando una forte adesione dei film ai supporti di colata in vetro e rendendo impossibile l'ottenimento di pellicole stabili e manipolabili. L'estratto di semi di pompelmo, provato in concentrazioni comprese tra lo 0,5% p/v e il 5,0% p/v all'interno dell'alcol polivinilico, si è mostrato inefficace nel bloccare lo sviluppo dei ceppi di lievito. Analogamente, le nanoparticelle di ossido di zinco hanno mostrato una debole e trascurabile attività nei confronti del solo ceppo denotato come RB alla concentrazione massima di 1,0 mg/mL, quando incluso in acido polilattico, testimoniando come l'efficacia dei nanomateriali inorganici verso questa classe di microrganismi alteranti sia limitata. In conclusione, lo studio condotto evidenzia come il successo di un imballaggio attivo dipenda in modo cruciale dall'armonizzazione termodinamica e cinetica tra polimero, principio attivo, tensioattivo e matrice alimentare target, identificando nel film di alcol polivinilico addizionato con eugenolo ed emulsionato con Tween 80 la soluzione ottimale e pienamente rispondente ai requisiti di sostenibilità e sicurezza normativa.

In un'ottica di futura ingegnerizzazione industriale, si raccomanda di superare le limitazioni legate all'elevata idrosolubilità dell'alcol polivinilico sviluppando strutture multistrato co-estruse o laminate, in cui lo strato attivo interno in alcol polivinilico sia protetto da strati esterni in poliesteri idrofobi come acido polilattico o polibutilen succinato, garantendo così stabilità meccanica e barriera all'umidità. Contestualmente, sarà opportuno procedere alla validazione diretta dell'efficacia microbiocida tramite challenge test su forme di robiola conservate in condizioni di refrigerazione reale, monitorando nel tempo i parametri microbici, organolettici e la produzione di gas all'interno della confezione.

Proiettando i risultati ottenuti in una prospettiva di ricerca avanzata, il futuro del confezionamento attivo bio-based per matrici lattiero-casearie risiede nell'ottimizzazione dei processi di conversione polimerica e nell'integrazione di sistemi di incapsulamento molecolare. La principale sfida tecnologica consisterà nel guidare il passaggio dalla scala di laboratorio, basata sul colaggio da soluzione (solvent casting), alle tecnologie di

trasformazione industriale quali l'estrusione e la co-estrusione, preservando la stabilità termica di molecole attive volatili e termolabili come l'eugenolo durante i cicli termomeccanici di processo. Infine, l'effettiva scalabilità di tali imballaggi dovrà integrarsi con rigorose valutazioni del ciclo di vita (Life Cycle Assessment) e con la verifica della compostabilità in impianto, nell'ottica di valorizzare scarti e sottoprodotti delle filiere agroalimentari per l'estrazione di nuove molecole funzionali, garantendo un'autentica sostenibilità circolare conforme alle stringenti normative europee sui materiali destinati al contatto alimentare.

Bibliografia

- *A.M. Hezma, A. Rajehb, Mohammed A. Manna, An insight into the effect of zinc oxide nanoparticles on the structural, thermal, mechanical properties and antimicrobial activity of Cs/PVA composite, Colloids and Surfaces, vol.581, 2019.*
- *Abbas Abel Anzaku, Josiah Ishaku Akyala, Adeola Juliet and Ewenighi Chinwe Obianuju, Antibacterial Activity of Lauric Acid on Some Selected Clinical Isolates, Annals of Clinical and Laboratory Research, vol.5, 2017.*
- *Ahmed A. Oun, Jong-Whan Rhim, Preparation of multifunctional carboxymethyl cellulose-based films incorporated with chitin nanocrystal and grapefruit seed extract, International Journal of Biological Macromolecules, vol.152, 2020.*
- *Alex Baker, David Joseph, John R. Smith e Michael A. Taylor, Safety assessment of polyvinyl alcohol (PVA) as a packaging material for food contact applications, Food Additives and Contaminants, vol.29:A, 2012.*
- *Anees Ahmed Khalil, Ubaid Rahman, Moazzam Rafiq Khan, Amna Sahar,Tariq Mehmood and Muneeb Khan, Essential oil eugenol: sources, extraction techniques and nutraceutical perspectives, Royal Society of Chemistry, vol.7, 2017.*
- *Anjani P. Nagvenkar, Archana Deokar, Ilana Perelshtein, Aharon Gedanken; A one-step sonochemical synthesis of stable ZnO–PVA nanocolloid as a potential biocidal agent, Journal of Materials Chemistry, vol.4, 2016.*
- *Anwar F., Naseer R., Bhanger M.I., Ashraf S., Talpur F.N., Aladedunye F.A., Physico-chemical characteristics of citrus seeds and seed oils from Pakistan, J. Am. Oil Chem. Soc., vol.85, 2008.*
- *Appendini, P., & Hotchkiss, J. H., Review of antimicrobial food packaging, Innovative Food Science & Emerging Technologies, vol.3, 2002.*
- *Arthur L. Barry, William A. Craig, Harriette Nadler, L. Barth Reller, Christine C. Sanders, Jana M. Swenson, Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline, NCCLS M26-A, vol.19, 1999.*
- *Auras R., Harte B., Selke S., An overview of polylactides as packaging materials. Macromol. Biosci., vol.4, 2004.*

- *Balaguer MP, Gómez-Estaca J, Gavara R, Hernandez-Munoz P, Biochemical properties of bioplastics made from wheat gliadins cross-linked with cinnamaldehyde, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol.59, 2011*.
- *Benjatham Sukkaneewat, Kamonchai Cha-aim, Sirijutaratana Covavisaruch, Phisut Naknaen, Jakkid Sanetuntikul and Nawadon Petchwattana, Antimicrobial film from poly(butylene succinate) and cymophenol as a sustainable approach to food waste reduction: antimicrobial properties and its effects on soil microorganism, brine shrimp (Artemia salina) and fresh strawberry, Journal of Biological Engineering, vol.19, 2025*.
- *Bruna Lallo da Silva, Marina Paiva Abuçafy, Eloisa Berbel Manaia, João Augusto Oshiro Junior, Bruna Galdorfini Chiari-Andréo, Rosemeire CL, R Pietro & Leila Aparecida Chiavacci, Activity Of Zinc Oxide Nanoparticles: An Overview, International Journal of Nanomedicine, vol.14, 2019*.
- *C.C. DeMerlis, D.R. Schoneker, Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA), Food and Chemical Toxicology, vol.41, 2003*.
- *Caio G. Otoni, Márcia R. de Moura, Fauze A. Aouada, Geany P. Camilloto, Renato S. Cruz, Marcos V. Lorevice, Nilda de F.F. Soares, Luiz H.C.Mattoso, Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papaya puree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films, Food Hydrocolloids, vol.41, 2014*.
- *Carolina E. Realini, Begonya Marcos, Active and intelligent packaging systems for a modern society, Meat Science, Sustainability & Innovation: 60th International Congress of Meat Science and Technology, 2014*.
- *Chang C., and M. T. Nickerson, Effect of Protein and GlycerolConcentration on the Mechanical, Optical, and Water Vapor BarrierProperties of Canola Protein Isolate-Based Edible Films, Food Scienceand Technology International, vol.21, 2015*.
- *Darie-Nita R.N., Irimia A., Doroftei F., Stefan, L.M., Iwanczuk A., Trusz A., Bioactive and Physico-Chemical Assessment of Innovative Poly(lactic acid)-Based Biocomposites Containing Sage, Coconut Oil, and Modified Nanoclay, Int. J. Mol. Sci., vol.24, 2023*.
- *Dario Dainelli, Nathalie Gontard, Dimitrios Spyropoulos, Esther Zondervan-van den Beuken, Paul Tobback, Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns, Trends in Food Science & Technology, vol.19, 2008*.

- *Desbois A.P. & Smith V.J, Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential, Appl Microbiol Biotechnol, vol.85, 2010.*
- *Dintcheva, N.T., D'Anna, F., Anti-/Pro-Oxidant Behavior of Naturally Occurring Molecules in Polymers and Biopolymers: A Brief Review, ACS Sustain. Chem. Eng., 2019.*
- *Dong Sun Lee, Kit L. Yam, Luciano Piergiovanni, Food Packaging Science and Technology, 2008.*
- *E. Maurizzi, F. Bigi, A. Quartieri, R. De Leo, L. A. Volpelli, and A. Pulvirenti, "The Green Era of Food Packaging: General Considerations and New Trends", MDPI, 2022.*
- *Eloff J.N., A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. Planta Med, vol.64, 1998.*
- *Elsabee, M. Z., & Abdou, E. S., Chitosan based edible films and coatings: A review, Materials Science and Engineering: C, vol.33, 2013.*
- *Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging, Lorena Atarés, Amparo Chiralt, Trends in Food Science & Technology, vol.48, 2016.*
- *Ewa Olewnik-Kruszkowska, Martina Ferri, Paola Fabbri, Micaela Degli Esposti, Agnieszka Richert, Paola Fabbri, Innovative Biobased Active Composites of Cellulose Acetate Propionate with Tween 80 and Cinnamic Acid for Blueberry Preservation, Polymers, 2025.*
- *Febri Nitbani, Putra Jiwamurwa Pama Tjitda, Fidelis Nitti, Jumina Jumina, Annytha Ina Rohi Detha, Antimicrobial Properties of Lauric Acid and Monolaurin in Virgin Coconut Oil: A Review, ChemBioEng Reviews, Wiley and Gesellschaft Deutscher Chemiker, vol.9, 2022.*
- *Febri Odel Nitbani, Jumina, Dwi Siswanta, Eti Nurwening Solikhah, Isolation and Antibacterial Activity Test of Lauric Acid from Crude Coconut Oil (Cocos nucifera L.), Procedia Chemistry, vol.18, 2016.*
- *Frank A. Paine, Heather Y. Paine, A Handbook of Food Packaging, II ed., 1992.*
- *G. Fernandez-Bunster and P. Pavez, Novel Production Methods of Polyhydroxyalkanoates and Their Innovative Uses in Biomedicine and Industry, Molecules, vol.27, 2022.*
- *Gemili, S.; Yemenicio˘glu, A.; Altınkaya, S.A., Development of Cellulose Acetate Based Antimicrobial Food Packaging Materials for Controlled Release of Lysozyme, J. Food Eng., 2009.*

- *Gordon L. Robertson Food packaging Principles and Practise, CRC press, III ed., 2012.*
- *Guy Applerot, Anat Lipovsky, Rachel Dror, Nina Perkas, Yeshayahu Nitzan, Rachel Lubart, and Aharon Gedanken, Enhanced Antibacterial Activity of Nanocrystalline ZnO Due to Increased ROS-Mediated Cell Injury, Advanced Functional Materials, Wiley, vol.19, 2009.*
- *H. B. Jadhav and U. S. Annapure, Triglycerides of medium-chain fatty acids: a concise review, Journal of Food Science and Technology, vol.60, 2023.*
- *H. Haghighi, F. Licciardello, P. Fava, H. W. Siesler, and A. Pulvirenti, Recent advances on chitosan-based films for sustainable food packaging applications, Elsevier Ltd, 2020.*
- *Hai Zhang, Mercedes Hortal, Maria Jorda-Beneyto, Estela Rosa, Marta Lara-Lledo, Inmaculada Lorente, ZnO-PLA nanocomposite coated paper for antimicrobial packaging application, LWT - Food Science and Technology, vol.78, 2017.*
- *Hajer Aloui, Khaoula Khwaldia, Laura Sánchez-González, Laurence Muneret, Carole Jeandel, Moktar Hamdi, Stéphane Desobry, Alginate coatings containing grapefruit essential oil or grapefruit seed extract for grapes preservation, International Journal of Food Science and Technology, vol.49, 2014.*
- *Henry Thurber and Greg W. Curtzwiler, Suitability of poly(butylene succinate) as a coating for paperboard convenience food packaging, International Journal of Biobased Plastics, vol.2, 2020.*
- *Hojatoleslami M., Hamed Ahari, Kambiz Larijani, Anousheh Sharifan, Preservation effect of Lippia citriodora and Laurus nobilis nanoemulsions incorporated with polylactic acid composite film for rainbow trout fillet packaging, Food Science and Technology, vol.42, 2022.*
- *Hu Q., Zhou M., Wei S., Progress on the antimicrobial activity research of clove oil and eugenol in the food antisepsis field, J Food Sci, vol.10, 2018.*
- *Hyldgaard M., Mygind T., Meyer R.L., Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components, Frontiers in Microbiology, vol.3, 2012.*
- *Ishrat Gowsia, Feroz A. Mir, Javid A. Banday, Preparation and characterization of polyvinyl alcohol–piperic acid composite film for potential food packaging applications, Progress in Biomaterials, vol.11, 2022.*

- *J.R. Dorgan, H. Lehermeier, M. Mang, Thermal and rheological properties of commercial-grade poly (lactic acid), J. Polym. Environ., vol.8, 2000.*
- *Jainabh Kerosenewala, Parth Vaidya, Vedant Ozarkar, Yogita Shirapure, Aarti P. More, Eugenol: Extraction, Properties, and Applications in Incorporation with Polymers and Resins – A Review, Polymer Bulletin, vol.80, 2022.*
- *Jamshidian M., Elmira Arab Tehrany, Stéphane Desobry, Antioxidants Release from Solvent-Cast PLA Film: Investigation of PLA Antioxidant-Active Packaging, Food Bioprocess Technol, vol.6, 2013.*
- *Jan Borovansky and Patrick A. Riley, Cytotoxicity of zinc in vitro, Chem. -BioL Interactions, vol.69, 1989.*
- *Jeong, E.W.; Baek, Y.; Lee, H.G. Development of propolis extract-loaded nanoparticles with chitosan and hyaluronic acid for improving solubility and stability. LWT-Food Science and Technology, vol.181, 2023.*
- *Joaquin Gòmez-Estaca, Carol Lopez-de-Dicastillo, Pilar Hernandéz-Munoz, Ramòn Catal, Rafael Gavara, Advances in antioxidant active food packaging, Trends in Food Science & Technology, vol.35, 2014.*
- *John C. Bartlett, Chloramphenicol, Medical Clinics of North America, vol.66, 1982.*
- *Jonas Hilbig, Qiumin Ma, P. Michael Davidson, Jochen Weissa, Qixin Zhong, Physical and antimicrobial properties of cinnamon bark oil co-nanoemulsified by lauric arginate and Tween 80, International Journal of Food Microbiology, 2016.*
- *Joongmin Shin, Susan E.M. Selke, Food Processing: Principles and Applications, 2014.*
- *Juan Ivorra-Martinez, Isabel Verdu, Octavio Fenollar, Lourdes Sanchez-Nacher, Rafael Balart and Luis Quiles-Carrillo, Manufacturing and Properties of Binary Blend from Bacterial Polyester Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) and Poly(caprolactone) with Improved Toughness, Polymers, MDPI, vol.12, 2020.*
- *Julia Pasquet, Yves Chevalier, Emmanuelle Couval, Dominique Bouvier, Marie-Alexandrine Bolzinger, Zinc oxide as a new antimicrobial preservative of topical products: Interactions with common formulation ingredients, International Journal of Pharmaceutics, vol.479, 2015.*
- *K. Y. Perera, A. K. Jaiswal, and S. Jaiswal, Biopolymer-Based Sustainable Food Packaging Materials: Challenges, Solutions, and Applications, MDPI, 2023.*

- *Kehong Hou, Yaoyao Xu, Kaiyue Cen, Chengcheng Gao, Xiao Feng, Xiaozhi Tang, Nanoemulsion of cinnamon essential oil Co-emulsified with hydroxypropyl-β-cyclodextrin and Tween-80: Antibacterial activity, stability and slow release performance, Food Bioscience, 2021*.
- *Kerim Eraslan, Clizia Aversa Annamaria Gisario, Mohammadreza Nofar, Reza Salehiyan, Yonca Alkan Goksu, Massimiliano Barletta, Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBH): Synthesis, properties, and applications - A review, European Polymer Journal, vol.167, 2022*.
- *Khan S., Monteiro J.K., Prasad A., Filipe C.D., Li Y., Didar T.F., Material Breakthroughs in Smart Food Monitoring: Intelligent Packaging and On-Site Testing Technologies for Spoilage and Contamination Detection, Adv. Mater., vol.36, 2023*.
- *Kumari S.V.G., Kannan Pakshirajan, G. Pugazhenthi, Recent advances and future prospects of cellulose, starch, chitosan, polylactic acid and polyhydroxyalkanoates for sustainable food packaging applications, International Journal of Biological Macromolecules, vol.221, 2022*.
- *Lipovsky A., Nitzan Y., Gedanken A., Lubart R., Antifungal activity of ZnO nanoparticles-the role of ROS mediated cell injury, Nanotechnology, vol.22, 2011*.
- *Liu Y., He L., Mustapha A., Li H., Hu Z.Q. and Lin M., Antibacterial activities of zinc oxide nanoparticles against Escherichia coli O157:H7. Journal of Applied Microbiology, vol.107, 2009*.
- *Lockhart H.E., A paradigm for packaging, Packaging Technology and Science, vol. 10, 1997*.
- *Long-Feng Wang, Jong-Whan Rhim, Grapefruit seed extract incorporated antimicrobial LDPE and PLA films: Effect of type of polymer matrix, LWT - Food Science and Technology, vol.74, 2016*.
- *Luciana Gavernet, María Victoria Defain Tesoriero, Gustavo A. Abraham e Laura B. Valenti, Poly(vinyl alcohol) films for active food packaging: Release kinetics of active compounds and swelling behavior in food simulants, Journal of Applied Polymer Science, vol.138, 2021*.
- *Luo, K., Lee, D.-H., Adra, H. J., & Kim, Y.-R., Synthesis of monodisperse starch microparticles through molecular rearrangement of short-chain glucans from natural waxy maize starch, Carbohydrate Polymers, vol.218, 2019*.

- *Luo, K., Zhu, X., & Kim, Y.-R., Short-chain glucan self-assembly for green synthesis of functional biomaterials: Mechanism, synthesis, and microstructural control, Carbohydrate Polymers, vol.318, 2023.*
- *M. Angane, S. Swift, K. Huang, C. A. Butts, and S. Y. Quek, Essential Oils and Their Major Components: An Updated Review on Antimicrobial Activities, Mechanism of Action and Their Potential Application in the Food Industry, Foods, vol.11, 2022.*
- *M. P. Arrieta, M. D. Samper, M. Aldas, and J. López, On the use of PLA-PHB blends for sustainable food packaging applications, MDPI, 2017.*
- *Mak K.K., Kamal M.B., Ayuba S.B., Sakirolla R., Kang Y.B., Mohandas K., Balijepalli M.K., Ahmad S.H., Pichika M.R., A comprehensive review on eugenol's antimicrobial properties and industry applications: A transformation from ethnomedicine to industry, Phcog. Rev., vol.13, 2019.*
- *Marius Murariu, Awa Doumbia, Leila Bonnaud, Anne-Laure Dechief, Yoann Paint, Manuela Ferreira, Christine Campagne, Eric Devaux, Philippe Dubois, High-Performance Polylactide/ZnO Nanocomposites Designed for Films and Fibers with Special End-Use Properties, Biomacromolecules, vol.12, 2011.*
- *Markus Manzera, Anita Aberham and Hermann Stuppner, Development and Validation of an HPLC/UV/MS Method for Simultaneous Determination of 18 Preservatives in Grapefruit Seed Extract, anJournal of Agricolture and Food Chemistry, vol.54, 2006.*
- *Matteo Gigli, Martina Fabbri, Nadia Lottia, Rita Gamberini, Bianca Rimini, Andrea Munari, Poly(butylene succinate)-based polyesters for biomedical applications: A review, European Polymer Journal, vol.75, 2016.*
- *Mohd Shoeb, Braj Raj Singh, Javed Khan, Wasi Khan, Brahma N Singh, Harikesh Bahadur Singh, Alim H Naqvi, ROS-dependent anticandidal activity of zinc oxide nanoparticles synthesized by using egg albumen as a biotemplate. Adv Nat Sci., vol.4, 2013.*
- *N. Petchwattana, S. Covavisaruch, S. Wibooranawong, P. Naknaen, Antimicrobial food packaging prepared from poly(butylene succinate) and zinc oxide, Measurement, vol.93, 2016.*
- *N.P. Rybalchenko, L.L. Mozhaeva, V.L. Demchenko, D.V. Kunytskyi, V.B. Dolgoshey, O.K. Voronina, N.M. Matvienko, Antimicrobial Activity Of Polymer Hydrogels Based On Polyvinyl Alcohol and ZnO Nanoparticles, Microbiological Journal, vol.6, 2025.*

- *Nanou Peelman, Peter Ragaert, Bruno De Meulenaer, Dimitri Adons, Roos Peeters, Ludwig Cardon, Filip Van Impe, Frank Devlieghere, Application of bioplastics for food packaging, Trends in Food Science & Technology, vol.32, 2013.*
- *Natércia C.T. Martins, Carmen S.R. Freire, Carlos Pascoal Neto, Armando J.D. Silvestre, Jessica Causio, Giovanni Baldi, Patrizia Sadocco, Tito Trindade, Antibacterial paper based on composite coatings of nanofibrillated cellulose and ZnO, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, vol.417, 2013.*
- *Nejib Kasmi, Mustapha Majdoub, George Z. Papageorgiou, Dimitrios N. Bikiaris, Synthesis and crystallization of new fully renewable resources-based copolyesters: Poly(1,4-cyclohexanedimethanol-co-isosorbide 2,5-furandicarboxylate), Polymer Degradation and Stability, vol.152, 2018.*
- *Olaide Olawunmi Ajibola, Nutritional composition and bioactive properties of tropical coconut palm fruit with functional food applications, Ajibola Discover Food, vol.6, 2026.*
- *P. Cazón, G. Velazquez, J. A. Ramírez, and M. Vázquez, Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review, Food Hydrocoll., vol.68, 2017.*
- *P. Suppakul, J. Miltz, K. Sonneveld, S.W. Bigger, Active Packaging Technologies with an Emphasis on Antimicrobial Packaging and its Applications, Journal of Food Science, vol.68, 2003.*
- *Pankaj Jha, Effect of grapefruit seed extract ratios on functional properties of corn starch chitosan bionanocomposite films for active packaging, International Journal of Biological Macromolecules, vol.163, 2020.*
- *Pankey G. A., & Sabath L. D., CLSI M26-A, Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents, Clinical Infectious Diseases, 2004.*
- *Patricia Cazón, Gonzalo Velazquez, José A. Ramírez, Manuel Vázquez, Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review, Food Hydrocolloid, vol.68, 2017.*
- *Paula Judith Perez Espitia, Nilda de Fátima Ferreira Soares, Jane Sélia dos Reis Coimbra, Nélio José de Andrade, Renato Souza Cruz & Eber Antonio Alves Medeiros, Zinc Oxide Nanoparticles: Synthesis, Antimicrobial Activity and Food Packaging Applications, Food Bioprocess Technologies, vol.5, 2012.*
- *Paulraj Kanmani, Jong-Whan Rhim, Development and characterization of carrageenan/grapefruit seed extract composite films for active packaging, International Journal of Biological Macromolecules, vol.68/102, 2014.*

- *Philip, S., Keshavarz, T., & Roy, I., Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications, Journal of Chemical Technology & Biotechnology, vol.82, 2007.*
- *Picot-Allain, M. C. N., and M. N. Emmambux, Isolation, Char-acterization, and Application of Nanocellulose From Agro-IndustrialBy-Products: A Review, Food Reviews International, vol.39, 2023.*
- *Pinto T.J.A., Kaneko T.M., Ohara M.T., Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos, São Paulo: Atheneu Editora, II ed., 2003.*
- *R. Turco, G. Santagata, I. Corrado, C. Pezzella, M. Di Serio, In vivo and post- synthesis strategies to enhance the properties of PHB-based materials: a review, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, vol.8, 2021.*
- *Raghupathi KR, Koodali RT, Manna AC. Size-dependent bacterial growth inhibition and mechanism of antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles, Langmuir, vol.27, 2011.*
- *Rajashekaraiah K.R., Rice T., Rao, V.S., Marsh D., Ramakrishna B., Kallick C.A., Clinical significance of tolerant strains of Staphylococcus aureus in patients with Endocarditis, Ann Intern Med, vol.93, 1980.*
- *Rigved Nagarkar and Jatin Patel, Polyvinyl Alcohol: A Comprehensive Study, Acta Scientific Pharmaceutical Sciences, vol.3, 2019.*
- *Roberta Brayner, Roselyne Ferrari-Iliou, Nicolas Brivois, Shakib Djediat, Marc F. Benedetti and Fernand Fiévet, Toxicological Impact Studies Based on Escherichia coli Bacteria in Ultrafine ZnO Nanoparticles Colloidal Medium, Nano Letters, vol.6, 2006.*
- *Rodríguez-Roque M. J., R. Sánchez-Vega, R. Pérez-Leal, M. C. Soto-Caballero, N. A. Salas-Salazar and M. A. Flores-Córdova, By-Products From Oilseed Processing and Their Potential Applications, Oil and Oilseed Processing, 1st ed., 2021.*
- *Roland Geyer, Jenna R. Jambeck, and Kara Lavender Law, Production, use, and fate of all plastics ever made, ScienceAdvances, vol.3, 2017.*
- *S. Ayu Rafiqah, AbdanKhalina, Ahmad Saffian Harmaen, Intan Amin Tawakkal, Khairul Zaman, M. Asim, M.N. Nurrazi and Ching Hao Lee, A Review on Properties and Application of Bio-Based Poly(Butylene Succinate), Polymers, MDPI, vol.13, 2021.*
- *Sahm D.F., Washington J.A., Balows A., Hauser W.J., Hermann K.L., Isenberg H.D.; Shamody H.J., Antibacterial susceptibility tests: Dilution methods, Manual of clinical microbiology. V ed., 1991.*

- *Sakshi Jasrotia, Sonali Gupta, Yashoda Malgar Puttaiahgowda, Anna Baborski, Recent advances in polylactic acid (PLA)- based sustainable food packaging: A comprehensive review, bApplied Food Research, Applied Food Research, vol.6, 2026*.
- *Sandra Cristina de Oliveira, Maria Inês Ré, Maria Helena Andrade Santana, Swelling and bioadhesive properties of poly(vinyl alcohol) hydrogels and their relation to the release kinetics of water-soluble active compounds, International Journal of Pharmaceutics, vol. 473, 2014*.
- *Sängerlaub S., Brüggemann M., Rodler N., Jost V., Bauer K.D., Extrusion Coating of Paper with Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV)-Packaging Related Functional Properties, Coatings, MDPI, vol.9, 2019*.
- *Selçuk Yildirim, Bettina Röcker, Marit Kvalvåg Pettersen, Julie Nilsen-Nygaard, Zehra Ayhan, Ramune Rutkaite, Tanja Radusin, Patrycja Suminska, Begonya Marcos, Véronique Coma, Active Packaging Applications for Food, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2017*.
- *Sharifzadeh A., Shokri H., In vitro synergy of eugenol on the antifungal effects of voriconazole against Candida tropicalis and Candida krusei strains isolated from the genital tract of mares, Equine Vet. J., vol.53, 2021*.
- *Shubhajit Sarkhel, Samandeep Kaur, Rahul Das, Aditi Sharma, Ankan Kheto, Debapam Saha, Yogesh Kumar, Antimicrobial active packaging with biopolymers and natural extracts: sustainable solutions and technological challenges, Sustainable Food Technology, 2025*.
- *Skrivanova E, Marounek M, Dlouha G, Kanka J, Susceptibility of Clostridium perfringens to C2–C18 fatty acids, Lett Appl Microbiol, vol.41, 2005*.
- *Suddhasattya Dey, Dibya lochan Mohanty, Noota Divya, Vasudha Bakshi, Anshuman Mohanty, Deepankar Rath, Sriparni Das, Arijit Mondal, Sourav Roy, Rajarshee Sabui A critical review on zinc oxide nanoparticles: Synthesis, properties and biomedical applications, Intelligent Pharmacy, vol.3, 2025*.
- *Swarup Roy, Jong-Whan Rhim, Antioxidant and antimicrobial poly(vinyl alcohol) -based films incorporated with grapefruit seed extract and curcumin, Journal of Environmental Chemical Engineering, vol.9, 2021*.

- *Swarup Roy, Wanli Zhang, Deblina Biswas, Rejish Ramakrishnan and Jong-Whan Rhim, Grapefruit Seed Extract-Added Functional Films and Coating for Active Packaging Applications: A Review, Molecules, vol.28, 2023.*
- *Taylor P.C., Schoenknecht F.D., Sherris J.C., Linner E.C., Determination of minimum bactericidal concentrations of oxacillin for Staphylococcus aureus: influence and significance of technical factors. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol.23, 1983.*
- *Tazib Rahaman Syed, Anuradha Kumari, Muhammed R. Sharaby, Lily Jaiswal, Stephane Salmieri, Monique Lacroix, Development of ZnO-Incorporated plasticized PLA nanocomposite films with enhanced physicochemical and antimicrobial properties, vol.83, 2025.*
- *Terry Kim, Jin-Hee Kim, Se-Wook Oh, Grapefruit Seed Extract as a Natural Food Antimicrobial: a Review, Food and Bioprocess Technology, vol.14, 2021.*
- *Thilini Dissanayake, Vidheesha Abeysinghe, Cristina Chairez-Jimenez, Santhosh Ravichandran Nandika Bandara, Advances in Pulse and Oil Seed Industry Coproduct-DerivedSustainable Food Packaging: Biopolymers, Additives,Processing Technologies and Functional Applications, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, vol.25, 2026.*
- *Thoroski J., Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by Bacillus cereus, J.Food Prot, vol.52, 1989.*
- *Ulanowska M., Olas B., Biological Properties and Prospects for the Application of Eugenol—A Review, International Journal of Molecular Science, vol.22, 2021.*
- *Umer Rashid, Muhammad Ibrahim, Shahid Yasin, Robiah Yunus, Y.H. Taufiq-Yap, Gerhard Knothe, Biodiesel from Citrus reticulata (mandarin orange) seed oil, a potential non-food feedstock, Industrial Crops and Products, vol.45, 2013.*
- *Valentina Siracusa, Pietro Rocculi, Santina Romani, Marco Dalla Rosa, Biodegradable polymers for food packaging: a review, Trends in Food Science & Technology, vol.19, 2008.*
- *Vibhuti Sharma, Rutika Sehgal, Reena Gupta, Polyhydroxyalkanoate (PHA): Properties and Modifications, Polymer, vol.212, 2021.*
- *Vilela C., Kuncova-Kallio J., Shikata T., Sonni S., Illa A., Garcia-Roman M., & Freire, C. S., Polymers and nanomaterials for packaging applications, Nanomaterials for Food Packaging, 2018.*

- *Vivek Devidas Mahale & Sonali Sharma, Evaluation of minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of royal jelly against Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, and Candida albicans, Journal of Conservative Dentistry and Endodontics, vol.27, 2024.*
- *Wendakoon C. N. and Morihiko S., Inhibition of amino acid decarboxylase activity of Enterobac ter aerogenes by active components in spices. J. Food Prot, vol.58, 1995.*
- *Winnacker M., Polyhydroxyalkanoates:recent advances in their synthesis and applications, European Journal of Lipid Science and Technology, vol.121, 2019.*
- *Xueying Huang, Xiaohan Ge, Liping Zhou, Yi Wang, Eugenol embedded zein and poly(lactic acid) film as active food packaging: Formation, characterization, and antimicrobial effects, Food Chemistry, vol.384, 2022.*
- *Y.M. Corre, S. Bruzaud, J.L. Audic, Y. Grohens, Morphology and functional properties of commercial polyhydroxyalkanoates: a comprehensive and comparative study, Polymer Testing, vol.31, 2012.*
- *Y.M. Tan, S.H. Lim, B.Y. Tay, M.W. Lee, E.S. Thian, Functional chitosan-based grapefruit seed extract composite films for applications in food packaging technology, Materials Research Bulletin, vol.69, 2015.*
- *Yanping Xie, Yiping He, Peter L. Irwin, Tony Jin and Xianming Shi, Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Zinc Oxide Nanoparticles against Campylobacter jejuni, Applied and Environmental Microbiology, vol.77, 2011.*