

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente Dipartimento di
Medicina Animale, Produzioni e Salute.

TESI DI LAUREA MAGISTRALE IN SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

SVILUPPO E CARATTERIZZAZIONE DI BIOFILMS A BASE DI CHERATINA PER APPLICAZIONI FUTURE DI PACKAGING ALIMENTARE OTTENUTO DA SCARTI DELL'INDUSTRIA AGROALIMENTARE

Relatore: Prof. Lorenzo Favaro

Correlatore: Prof. Giulio Lupidi

Dott. Alessandro Guzzini

Prof. Luca Vitali

Dott. Marco Antonini

Laureanda: Silvia Guidolin

Matricola n. 2006614

*Un ringraziamento speciale al Dott. Cavinato
che mi ha consigliato e indirizzato
a svolgere questo periodo di tesi,
il mio relatore e i correlatori
che mi hanno supportato durante questo percorso.
Dedico questo traguardo alla mia famiglia per avermi
sostenuto in tutti questi anni di studio.*

INDICE

RIASSUNTO	IV
ABSTRACT.....	VI
1. INTRODUZIONE	1
1.1. Il packaging alimentare.....	1
1.1.1. Breve evoluzione del packaging.....	1
1.1.2. Definizioni, funzioni e normativa vigente.....	3
1.1.3. Packaging alimentare attivo	6
1.1.4. Packaging: rifiuti e norme sul riciclo di materiale plastico.....	9
1.1.5. Shelf-life di prodotto e i fattori che la determinano	13
1.2. Economia circolare al servizio del packaging	17
1.2.1. Che cos'è l'economia circolare?	17
1.2.2. Materiali agroalimentari di scarto industriale riutilizzabili.....	20
1.2.3. Biopolimeri.....	23
1.2.4. La cheratina da lana ovina e piume avicole.....	27
1.3. Antiossidanti naturali come componenti di packaging	33
1.3.1. Cos'è un antiossidante naturale?	33
1.3.2. I polifenoli	35
1.3.3. <i>Salvia libanotica</i>	37
2. SCOPO DELLA TESI	40
3. MATERIALI E METODI.....	42
3.1. Materiali	42
3.2. Estrazioni degli oli essenziali di <i>S. libanotica</i>	43
3.2.1. Estrazioni etanolo/acqua.....	43
3.2.2. Estrazioni per infusione.....	44

3.3. Estrazione della cheratina da piume	45
3.3.1. Estrazione della cheratina utilizzando il Metabisolfito	45
3.3.2. Estrazione della cheratina di piume utilizzando NaOH	46
3.4. Formazione del materiale plastico.....	47
3.5. Quantificazione dei composti antiossidanti presenti negli EO	49
3.5.1. ABTS (Radical Cation Scavenging assay)	49
3.5.2. FRAP (Ferric Reducing Antiox Power Assay)	51
3.5.3. TPC (Total Phenolic Content).....	52
3.6. Caratterizzazione fisico-chimica del materiale plastico	53
3.6.1. Microscopia elettronica a scansione (SEM)	53
3.6.2. Spettroscopia Raman	54
3.6.3. Spettroscopia ad infrarossi (IR).....	55
3.6.4. Misurazione del grado igroscopico rispetto all'acqua.....	56
3.6.5. Misurazione della solubilità in acqua	56
3.6.6. Misurazione del rilascio di antiossidanti da parte dei biofilm.....	57
3.6.7. Proprietà meccaniche: resistenza alla trazione	58
3.7. Inibizione microbica da parte dei componenti attivi del materiale plastico.....	59
3.7.1. Crescita di <i>S. aureus</i> e <i>K. pneumoniae</i> su gelatina e cheratina di piume	59
3.7.2. Valutazione inibizione microbica dei biofilm	62
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	64
4.1. Quantificazione delle sostanze antiossidanti negli estratti di <i>S. libanotica</i>.....	64
4.2. Materiale plastico realizzato	65
4.3. Caratterizzazione fisico-chimica del materiale plastico	69
4.3.1. Microscopia elettronica a scansione (SEM)	69
4.3.2. Analisi dei campioni mediante spettroscopia Raman.....	72
4.3.3. Analisi dei campioni mediante spettroscopia ad infrarossi (IR)	73

4.3.4. Analisi del grado igroscopico rispetto all'acqua	81
4.3.5. Risultati della solubilità dei biofilm in acqua.....	85
4.3.6. Rilascio di antiossidanti da parte dei biofilm	86
4.3.7. Resistenza alla trazione (Tensile-test).....	89
4.4. Risultati dell'attività di inibizione microbica dei biofilm.....	90
4.4.1. Crescita di <i>S. aureus</i> e <i>K. pneumoniae</i> su gelatina e cheratina di piume	90
5. CONCLUSIONI.....	96
6. BIBLIOGRAFIA.....	101

RIASSUNTO

Dopo anni di consumismo e produzione di materiali derivati da fonti inorganiche, oggi il nostro pianeta risulta sommerso da rifiuti plastici. È giunto il momento di cambiare direzione ponendo maggior attenzione a cosa gettiamo e dove lo gettiamo. Se nel nostro piccolo ogni cittadino può contribuire alla raccolta attenta dei rifiuti, a livello mondiale è necessario incrementare la ricerca per la produzione di materiali ecosostenibili che possano sostituire la maggior causa di inquinamento, la plastica, e valorizzare le potenzialità dei rifiuti industriali in modo da riciclare tutto ciò che invece viene gettato.

Proprio per questo motivo l'Unione Europea nel 2019 ha presentato un piano d'azione per incentivare l'economia circolare, cioè un'economia che vada a sostituire quella tradizionale basata sulla produzione, l'utilizzo e il gettare e focalizzata sull'innovazione, riduzione dei consumi e degli sprechi, ponendo attenzione soprattutto sulla valorizzazione degli scarti industriali creando nuova vita ai rifiuti.

L'obiettivo di questo studio è lo sviluppo di un biofilm plastico realizzato con degli scarti dell'industria agroalimentare con lo scopo di poterlo utilizzare in sostituzione della plastica per la produzione di un packaging alimentare funzionale. Lo scarto utilizzato per lo sviluppo di tale materiale è la cheratina, un polimero molto interessante perché oltre ad essere una delle proteine maggiormente presenti nel mondo animale, quindi facilmente reperibile da sottoprodotti di macellazione della carne, detiene anche delle proprietà fisico-chimiche diverse da altre proteine. Infatti, la cheratina è estremamente resistente all'acqua e al calore ed è molto stabile e plastica a seconda del suo contenuto di ponti disolfuro. La cheratina utilizzata in questo lavoro è stata estratta di piume di pollo che costituiscono un rifiuto dell'industrie agroalimentari e il loro smaltimento contribuisce all'inquinamento ambientale. Le caratteristiche idrofobiche di tale proteina estratta potrebbero contribuire positivamente alla produzione di un packaging alimentare che ha l'obiettivo di proteggere l'alimento da acqua e vapore. Inoltre, essendo una delle proteine più resistenti in natura potrebbe favorire la protezione del prodotto dagli stress meccanici e un imballaggio ottenuto da fonti organiche con proprietà fisiche simili a quelle della plastica, potrebbe diventare un'ottima alternativa compostabile e biodegradabile. In questo studio, inoltre, ci si è posti l'obiettivo di creare un materiale attivo ecosostenibile che fosse in grado di garantire al prodotto una shelf-life duratura.

A tale scopo sono stati prodotti biofilms che contengono anche estratti da piante caratterizzate dalla presenza

di elevata quantità di sostanze antiossidanti, antibatteriche e nutraceutiche fondamentali per contrastare la crescita microbica e il deterioramento del prodotto alimentare.

Nello studio vengono presentati i metodi di sviluppo ed ottimizzazione delle caratteristiche fisico-chimiche dei biofilm, test per la valutazione del loro potere antiossidante (ABTS, FRAP e TPC) e antimicrobico contro i patogeni alimentari quali *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*.

In conclusione, il seguente lavoro ha consentito di iniziare a sviluppare la produzione di biomateriali per un futuro packaging alimentare partendo da materiali di scarto dell'industria agroalimentare in un concetto di circular economy.

ABSTRACT

After decades of excessive consumerism and production of plastics materials from inorganic sources, nowadays our planet is on the verge of a disaster because of the excessive use of plastic in everyday life and it's submerged by plastic waste. It's about time that everyone starts to change the way we treat to reduce plastics waste, we must pay attention to what we throw away and where we put our rubbish. In our everyday life, everybody can contribute with recycling. All countries must increase research to produce new eco-sustainable materials which can replace plastic; it's a way that can give value to industrial waste.

For this reason, the European Union presented, in 2019, an action plan to promote circular economy, which is different from the traditional one because it is not focused on production and single use, but it's an economy that focuses on innovation, waste reduction and in particular on exploitation of industrial waste to give them a new life.

This thesis is focused on building a new plastic biofilm made with food industry waste which will be used like active food packaging as a substitute to plastic. We used as waste the keratin, an interesting polymer because it is the most abundant protein in the animal world, so it is simple to find as a waste of slaughterhouse. Moreover, this protein has got a lot of physio-chemical properties which are so different from the other proteins. As a matter of fact, keratin is water and vapour resistant, it's very stable and malleable: these characteristics depend on the number of disulphide bonds. In this work we used the keratin extracted from chicken feathers; these are waste of food productions and their disposal causes pollution. The hydrophobic characteristics of keratin can be interesting to produce a food packaging because it can protect the food from water and the physical properties can be useful to protect the product from mechanical stress. Moreover, the packaging composed with organics materials, with the similar qualities of plastic, could become a biodegradable and compostable alternative of plastic. In this thesis, another objective is creating a new material which helps the food to have a long shelf-life, for this reason we added to biofilms extracts of *Salvia libanotica*, which has a lot of antioxidant, antimicrobial, and nutraceuticals components. These substances help the food to deteriorate more slowly and to limit the microbial growth.

This work describes the methods to create and optimize the biofilms physico-chemical characterizes, the test we used to check the antioxidant power (ABTS, FRAP and TPC) and antimicrobial power fight two food pathogens: *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*.

Finally, this thesis paves the way for the production of new biofilms which will be used to make food-packaging with agro-industrial waste according to a new circular economy.

1. INTRODUZIONE

1.1. Il packaging alimentare

1.1.1 Breve evoluzione del packaging

Il packaging, chiamato comunemente anche imballaggio o confezione, è ciò che protegge, conserva e presenta un prodotto.¹ L'origine dell'imballaggio è remota e all'inizio aveva solo la funzione di contenimento, infatti, le popolazioni egizie, greche e romane utilizzavano i contenitori per poter trasportare le merci in sicurezza. Mentre, la funzione di protezione nacque circa nel 1700 d.C. con l'invenzione del primo tappo di sughero per conservare l'effervescenza del vino. Successivamente, agli inizi del 1800 venne progettato da Nicholas Appert il primo barattolo di latta (**Figura 1.1**), invenzione che rivoluzionò la conservazione degli alimenti.



Figura 1.1: Confezioni di salmone. "Historic Canneries from The Bering Sea to British Columbia" ²

Appert rispose alla sfida posta da Napoleone Bonaparte di trovare un modo di conservare il cibo per il suo esercito durante le lunghe escursioni in mare. In questo modo nacque il barattolo di latta, che risultò molto meno fragile dei contenitori di vetro che venivano utilizzati fino a quel momento e che permetteva al cibo di mantenere intatta più a lungo le sue qualità organolettiche.² A partire da questa invenzione, il mondo degli imballaggi ebbe un veloce sviluppo, come ad esempio il primo tappo a vite che fu brevettato nel 1856 diventato utile per la chiusura ermetica delle confezioni. Inoltre, proprio in questo periodo storico che cominciò ad affiorare la necessità dei produttori di differenziare i propri prodotti dai concorrenti per attirare i consumatori ed aumentare le vendite industriali³.

Successivamente, l'introduzione della plastica, nel XX secolo, rivoluzionò nuovamente il settore degli imballaggi. Nel 1924 nacque il Cellophane, derivato dalla modificazione chimica della cellulosa, a seguire il PVC, PET, PS e il Nylon. Difatti, dopo la Seconda guerra mondiale, ci fu una crescente attenzione al cibo e molti dei nuovi materiali vennero utilizzati come packaging, grazie anche alle loro proprietà fisico-chimiche.

L'ultima innovazione importante che ha segnato lo sviluppo del packaging alimentare fu il Tetrapak, introdotto nel 1962. Si tratta di un materiale multistrato che combina la rigidità del cartone, la capacità di barriera ai gas e alla luce della pellicola di alluminio e la capacità di barriera all'acqua della plastica. Questo tipo di materiale è ancora molto utilizzato perché garantisce un isolamento dell'alimento dai fattori esterni che potrebbero variarne la qualità organolettica ².

A partire dagli anni '80 gli imballaggi mutarono ancora assumendo altre funzioni, nacque infatti il primo imballaggio attivo, per la precisione venne brevettato il sacchetto di popcorn. Si tratta di una confezione composta da uno strato di carta e una di PET metallizzato capace di interagire con il calore del microonde e scaldare l'alimento che contiene. Le aziende da quel momento svilupparono innumerevoli tipologie di materiali capaci di interagire con l'alimento e modificarlo.

Lo sviluppo repentino di imballaggi ha portato un aumento significativo del consumo di prodotti confezionati rispetto a quelli sfusi e freschi negli ultimi 30 anni (**Figura 1.2**) causando una produzione esponenziale di materiale plastico e con ciò un problema ambientale allarmante.⁴

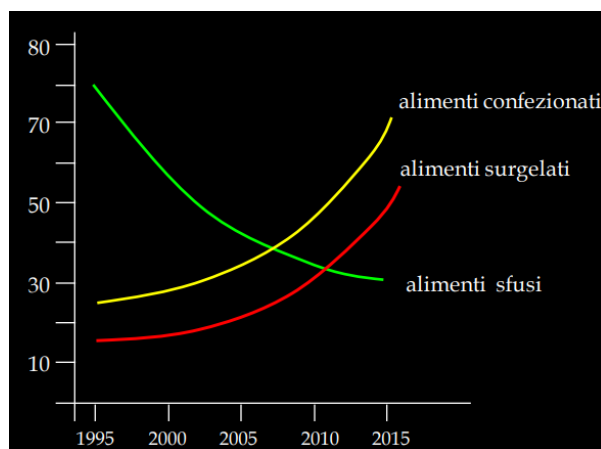


Figura 1.2: Crescita del consumo di alimenti confezionati e surgelati rispetto ad alimenti sfusi espressa in tonnellate negli ultimi 20 anni (Ministero dello Sviluppo Economico - 2016)

1.1.2 Definizioni, funzioni e normativa vigente

Quando si parla di packaging si intende un materiale che può entrare a contatto con gli alimenti; perciò, rientra nella definizione Europea di MOCA: materiali od oggetti destinati a venire a contatto, direttamente o indirettamente, con i prodotti alimentari. Questi materiali devono essere sufficientemente inerti da escludere il trasferimento di sostanze ai prodotti alimentari in quantità tali da mettere in pericolo la salute umana o da comportare una modifica inaccettabile della composizione dei prodotti alimentari o un deterioramento delle loro caratteristiche organolettiche.⁵

Inoltre, la normativa italiana definisce l'imballaggio come "Il prodotto, composto di materiali di qualsiasi natura, adibito a contenere e a proteggere determinate merci, dalle materie prime ai prodotti finiti, a consentire la loro manipolazione e la loro consegna dal produttore al consumatore o all'utilizzatore e ad assicurare la loro presentazione, nonché gli articoli a perdere usati allo stesso modo".⁶

Da tale definizione si possono dedurre le diverse funzioni di un imballaggio e che esistano differenti tipologie di imballaggi.

Infatti, in Italia in base al decreto-legge, i packaging sono distinti in base all'utilizzo finale:

- **IMBALLAGGIO PRIMARIO:** è il materiale a diretto contatto con l'alimento che svolge le funzioni di conservazione e di vendita del prodotto;
- **IMBALLAGGIO SECONDARIO:** è il materiale che ricopre l'imballaggio primario (esempio: cartoncino che unisce due bicchieri di yogurt). Ha come scopo la vendita e riporta le informazioni riguardanti il prodotto;
- **IMBALLAGGIO TERZIARIO:** è il materiale che unisce più unità di vendita per facilitarne il trasporto, stoccaggio e distribuzione (esempio: pellicola che tiene assieme un lotto di prodotti).⁷

Si deduce che, differentemente a quanto si possa pensare, l'imballaggio non ha come uniche funzioni quelle di contenimento e protezione. Infatti, svolge un ruolo importante nel marketing del prodotto, nella comunicazione tramite etichetta e di tracciabilità; inoltre facilita la movimentazione ed il trasporto.⁸ Quindi, tra le funzioni tecniche di un packaging alimentare troviamo:

- **CONTENIMENTO:** come detto precedentemente, il contenimento è una delle funzioni storiche degli imballaggi. Si tratta di impedire all'alimento o alla bevanda di disperdersi. Questo deve valere a partire dai cicli di produzione, stoccaggio, trasporto fino al punto di vendita.
- **PROTEZIONE:** l'imballaggio deve fungere da protettore da fattori che possono compromettere le caratteristiche qualitative ed organolettiche del prodotto, diminuendone la shelf-life. Tra i fattori avversi, il packaging deve essere in grado di proteggere i prodotti secchi dagli stress meccanici, in modo che arrivino integri al consumatore. L'imballaggio, inoltre, deve evitare il passaggio di agenti biologici, macro e microrganismi, per mantenere la salubrità e la qualità dei prodotti. Un'altra caratteristica dei packaging è fungere da barriera efficiente per i gas sia in entrata che in uscita; infatti, è necessario che le bevande gasate non perdano la loro effervescenza e che una confezione MAP (confezione ad atmosfera modificata) non perda la composizione volatile all'interno, ma anche che gas (come l'ossigeno) non penetrino nella confezione in modo da non alterare il prodotto. L'ossigeno, difatti è un catalizzatore della reazione di senescenza aerobica, di ossidazione che provoca l'imbrunimento di alcuni alimenti, di inattivazione di alcune proteine, ma anche di irrancidimento dei grassi nei prodotti ricchi di lipidi. Un altro fattore che catalizza l'irrancidimento degli acidi grassi è la luce; infatti, molte confezioni non ne permettono il passaggio, per esempio i contenitori di olio solitamente non sono trasparenti, ma il vetro solitamente è di un colore scuro.⁹
- **LOGISTICA:** un'altra funzione dell'imballaggio è favorire il flusso della merce e quindi il trasporto dei prodotti da un luogo ad un altro senza comprometterli, mantenendone il valore economico. Solitamente, il packaging con tale funzione rientra nella tipologia di imballaggio terziario e deve garantire la sua integralità e capacità di contenimento dal produttore alla grande distribuzione.¹⁰

Tuttavia, come detto precedentemente, l'imballaggio svolge anche una funzione di marketing e comunicazione con il consumatore. Infatti, è diventato il motivo per cui il cliente decide di acquistare un prodotto, sia perché attratto dall'aspetto generale (forma, colore, materiale), ma anche dalle informazioni che riporta. L'aspetto comunicativo del packaging riguarda in particolare le informazioni obbligatorie e facoltative che vengono riportate in etichetta; esse

devono sottostare ai regolamenti: 1169/2011 relativo alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori e Reg. CE 1924/2006, relativo alle indicazioni nutrizionali e sulla salute fornite sui prodotti.¹¹

Con l'avvento delle grandi distribuzioni e la riduzione della vendita diretta dal produttore al consumatore, le informazioni presenti sull'etichetta del packaging sono diventate l'unico mezzo di comunicazione tra chi produce l'alimento e chi lo compra. Inoltre, ad oggi il consumatore è molto attento a particolari diciture e loghi; quindi, la confezione deve essere fatta in modo tale che saltino all'occhio, per esempio: BIO, la provenienza della materia prima, gluten free ecc.¹²

Come detto precedentemente, le norme che regolamentano gli imballaggi sono le stesse che riguardano i MOCA, e valgono per tutti quei materiali che fanno parte della filiera alimentare e anche per gli alimenti stessi. Tali norme delineano dei principi che il packaging deve rispettare:

- scheda tecnica del materiale;
- buone pratiche di lavorazione (Reg. 2023/2006)
- etichetta (Reg. 1935/2004)
- tracciabilità e rintracciabilità (Reg. 1935/2004)
- dichiarazione di conformità al loro uso (Reg. 1935/2004 ed altri)

L'impianto normativo che riguarda il packaging nacque all'inizio degli anni '60, ad oggi comprende delle norme generali che riguardano tutti i tipi di MOCA (Reg. 1935/2004 e Reg. 2023/2006) e delle norme specifiche che riguardano determinati materiali:

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

Secondo le norme generali gli imballaggi impongono inoltre l'obbligo della tracciabilità del materiale che deve essere riportata in etichetta insieme alla descrizione dell'oggetto e la sua modalità d'uso (Reg. 1935/2004). Il regolamento 2013/2006 invece, impone l'obbligo di

applicare le buone pratiche di fabbricazione in tutte le fasi di produzione, trasformazione e distribuzione del MOCA.

1.1.3 Packaging alimentare attivo

Negli ultimi 10 anni il settore del packaging si è evoluto rapidamente, focalizzandosi nella produzione di imballaggi alternativi alla plastica o con funzioni aggiuntive. Gli obiettivi dei nuovi materiali sono:

- prolungare la shelf-life o la qualità dell'alimento;
- informare e facilitare il consumatore;
- garantire la sostenibilità alimentare.¹⁴

Quando si parla di «**materiali e oggetti attivi** destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari» si intendono materiali e oggetti destinati a prolungare la conservabilità o mantenere o migliorare le condizioni dei prodotti alimentari imballati. Essi sono concepiti in modo da incorporare deliberatamente componenti che rilascino sostanze nel prodotto alimentare imballato o nel suo ambiente, o le assorbano dagli stessi' (reg. CE 1935/04, articolo 2.2.a). Si tratta quindi, di packaging che hanno la funzione di aumentare la durata della shelf-life e la sicurezza dell'alimento (**Figura 1.3**).



Figura 1.3: Differenza tra una carne confezionata in un packaging attivo ed uno tradizionale¹⁵

In commercio esistono diverse tipologie di imballaggi attivi, approvati anche dal regolamento comunitario, questi packaging sono progettati per assorbire o rilasciare delle sostanze in modo da allungare la vita del prodotto o migliorarlo organoletticamente. Tra questi imballaggi troviamo:

- 1) SCAVERING: sono degli imballaggi in grado di rimuovere i componenti indesiderati all'interno dell'imballaggio allungando la vita del prodotto confezionato. In questa categoria ci sono gli assorbitori di: umidità, di ossigeno, di etilene ed anidride carbonica.
- 2) EMETTITORI: sono degli imballaggi che rilasciano nell'atmosfera all'interno della confezione delle sostanze desiderate. Questi packaging possono inglobare delle sostanze che possono controllare l'umidità all'interno della confezione, inibire dei microrganismi e prevenire il deterioramento batterico. In alternativa, le sostanze emesse possono essere degli additivi o degli aromi che vanno a migliorare il sapore del prodotto confezionato.¹⁶

Gli emettitori sono un gruppo molto importante degli imballaggi attivi, tra questi la categoria più numerosa è quella dei packaging antimicrobici; che, per funzionare bene, devono rilasciare la sostanza antimicrobica più velocemente rispetto la cinetica di crescita del microrganismo. Solitamente le sostanze antimicrobiche vengono inglobate nell'imballaggio attraverso tecniche differenti (**Figura 1.4**):

- bustine interne alla confezione o materassini contenenti l'antimicrobico volatile;
- sostanze attive incorporate nel materiale plastico;
- sostanze attive immobilizzate chimicamente al film;
- film per imballaggio che hanno proprietà antimicrobiche (esempio: film chitosano, sostanza antimicrobica).¹⁷

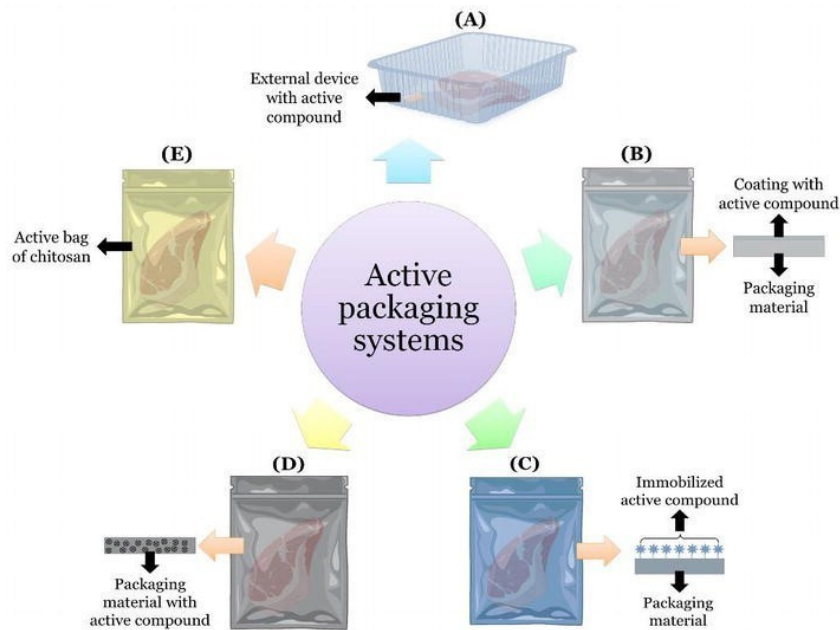


Figura 1.4: Diverse tecniche per aggiungere una sostanza antimicrobica ad un packaging ¹⁸

Di questi, ad oggi, quelli più interessanti sono quelli legati allo sfruttamento di sostanze naturali che possono essere integrate nel materiale da imballaggio e che svolgono la funzione antimicrobica, perché potrebbero aumentare le proprietà di un film realizzato con un polimero sostitutivo alla plastica. Infatti, è possibile incorporare le sostanze antibatteriche fisicamente nel film aggiungendo alla miscela polimerica anche tale sostanza. L'attività antimicrobica avverrà poi attraverso il contatto tra il packaging e l'alimento. In questo caso ad oggi vengono già utilizzati i principi attivi del timolo, carvacrolo e citrale che derivano dagli estratti naturali ed oli essenziali.¹⁴

In più, la ricerca sta realizzando anche dei film plastici attivi costituiti da materiale con azione antimicrobica come quelli ottenuti dal chitosano, un polimero di D-glucosammina. Tali materiali derivano dalla chitina, una proteina che compone lo scheletro degli insetti e dei crostacei. Il chitosano è una molecola molto interessante perché ha naturalmente un'attività antimicrobica contro i batteri Gram + (*Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*) e Gram - (*Escherichia coli*) e attività antiossidante e non necessita l'aggiunta di ulteriori additivi.¹⁹

1.1.4 Packaging: rifiuti e norme sul riciclo di materiale plastico

Il 76% di imballaggi in plastica utilizzati in Italia sono applicati nel settore degli alimenti e bevande. Ne sono un esempio bottiglie d'acqua, recipienti per le insalate ready to eat, vaschette contenenti le fettine di carne nei banchi frigo, sacchetti delle verdure congelate, yogurt confezionati oppure gli imballaggi degli snack. **(Figura 1.5)** Questi pochi esempi danno un'idea di come i MOCA incidano pesantemente sulla produzione annua di plastica, ma soprattutto di come influiscano gravemente sulla sovrapproduzione di rifiuto plastico a livello globale.²⁰



Figura 1.5: Banco frigo di un supermercato contenente prodotti alimentari confezionati la cui maggior parte di materiale plastico.

Infatti, nel corso degli anni, la scarsa attenzione al crescente utilizzo di materiali plastici ha comportato una quantità elevatissima di rifiuti non gestiti che ha compromesso la salute del nostro pianeta, questo perché sono necessari dai 10 ai 30 anni affinché un solo sacchetto di plastica venga degradato dal tempo e dai fattori naturali.²¹

Si stima che, tra i rifiuti plastici globali, quelli che derivano da packaging alimentare siano quasi il 50% del peso totale.

L'imballaggio ha funzioni molto importanti, ma la sua vita è molto breve e questo costituisce uno dei maggiori problemi per quanto riguarda il suo smaltimento.²² Un secondo motivo per cui la digestione di tale materiale è difficile da gestire è la sua produzione esponenziale avvenuta negli ultimi 70 anni ²³ **(Figura 1.6)**. Se questa fabbricazione non rallenta, in base ai dati odierni, il consumo globale di plastica nel 2050 sarà di 500 milioni di tonnellate, di cui la maggior parte sarà occupata da oggetti monouso legati al settore agroalimentare.²⁴

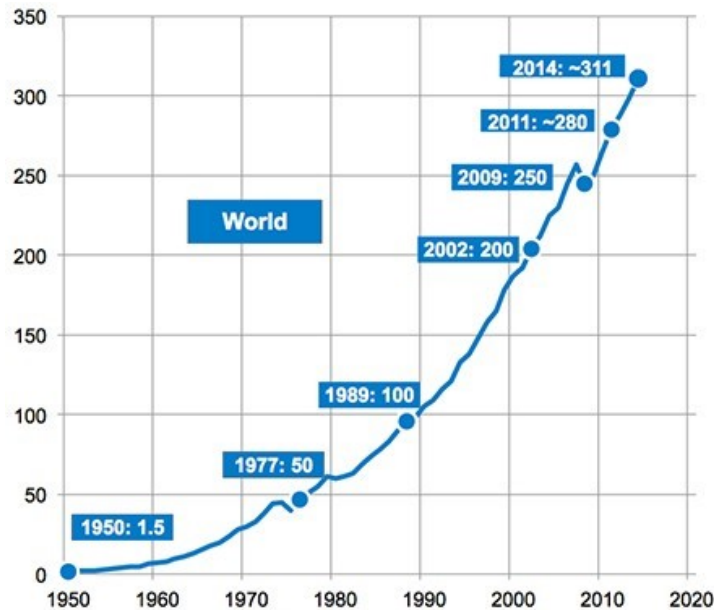


Figura 1.6: Tonnellate di plastica prodotta dagli anni '50 ad oggi (fonte Plastic Europe, 2019).

A livello italiano l’impresso al consumo di imballaggi, secondo i dati CONAI (consorzio italiano privato senza fini di lucro che permette a produttori e utilizzatori degli imballaggi di raggiungere degli obiettivi di riciclo e recupero dei rifiuti previsti dalla legge) pubblicati nel “Programma generale di prevenzione e di gestione degli imballaggi e dei rifiuti di imballaggio – Relazione generale consuntiva 2020”, si attesta a 13,1 milioni di tonnellate con un calo, rispetto al 2019 del 4,6% (629 mila tonnellate).

Questo calo è sicuramente dovuto alla crisi sanitaria da Covid-19, che ha determinato una diminuzione dei consumi a livello nazionale causata dalle chiusure degli scambi commerciali e dalle misure di restrizione. In particolare, l’impresso al consumo di imballaggi di plastica nell’anno 2020, secondo il Consorzio italiano, ha registrato un calo di 106 mila tonnellate rispetto all’anno precedente.

Tuttavia, la quantità di plastica prodotta risulta ancora molto elevata e lo smaltimento non riesce ancora a sottostare ai ritmi della produzione di rifiuti.²⁵

ENEA (l’Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l’energia e lo sviluppo economico sostenibile che si occupa anche del settore della sicurezza alimentare e dell’inquinamento) già a partire dal 2015, riconoscendo la gravità dell’ammontare di rifiuti plastici, è impegnata a monitorare e caratterizzare i rifiuti plastici. L’obiettivo di questa agenzia, vista la gravità della situazione ambientale, è quello di spingere la ricerca a trovare nuovi materiali biodegradabili e compostabili che abbiano le stesse caratteristiche fisiche e meccaniche della plastica. Inoltre,

ENEA incentiva le imprese e i cittadini a prestare maggior attenzione ai rifiuti e al loro smaltimento in modo che non finiscano in natura, in particolare nei mari.

Secondo le attività di ricerca condotte per caratterizzare le plastiche raccolte lungo le spiagge ENEA ha rilevato che la maggior parte di esse è costituita da materiali di polietilene e polipropilene, materiali molto spesso utilizzati per il packaging alimentare e che ad oggi possono essere riciclati per dar vita a nuovi oggetti commercializzabili. Questo significa, che tali plastiche non sono state differenziate nel modo corretto e quindi il riciclaggio non è stato possibile.²⁶

Il problema dell'inquinamento da plastica, negli ultimi anni ha smosso finalmente la politica Europea che già nel 1995 ha introdotto la direttiva 1994/62 CE che mirava alla riduzione dello smaltimento dei rifiuti di imballaggio allo scopo di contribuire alla transizione verso l'economia circolare. Gli obiettivi imposti comprendevano la riduzione della produzione di plastica, il riciclo di rifiuti (riguardava tutti i materiali) e la sostituzione di materiali polimerici con nuovi materiali biodegradabili e compostabili.

Tale norma è stata aggiornata il 4 luglio 2018, con la direttiva 2018/852 UE facente parte del "Pacchetto economia circolare". Attraverso questa modifica, l'Unione Europea ha stabilito delle percentuali di riciclaggio da raggiungere entro il 2025-2030. Inoltre, il pacchetto prevede che i materiali da imballaggio abbiano una percentuale in peso di materiale riciclato che per quanto riguarda il caso della plastica deve raggiungere il 55%.

In più la Commissione Europea nel 2019 ha pubblicato un'ulteriore direttiva: la Direttiva Europea 904/2019, detta anche SUP (Single Use Plastic) che in Italia è entrata in vigore il 14 gennaio 2022, mirando a ridurre la produzione di plastica a sostegno del rispetto ambientale ed economico. Tale aggiornamento impone che:

- gli Stati membri riducano l'uso di contenitori di alimenti e bicchieri/tazze per bevande in plastica, potranno farlo ponendo dei limiti oppure mettendo a disposizione prodotti alternativi. In più l'utilizzo di plastica monouso viene vietata a partire dal 2021;
- ogni Stato comunitario debba imporre delle restrizioni all'immissione in commercio di plastica monouso introducendo alternative prontamente disponibili;

- vengano immesse delle misure di sensibilizzazione e responsabilità del produttore al fine di contribuire al costo della prevenzione e della gestione dei rifiuti, compresi i costi di trattamento;
- tutti gli imballaggi riportino in etichetta il modo corretto per smaltirlo una volta utilizzato e il suo impatto ambientale.

Inoltre, la direttiva UE 904/2019 introduce una tassa sulla plastica, *plastic tax*, che prevede un incremento di 45 di euro per ogni chilogrammo plastica prodotta, compreso il tetrapak. I prodotti esclusi da tale tassazione, oltre ai contenitori di medicinali e dispositivi medici, sono quelli di tipo compostabile o riciclati, composti con una percentuale di plastica inferiore al 40%. Tale imposta sarà a carico delle imprese che comprano, producono o importano oggetti plastici; tuttavia, è previsto un credito d'imposta del 10% sulle spese sostenute per l'adeguamento tecnologico, cioè per convertire la produzione verso la biodegradabilità.

A tal proposito, già molti paesi hanno adottato delle misure per promuovere la riduzione di plastica, il riciclaggio, il riutilizzo e la transizione ad un'economia circolare. Un esempio è la Francia che nel gennaio 2020 ha rilasciato la "Legge Antispreco" che prevede il divieto di utilizzo di imballaggi di plastica per 30 tipi di frutta e verdure. In questo modo il governo francese stima di risparmiare circa un miliardo di packaging plastico all'anno. Inoltre, il governo di Macron ha stanziato 40 milioni di euro per promuovere il riutilizzo di tutte le tipologie di imballaggi immessi nel mercato in modo da raggiungere una riduzione della produzione di tali dispositivi del 20% nel 2025. Oltre all'eliminazione degli oggetti plastici monouso utilizzati per alimenti e bevande, la Francia mira a togliere nel mercato entro il 2023 tutti gli oggetti monouso obbligando ad utilizzare quelli riutilizzabili.

In Germania, invece, è stata approvata una legge che verrà attuata a partire dal 2023 che prevede di mettere a disposizione ai clienti di bar, ristoranti e bistrot, anche contenitori riutilizzabili che verranno riconsegnati in un deposito cauzionale.³⁰

1.1.5 Shelf-life di prodotto e fattori che la determinano

Quando si parla di un alimento è importante definirne la sua qualità, secondo le norme UNI EN ISO 9000:2005 la qualità è “il grado in cui un insieme di caratteristiche intrinseche ed estrinseche del prodotto soddisfano i requisiti” di sicurezza e del consumatore. Si tratta di un concetto dinamico e multifattoriale, infatti la qualità può essere:

- igienico-sanitaria;
- organolettica e sensoriale;
- nutrizionale/nutraceutica;
- tecnologica;
- etica;
- etnica e religiosa;
- ambientale;
- commerciale.

Come riporta la norma ISO, il concetto di qualità dipende, oltre alla salubrità dell'alimento, dal livello di accettabilità del consumatore. Un prodotto alimentare immesso nel mercato deve assolutamente essere sicuro dal punto di vista igienico-sanitario, e dev'essere tolto dallo scaffale quando tale caratteristica non è più garantita. La qualità igienico-sanitaria è data dalla rispondenza ai requisiti minimi, stabiliti dalla legge, relativi al contenuto di sostanze chimiche, microrganismi e dei loro metaboliti, cioè delle tossine prodotte (REG. CE 178/2002 e successive modifiche) e dev'essere garantita a partire dalla produzione, trasformazione e confezionamento, fino al momento in cui il cliente porta a casa il prodotto.

Tuttavia, il consumatore si concentra sulla qualità organolettica del prodotto che si basa su un'analisi sensoriale che viene effettuata sia nel momento della scelta sullo scaffale, ma anche quando effettivamente l'alimento viene assaggiato.

La qualità organolettica è un concetto molto ampio che riguarda:

- vista: quindi il colore, la forma, la dimensione ecc.;
- olfatto: cioè la sfera aromatica dell'alimento al momento dell'assaggio;
- gusto: quindi il sapore del prodotto (salato, dolce, amaro, umami, acido);
- tatto: la texture del prodotto;
- udito: il suono che percepiamo quando mastichiamo l'alimento.³³

È fondamentale che tali caratteristiche qualitative vengano mantenute durante la conservazione del prodotto. Gli alimenti, infatti, con il corso del tempo sono soggetti a deterioramento, che provoca la perdita di tali caratteristiche. Il Regolamento 178/2002 art. 14 definisce il deterioramento come modificazione delle caratteristiche organolettiche, fisiche e chimiche che rende l'alimento inaccettabile dal consumatore e inadatto alla vendita e somministrazione.

I fattori che determinano un deterioramento del prodotto sono di tipo:

- fisico (come per esempio l'essiccazione);
- chimico (per esempio l'ossidazione);
- biochimico, quindi dovuto all'azione di enzimi (per esempio l'irrancidimento);
- microbiologico, quindi dovuto alla crescita e al metabolismo dei microrganismi.

Questi fattori incidono sulla durata in cui il prodotto è definito accettabile dal consumatore o dagli standard, influenzando di conseguenza la sua shelf-life. Un prodotto è accettabile quando non è né dannoso per la salute né inadatto al consumo umano. Per “dannoso” si intende un alimento che contiene microrganismi, le loro tossine, prodotti del loro metabolismo o residui di composti chimici in quantità superiori ai limiti tollerabili dall'organismo umano. Invece, per alimento “inadatto” al consumo si intende un prodotto con caratteristiche sensoriali e/o nutrizionali non conformi allo standard noto di ciascuna di esse e che manifestano segni di alterazione o di decadimento. (art. 14 Reg. CE 178/02)

Un alimento che non è più accettabile ha terminato la sua shelf-life cioè ha terminato quel periodo di tempo che corrisponde, in determinate condizioni di conservazione, ad una tollerabile diminuzione della qualità dell'alimento. (norma UNI 10534-2005)

Il packaging, oltre all'aggiunta di additivi nella formulazione, trattamenti tecnologici di processo e la durata della logistica, è una delle strategie per la gestione e prolungamento della shelf-life del prodotto. Come detto precedentemente, un imballaggio deve poter proteggere l'alimento da fattori estrinseci ed intrinseci che incidono fortemente sul periodo di conservazione del prodotto³⁵ o agire in modo che il decadimento dell'alimento rallenti. Le prestazioni dell'imballaggio condizionano molto la shelf-life sia in termini quantitativi (periodo maggiore o minore) che quelli qualitativi (degradazione dell'alimento).

Quando si sceglie o si crea un materiale per il packaging bisogna valutarne attentamente le proprietà legate a:

- trasparenza alle radiazioni;
- inerzia nei confronti dei fenomeni di interazione;
- permeazione di gas (MAP, ossigeno);
- permeazione di vapore;
- permeazione di sostanze volatili.

All'interno della confezione l'alimento può perdere o acquisire acqua e questo va a squilibrare l'attività dell'acqua iniziale del prodotto. L'acquisizione di umidità da parte dell'alimento può comportare una diminuzione della shelf-life, perché oltre a perdere di consistenza e croccantezza se parliamo di un prodotto secco o un panificato, la maggior disponibilità d'acqua favorisce la crescita microbica. Per questa ragione esistono gli imballaggi attivi capaci di assorbire l'umidità in eccesso e consentire una conservazione più lunga.³⁶

Un altro fattore che diminuisce la vita del prodotto alimentare è la presenza di ossigeno che permette il verificarsi di reazioni di ossidazione e la proliferazione dei microrganismi aerobi. Tra le conseguenze della formazione di ossigeno all'interno della confezione c'è l'irrancidimento ossidativo che colpisce maggiormente gli alimenti con una composizione ricca di lipidi e acidi grassi.³⁷ Questa reazione negativa causa la formazione di odori e sapori sgradevoli, la perdita di proteine e nutrienti; tutti fattori incidono sull'accettabilità del prodotto e la fine della shelf-life³⁸. L'ossigeno, inoltre, favorisce l'attività di alcuni enzimi endogeni della frutta (polifenolossidasi) provocando l'imbrunimento enzimatico, fattore che determina una perdita sostanziale dei prodotti ortofrutticoli.

Infine, la presenza di ossigeno incide anche sul colore degli alimenti, in particolare:

- l'ossidazione dei carotenoidi (colore giallo/arancione) determina una decolorazione, perdita di valore vitaminico e produzione di odori sgradevoli;
- l'ossidazione degli antociani (colore viola/blu) determina la perdita della struttura del pigmento che ne consegue una decolorazione;³⁹

- mioglobina, molecola che determina il colore rosso della carne spesso associato alla freschezza del prodotto. La mioglobina ha una struttura tale da potersi legare all'ossigeno, secondo la concentrazione di ossigeno presente nell'aria forma tre forme diverse con tre colorazioni diverse (**Figura 1.8**):
 - MIOGLOBINA: non c'è alcun contatto con l'ossigeno ed ha colore rosso intenso;
 - OSSIMIOGLOBINA: legata ad una molecola di ossigeno e prende un colore rosso acceso;
 - METAMIOGLOBINA: il ferro nella struttura della molecola di mioglobina perde un elettrone e la carne diventa di un colore bruno.

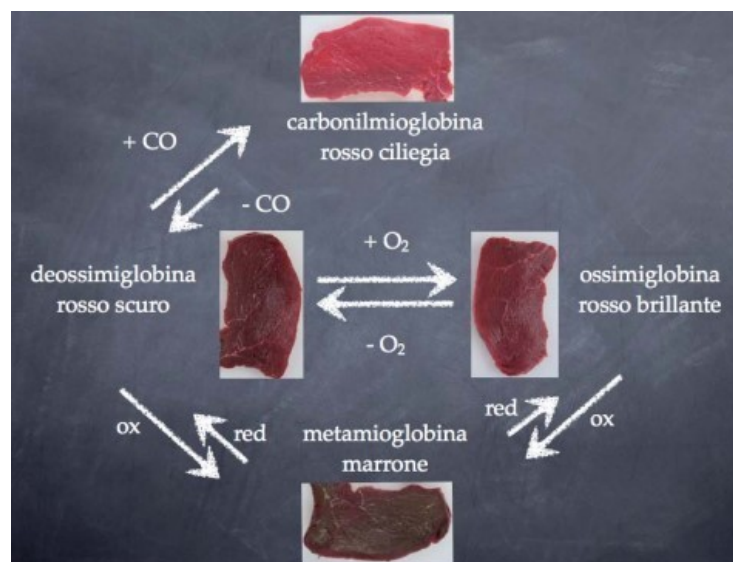


Figura 1.8: Forme di mioglobina e corrispondente colore della carne (rivista Food in, n. 2; 2011)

Anche in questo caso, esistono dei packaging attivi, ricchi di antiossidanti che oltre a proteggere l'alimento dalla penetrazione dei gas ne rallenta le reazioni provocate dall'ossigeno presente all'interno della confezione.⁴⁰

1.2 Economia circolare al servizio del packaging

1.2.1 Che cos'è l'economia circolare?

Ad oggi ancora non esiste una definizione univoca per “economia circolare”, tuttavia da com'è descritta dalle Università, dall'Unione Europea e da altre istituzioni, risulta essere un modo per ridurre lo sfruttamento di risorse naturali come minerali, forestali e fonti energetiche fossili e renderne più efficiente l'utilizzo.⁴²

L'obiettivo dell'economia circolare è quello di realizzare un modello industriale nuovo, che vada a sostituire il modello tradizionale cioè di “economia lineare”. Finora lo schema produttivo prevedeva: l'estrazione, la produzione, l'utilizzo e il gettare; cosa che ha generato nel corso del tempo una produzione esagerata di rifiuti e l'inquinamento del nostro pianeta.⁴³ Il nuovo modello, invece, è incentrato sulla sostenibilità, sull'innovazione, ma anche l'ottimizzazione dei beni, la riduzione dei consumi e degli sprechi; ma soprattutto mira a valorizzare gli scarti industriali e i rifiuti per dar loro una nuova vita⁴⁴ (**Figura 1.8**). In sostanza “la transizione verso un'economia circolare” sposta l'attenzione sul riutilizzare, aggiustare, rinnovare e riciclare i materiali e i prodotti esistenti. Quel che normalmente si considerava come “rifiuto” può essere trasformato in una risorsa”⁴⁵



Figura 1.8: Schema dell'economia circolare. (FONTE: Parlamento Europeo, Economia circolare)

L'Unione Europea, per rimediare alla grave situazione ambientale che stiamo vivendo, l'11 dicembre 2019 ha presentato il Green Deal: un piano d'azione che incentiva l'economia circolare, il ripristino della biodiversità e la riduzione dell'inquinamento. In questo modo la

comunità europea mira a realizzare una società a impatto climatico pari a zero, dotata di un'economia moderna e competitiva dal punto di vista delle risorse. Le principali azioni previste dal Green Deal:

- investire in tecnologie che rispettino l'ambiente;
- sostenere l'innovazione delle industrie;
- introdurre delle forme di trasporto più pulite, economiche e sane;
- decarbonizzazione del settore energetico;
- garantire una maggior efficienza degli edifici;
- collaborazione con i partner internazionali per migliorare gli standard mondiali.⁴⁶

Per l'attuazione del “meccanismo per una transizione giusta” la Commissione Europea si impegna a sostenere finanziariamente ed aiutare i lavoratori e le imprese attraverso uno stanziamento di 100 miliardi di euro per il periodo compreso tra il 2021 e il 2027.⁴⁷

Come supplemento al Green Deal, l'UE l'11 Marzo 2020 ha pubblicato il “Nuovo Piano d'Azione per l'Economia Circolare”. Questo piano è incentrato sulla prevenzione dei rifiuti e la loro gestione, in particolare stabilisce sette punti chiave su cui agire: plastica, tessile, rifiuti elettronici, cibo e acqua, imballaggi, batterie e veicoli, edifici e costruzioni. Per quanto riguarda la plastica il piano europeo pone le basi per la progettazione e produzione di materiali plastici che permettano il riutilizzo, ma soprattutto incentiva e promuove lo sviluppo di materiali più sostenibili⁴⁹ (**Figura 1.7**).

In Italia ENEA, si impegna per favorire la transizione ad un'economia circolare voluta dalla comunità europea, mettendo a disposizione per aziende, pubbliche amministrazioni e tutti i soggetti del Paese interessati:

- dei ricercatori e tecnici che lavorino nel campo dell'eco-innovazione di processo, di prodotto o servizio;
- delle infrastrutture, laboratori e piattaforme digitali;
- approcci e metodi eco-innovativi;
- tecnologie avanzate per la produzione di materiali innovativi, di recupero o riciclo, per la valorizzazione delle risorse, trattamento di scarti, rifiuti e reflui;
- formazione, informazione e comunicazione.

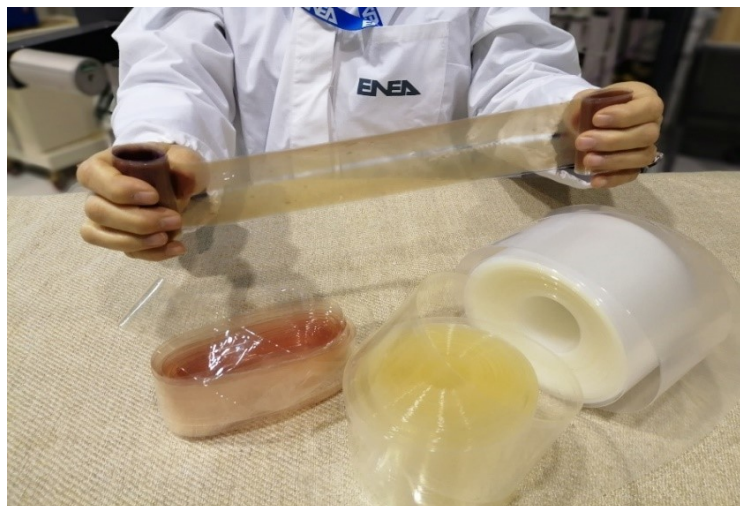


Figura 1.7: Polimeri realizzati presso il Centro Ricerca ENEA di Brindisi.

1.2.2 Materiali agroalimentari di scarto industriale riutilizzabili

Uno degli obiettivi principali dell'UE negli ultimi anni è quello di creare un sistema ecologicamente consapevole basato sulla generazione di rifiuti zero ed economia circolare. Un punto fondamentale di tale progetto riguarda la valorizzazione dei rifiuti e dei sottoprodotti delle industrie alimentari che possono derivare dalle produzioni agricole delle materie prime, dalle trasformazioni delle industrie, dalla distribuzione ed infine dalle tavole dei consumatori⁵¹.

Gli scarti alimentari lungo la filiera produttiva, negli stati industrializzati, sono consistenti a causa dell'ambito raggiungimento dello standard richiesto dal consumatore, ma sono dovuti anche a parti di alimento che vengono eliminate perché non necessarie per la produzione del prodotto. Tutto questo, oltre che essere riprovevole dal punto di vista etico, ha un impatto economico importante, infatti, nel Regno Unito, per esempio, le tonnellate di cibo sprecato ammontano a 6,7 milioni che equivalgono a 10,2 miliardi di sterline all'anno⁵³.

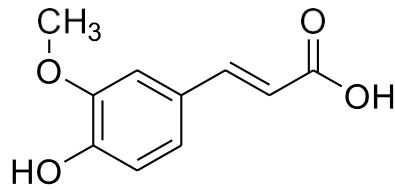
Per fortuna, grazie alle innumerevoli innovazioni tecnologiche, ad oggi c'è la possibilità di dare un valore aggiunto a sempre più sottoprodotti agroalimentari, creando guadagno su qualcosa che prima era considerato solamente un rifiuto⁵².

Un esempio di valorizzazione di uno scarto alimentare è la buccia d'arancia. Il consumo delle arance come frutto, succo o concentrato genera una consistente quantità di scarto principalmente composto da bucce, per una percentuale di residuo del 50/60% del frutto fresco. La buccia d'arancia è uno degli scarti che contiene la maggior quantità di pectina (30%), polisaccaride che viene utilizzato anche come additivo alimentare per la precisione come

gelificante (E440). Proprio per questo, ad oggi tale additivo, viene estratto dalle bucce valorizzando un residuo che altrimenti verrebbe gettato.⁵⁴

La frutta e la verdura sono gli scarti maggiormente riutilizzati perché ricchi di sostanze positive che possono essere facilmente estratte. Tali alimenti sono la principale fonte di sostanze bioattive nutraceutiche che viene utilizzata per produrre alimenti nutrizionali, cioè capaci di conferire effetti benefici terapeutici e nutrizionali a chi li consuma. Difatti, possono contenere molte sostanze antiossidanti come i carotenoidi (pigmenti di colore giallo e arancione) che oltre ad essere utilizzati come colorante alimentare hanno un'eccellente capacità di estinzione dell'ossigeno e dei radicali liberi. Questa attività conferisce ai pigmenti la capacità di inibire le malattie legate ai radicali liberi, cioè malattie cardiovascolari, sclerosi multipla, malattie degenerative e degenerazione maculare. Le sostanze fenoliche presenti sulla buccia, nei semi di frutta e verdura, sono dei composti aromatici che hanno un elevato potere antiossidante, ma soprattutto hanno la capacità di ridurre il rischio di molte malattie croniche come il cancro, malattie cardiovascolari, il diabete, malattie neurologiche, la cataratta e alcuni disturbi cognitivi. Tra gli ortofrutticoli con la maggior quantità di fenoli troviamo: le bucce degli agrumi e l'uva⁵⁵.

Un'altra modalità per riutilizzare gli scarti alimentari è la produzione di composti aromatici utili per aumentare la gradevolezza dell'alimento da parte del consumatore. Tradizionalmente i composti aromatici venivano sintetizzati chimicamente o estratti direttamente dalla matrice naturale mentre oggi si possono ottenere attraverso dei processi enzimatici di alcuni rifiuti agroalimentari. Per esempio, attraverso l'applicazione di enzimi lipolitici è possibile estrarre gli acidi grassi dai rifiuti di grasso animale scartato, oppure è possibile ricavare la bio-vanillina convertendo enzimaticamente l'acido ferulico (**Figura 1.8**) presente in quantità elevate nella crusca dei cereali, nella polpa della barbabietola da zucchero, nell'olio di crusca da riso, nella biomassa dell'olio di palma e nei sottoprodotti dell'ananas. Tuttavia, la tecnologia più efficace per la produzione di aromi da sottoprodotti industriali prevede la fermentazione di tali rifiuti tramite dei microrganismi modificati in modo da essere specifici per la matrice che vanno a digerire. Tramite fermentazione è possibile ottenere degli aromi che possono conferire sentore di fruttato riutilizzabile per migliorare alcuni succhi di frutta oppure delle note di diacetile, cioè di burro utile per aromatizzare alcuni formaggi⁵⁶.



Acido Ferulico

Figura 1.8: Struttura chimica dell'acido ferulico.

Anche l'Agenzia nazionale, Enea, sta contribuendo alla ricerca per il riutilizzo di rifiuti agroalimentari per ricavare nuovi materiali; infatti, nel 2019 ha pubblicato il progetto BIOCOSì che descrive come ricavare bioplastica utilizzabile anche come packaging alimentare a partire dalle acque reflue della filiera casearia. In Italia, si producono all'anno oltre 8 milioni di tonnellate di siero di latte che dev'essere smaltito in discariche speciali. Il progetto mira a recuperare l'80% delle acque reflue della lavorazione del latte per la produzione di burro e formaggi; questo sottoprodotto non presenta elementi tossici, anzi è ricco di proteine, peptidi e lattosio, tutte sostanze che possono essere riutilizzate per dar loro un valore aggiunto⁵⁷. Ad oggi le bioplastiche realizzate utilizzano le risorse del mais, questo però non risulta una soluzione sostenibile perché oltre a coltivare questo cereale per l'alimentazione umana e per la mangimistica, si dovrebbe incrementare la produzione per la produzione di film plastico. Per questo motivo, ENEA, punta nello sfruttamento di rifiuti delle filiere per evitare il loro smaltimento e originare materiali sostituibili alla plastica. Tramite delle nuove tecnologie di separazione, i ricercatori sono riusciti a separare il lattosio dalle altre sostanze presenti nelle acque reflue da cui sono riusciti a produrre delle bioplastiche al 100% compostabili e biodegradabili⁵⁸.

1.2.3. Biopolimeri

Quando si parla di polimeri si intendono delle macromolecole ad elevato peso molecolare costituite da una serie di molecole semplici, i monomeri, che sono legate tra loro tramite dei legami covalenti. I polimeri risultano come delle lunghe catene che possono essere lineari, ramificate o reticolate e in base alla loro origine vengono classificati in: naturali, sintetici e artificiali⁵⁹. I biopolimeri naturali sono delle macromolecole polimeriche prodotte dall'uomo partendo da materie prime biologiche, differentemente dai polimeri sintetici derivati dal petrolio (**Figura 1.9**). Oggi, l'EU è impegnata allo sviluppo di un'economia sostenibile e rispettosa dell'ambiente, per questo motivo la ricerca sta studiando sempre più attentamente come poter realizzare dei materiali derivati da fonti rinnovabili, in modo da sostituire la plastica che deriva da fonti non rinnovabili, e che siano compostabili e biodegradabili⁶⁰.

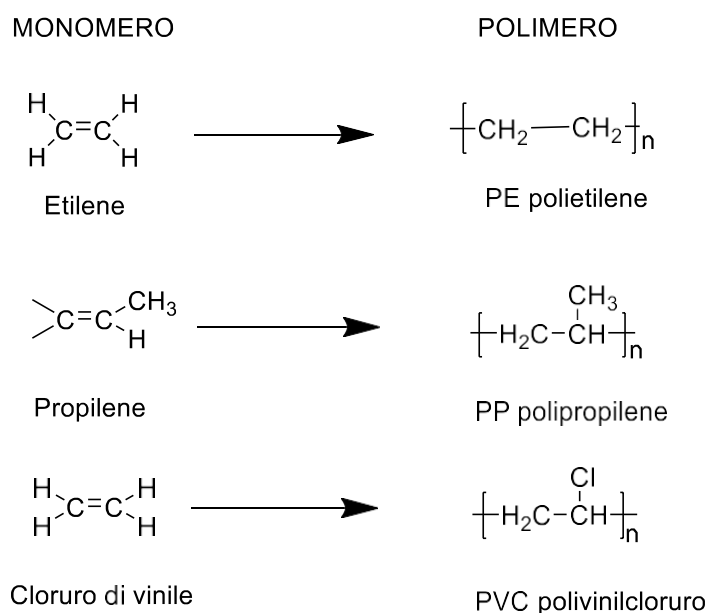


Figura 1.9: Esempi di monomeri che danno origine a polimeri sintetici oggi utilizzati per la realizzazione di plastiche.

La norma Europea EN13432 sui “Requisiti per imballaggi recuperabili mediante compostaggio e biodegradazione”, nata per colmare delle lacune della precedente direttiva 94/62 CE, definisce i termini “compostabile e biodegradabile”. Infatti, per materiale compostabile si intende un materiale organico con la capacità di trasformarsi in compost mediante il processo di compostaggio. In particolare, questa normativa tratta nello specifico il packaging alimentare

riferendosi a EN14995, quest'ultima indica le caratteristiche che un materiale di imballaggio deve avere per essere definito compostabile:

- dev'essere biodegradabile al 90% in meno di sei mesi;
- dev'essere disintegrabile almeno al 90%, cioè frammentabile e non visibile nel compost finale in meno di 3 mesi (i frammenti devono essere più piccoli di 2mm da verificare secondo la ISO 14045);
- non deve provocare effetti negativi sul processo di compostaggio, ovvero il compost risultante deve essere libero da sostanze ad azione eco-tossica e rispettare determinate caratteristiche di qualità;
- deve presentare livelli di metalli pesanti al di sotto della soglia stabilita dalla normativa vigente⁶².

Quindi, un materiale compostabile dev'essere biodegradabile, tuttavia, non è obbligatorio che un materiale biodegradabile sia anche compostabile. Questo perché secondo la definizione dell'ASTM (American Society of Testing and Materials) la biodegradabilità è la decomposizione di una sostanza attraverso l'azione di agenti esterni, generando anidride carbonica, metano, acqua e sali minerali. In termini normativi la biodegradabilità viene determinata attraverso l'effettiva conversione del materiale in anidride carbonica secondo lo standard ISO 14855, in condizioni atmosferiche controllate.

Tuttavia, è impossibile stabilire precisamente la durata di biodegradazione dei biopolimeri a causa dei numerosi fattori di variabilità che incidono su questo processo come: la tipologia di suolo, l'acqua, l'impianto di compostaggio, la quantità di ossigeno a cui è esposto, l'umidità, il pH, il potenziale redox e la temperatura. Per questa ragione la normativa europea prende come riferimento la norma ISO. Inoltre, la direttiva EN13432 stabilisce che i materiali certificati secondo essa vengano conferiti nella frazione dell'umido in modo da consentirne il processo di riciclaggio organico.

Le filiere che riescono a riciclare la plastica o a realizzare biopolimeri sono un esempio virtuoso di economia circolare. In commercio, quindi, esistono già diversi biopolimeri che hanno le stesse applicazioni dei materiali plastici e si suddividono in materiali:

- estratti da biomassa, cioè ottenuti partendo da polisaccaridi (esempio da cellulosa), proteine (come le caseine), lipidi;
- derivati da bio-monomeri, come per esempio il polilattato;
- polimeri prodotti da microrganismi come per esempio il PHA⁶³.

Ad oggi l'obiettivo è quello di trovare dei bio-polimeri che abbiano delle caratteristiche bioplastiche, cioè che siano dei materiali biodegradabili e compostabili derivati da fonti rinnovabili. Le principali bioplastiche in commercio sono quelle originate da:

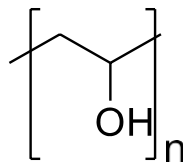
- materiali a base di amido o miscele di amido;
- PLA cioè acido poli-lattico;
- poliidrossialcanoati;
- PVA, cioè l'alcol polivinilico.

Tra questi materiali quelli con caratteristiche più simili alla plastica sono il PHA (o poliidrossialcanoato) ed il PVA⁶⁴. Il poliidrossialcanoato è un polimero ottenuto da alcuni microrganismi, *Azobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Cupriavidus necator* che sono in grado di trasformare i substrati, tra cui anche dei rifiuti tossici e sottoprodotti dell'industria agroalimentare, in plastica. Questi batteri se coltivati in assenza di zolfo, azoto e fosforo, sono in grado di accumulare delle macromolecole lineari sottoforma di granuli citoplasmatici come materiale di riserva⁶⁶. Tali granuli possono raggiungere anche il 90% del peso secco della massa batterica e sono costituiti da acidi idrossialcanoati da cui verrà prodotto il PHA⁶⁵. **(Figura 1.10)** Come detto precedentemente, questo tipo di biopolimero è molto simile alla plastica ed è molto interessante perché biodegradabile e per il suo possibile utilizzato in campo medico, come per la preparazione di protesi e dispositivi chirurgici grazie alla sua biocompatibilità, e in campo alimentare per la produzione di packaging⁶⁷.



Figura 1.10: Immagine al TEM (microscopio elettronico a trasmissione) di cellule batteriche che mostrano numerosi granuli PHA.

Il PVA (**Figura 1.11**), invece, è un polimero sintetico a macromolecole solubile in acqua che è stato molto studiato negli ultimi anni come termoplastico per la formazione di biopolimeri. L'alcool polivinilico ha molte proprietà che lo rendono un ottimo sostituto ecologico alla plastica; infatti, si tratta di un polimero biodegradabile e solubile in acqua, ha un'eccellente capacità di formare dei film e presenta delle notevoli caratteristiche fisiche come la resistenza alla trazione. Questo polimero è molto interessante perché presenta delle proprietà fondamentali per la realizzazione di materiali per il packaging alimentare, per esempio ha un'ottima resistenza ad oli e sostanze grasse, un bassissimo livello di tossicità, resiste benissimo ad ossigeno e aromi e inoltre è molto flessibile.⁶⁸



PVA polivinilalcol

Figura 1.11: Struttura chimica del polimero di alcool polivinilico.

Infine, risulta essere facilmente industrializzabile perché può essere lavorato per colata, stampaggio oppure estruso per la formazione di un materiale per imballaggi.⁶⁹

1.2.4. La cheratina di piume avicole

Il termine cheratina generalmente fa riferimento ad un'ampia categoria di proteine che compongono la maggior parte delle cellule epiteliali, infatti, la denominazione “cheratina” deriva dal greco “*Kera*” (*aka*) che significa corno, appendice epidermica formata principalmente di cheratina. Tale proteina è uno dei materiali biologici più resistenti e proprio per questo la si trova principalmente nelle estremità cutanee degli animali come per esempio nei capelli, nelle unghie, negli artigli, corna, becchi e piume; e funge come arma da difesa o da protezione⁷⁰. Nel corso della storia la cheratina è stata molto utilizzata per la fabbricazione di tessuti ed ornamenti per le donne oppure per la costruzione di strumenti musicali, inoltre le corna di venivano utilizzate per la realizzazione di bicchieri⁷¹.

La cheratina è una proteina insolubile molto interessante la cui struttura primaria è formata da un polipeptide costituito maggiormente da cisteina, glicina, prolina e serina; in minore quantità si trovano anche metionina ed istidina. Quindi, si tratta di un polimero ricco di amminoacidi solforati che formano tra loro dei legami intramolecolari, i ponti disolfuro, tramite una reazione di ossidazione. Le cisteine, infatti, formano dei reticoli attraverso la formazione di legami zolfo-zolfo donando rigidità e resistenza alla struttura proteica. Le proprietà fisico-chimiche della cheratina sono molto differenti rispetto a qualsiasi altra proteina perché ha una forte stabilità e non è solubile né in acqua né in soluzioni leggermente acide o alcaline a causa della presenza dei ponti disolfuro⁷². Inoltre, i legami ionici dei gruppi carbossilici e amminici degli amminoacidi che compongono la proteina dipendono molto dal valore del pH, se tale parametro ha un valore di 4,9 allora i legami sono al loro punto massimo di forza coincidendo con il punto isoelettrico della proteina. Mentre, in condizioni di estrema acidità o basicità i legami ionici sono molto deboli, infatti, a pH acido avviene una protonazione dei gruppi carbossilici e a pH basico i gruppi amminici subiscono una deprotonazione⁷³.

In base al contenuto di zolfo, la cheratina si suddivide in due tipologie:

- **cheratina dura:** si tratta di una struttura molto compatta formata da molti legami disolfuro, di colore ocre e molto resistente al calore e all'acqua. Solitamente è presente nelle piume, pelo e zoccoli;
- **cheratina molle:** si tratta di una struttura di consistenza plastica dovuta al minor contenuto di zolfo, è traslucida e tipicamente si trova nella pelle.

Inoltre, la cheratina si suddivide in ulteriori due classificazioni:

- **alfa cheratina (α -cheratina):** è tipo di cheratina molto interessante per la sua forza, resistenza, elasticità e flessibilità. Questa proteina solitamente è presente nell'epitelio dei mammiferi, nelle unghie, nei peli e nelle corna. In tale struttura il peptide principale crea un'alfa elica destrorsa formata circa da 35 amminoacidi, la proteina è stabilizzata dai legami idrogeno tra i gruppi carbonilici dei peptidi e quelli amminici di altri peptidi. La lunghezza dell'alfa elica è approssimativamente di 45 nm e il loro peso molecolare tra i 40 e 68 kDa. L'unità della cheratina è costituita da una doppia catena di alfa-eliche destrorse super-avvolte in una struttura chiamata (coiled-coil) in senso sinistrorso e rinforzate dai molti ponti disolfuro. A loro volta queste unità si avvolgono tra loro per formare la struttura terziaria della proteina detta protofilamento. (**Figura 1.12**)

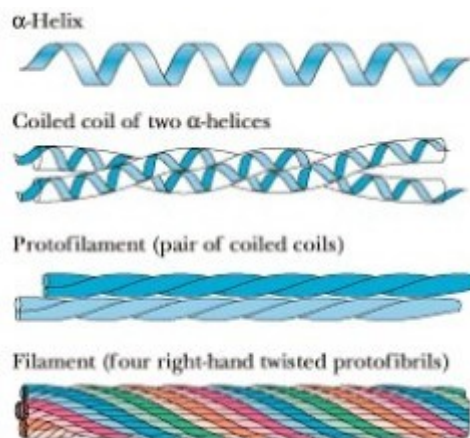


Figura 1.12: Strutture dell'alfa cheratina dal filamento singolo fino al protofilamento.

- **beta cheratina (β -cheratina):** sono delle proteine filamentose presenti soprattutto nei rettili e nelle piume, artigli, penne e piume degli uccelli. Si tratta di una cheratina a struttura di beta-foglietto e con un'elevata percentuale di cisteina, amminoacido che permette di formare facilmente dei legami disolfuro. Come detto precedentemente, maggiore è la quantità di legami solfuro maggiore è la rigidità della struttura proteica e la resistenza alla degradazione.⁷⁴ (**Figura 1.13**)

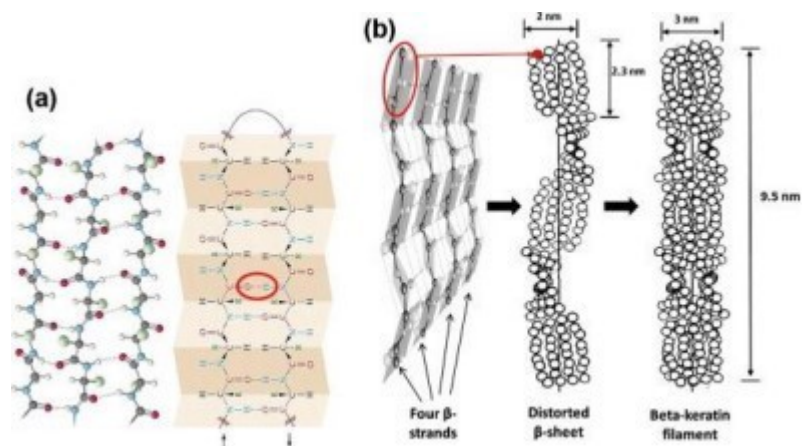


Figura 1.13: Struttura della beta-cheratina tridimensionale.

Essendo una delle proteine più presenti nel mondo animale è facile trovarla nei sottoprodotti, in particolare nei resti del macello o degli stabilimenti di carne e pollame. Si stima che in tutto il mondo i rifiuti di cheratina delle industrie legate al settore agroalimentare siano più di 5.00.000 tonnellate annue, in Europa circa 3,1 milioni di tonnellate annue e in Italia oltre 448 mila tonnellate annue. Tra gli scarti più numerosi di cheratina ritroviamo le penne di pollo; infatti, secondo il dipartimento americano dell'agricoltura FAS (Foreign Agricultural Service) la carne bianca di pollo viene consumata da tutte le categorie d'età della società, per questo motivo la maggior parte degli allevamenti di questi animali ad oggi sono intensivi (**Figura 1.14**) e le fasi di lavorazione per ottenerne la carne generano un'elevata quantità di rifiuti inquinanti, in particolare di piume.⁷⁵ Infatti, solo una piccola parte delle piume scartate dai macelli vengono trasformate in fertilizzanti il restante dev'essere smaltito tramite incenerimento o interrato nelle discariche controllate. Questo comporta l'inquinamento del suolo e dell'aria contribuendo al danno ambientale, dovuta alla produzione di 16.000 tonnellate di CO₂.⁷⁶



Figura 1.14: Allevamento intensivo di pollame.

Questi sono stati classificati come rifiuti di categoria 3 secondo la normativa CE 1774/2002 stipulata dall'Unione Europea il 3 ottobre 2002, direttiva che contiene le norme sanitarie relative ai sottoprodotti di origine animale non destinato al consumo umano. Tuttavia, anche se non si tratta di prodotti idonei al consumo essi non sono in grado di trasmettere malattie all'uomo o agli animali perché derivanti da carcasse di animali idonei al consumo umano.⁷⁸ Infatti, è stata testata la tossicità endovenosa di tale proteina di scarto per verificare il suo eventuale utilizzo in applicazioni biomediche ed è stato riscontrato che entrambe le tipologie di cheratina non presentano tossicità acuta né genotossicità nei ratti. La **Tabella 1.1** elenca per diverse tipologie di cheratina, estratta da fonti diverse, la quantità di proteina tale da determinare la morte del 50% (LD50) dei topi a cui viene iniettata oralmente o intravenosa.⁸⁰

Ingredient	Concentration/Dose	Animals	Results
<i>Oral</i>			
Hydrolyzed Keratin (MW = 320 Da; sheep wool source)	5 ml/kg of a 25% solution in water	5 male and 5 female Wistar rats	LD ₅₀ > 5 ml/kg
Hydrolyzed Keratin (MW = 11,000 Da; sheep wool source)	2 g/kg of a 20% solution in water	3 male and 3 female Sprague-Dawley CD rats	LD ₅₀ > 2 g/kg
Hydrolyzed Keratin (hoof meal source)	10 g/kg of a 20% solution	5 male and 5 female Sprague-Dawley rats	LD ₅₀ > 10 g/kg
Hydrolyzed Keratin (hoof meal source)	2.5, 5.0, 10.0, 20.0, or 40.0 ml/kg of a 20% solution	Five groups of 3 male and 2 female Wistar rats	LD ₅₀ > 40 ml/kg
Hydrolyzed Keratin (hoof meal source)	5 g/kg of a 25% solution	5 male and 5 female Wistar rats	LD ₅₀ > 5 g/kg
<i>Intravenous</i>			
Keratin (enzymatically and chemically fragmented, MW ~ 8000 Da and 33,000 Da, respectively; buffalo horn/hoof source)	300 mg/kg dissolved in 1/15 M sodium phosphate buffer	male ddY mice, number not reported	No significant changes observed in lungs, livers, kidneys, spleens; body weight changed similar to those of the control group
Hydrolyzed Keratin (MW = 310 Da; sheep wool source)	5 ml/kg of a 20% solution in water	15 male ddY mice	LD ₅₀ > 5 ml/kg

Tabella 1.1: Valori di tossicità della cheratina di origine animale.

Ad oggi la ricerca sta studiando attentamente come estrarre e solubilizzare la cheratina, per valorizzare al meglio l'enorme quantità di sottoprodotti di origine animale ricchi di questa proteina interessante dal punto di vista chimico-fisico.

La cheratina, come detto precedentemente, è costituita da legami disolfuro inter ed intramolecolari che formano una struttura tridimensionale molto stabile e resistente agli agenti chimici e all'attacchi enzimatici. Per questo motivo la sua estrazione è molto complessa, si tratta di un processo che prevede la rottura dei ponti disolfuro dell'aminoacido della cisteina.⁸⁰ Ad oggi i metodi utilizzati dipendono dall'origine della proteina, quindi dalla sua conformazione:

- **metodo convenzionale con agenti chimici:** si utilizzano agenti riducenti, ossidanti o attraverso solfolisi; queste sostanze chimiche reagiscono con gli ioni solfito e rompono i ponti solfuro producendo residui di cisteina e anioni solfonati;
- **metodo non convenzionale con agenti chimici:** il processo avviene tramite un'idrolisi chimica degli scarti di cheratina, per esempio utilizzando l'idrossido di sodio, che avviene in condizioni estreme di pressione e temperatura. L'idrolisi chimica è una reazione lenta ma molto efficiente perché causa la perdita di alcuni aminoacidi, come per esempio il triptofano. Tuttavia, si tratta di un metodo che provoca la produzione di gas come CO₂ e SO₂ che possono provocare problemi respiratori, cancerogeni o cardiovascolari.

- **via enzimatica:** la degradazione microbica e i metodi biologici sono un'ottima alternativa all'utilizzo di agenti chimici, per l'estrazione della cheratina. Il metodo enzimatico prevede l'utilizzo della cheratinasi prodotta da microrganismi che utilizzano la cheratina come fonte di nutrimento per la loro crescita. Questa proteina è una delle componenti più significative per la crescita alcune specie di funghi, batteri e insetti in grado di degradare le proteine animali più forti e stabili presenti in natura, tra cui appunto la cheratina.⁸¹

In un mondo che spinge a valorizzare i materiali di scarto per ridurre l'inquinamento dovuto ai polimeri sintetici, i sottoprodotti ricchi di cheratina derivati dalle industrie di pelli potrebbero rappresentare un esempio concreto. La lana ovina, oltre ad essere un materiale utilizzato nel settore tessile, potrebbe essere interessante per altre applicazioni perché contiene l'82% di cheratina sulle proteine totali di cui è composta tra cui una piccola quantità di cistina e altri componenti di lipidi e polisaccaridi. Ad oggi la cheratina di lana è stata studiata per applicazioni di nicchia perché detiene delle proprietà che la rendono fortemente somigliante alla pelle e ai capelli umani; tra le possibili impieghi di questa proteina si ipotizza la produzione di cosmetici o la fabbricazione di scaffold per la coltivazione cellulare.⁷⁵

Un altro sottoprodotto che potrebbe rappresentare una fonte molto interessante di cheratina sono le piume avicole. Infatti, le piume sono tra le fonti proteiche più abbondanti, rinnovabili e più economiche anche se il loro smaltimento contribuisce all'inquinamento ambientale e di conseguenza uno spreco di cheratina.⁸¹ Questi scarti sono formati per il 91% di proteina in particolare di cheratina, 1% di lipidi e il restante d'acqua. Inoltre, gli aminoacidi che compongono la parte proteica delle piume sono pressoché identici a quelli della composizione amminoacidica della cheratina cioè cisteina, glutammina, prolina e serina (la più abbondante 16%) anche se sono assenti istidina, lisina, triptofano, acido glutammico e glicina.⁸³

Molti studi, negli ultimi anni, hanno riscontrato una possibile attività antimicrobica della cheratina. In particolare, la proteina derivata dalle piume risulta avere un'attività antibatterica maggiore rispetto alle cheratine dei mammiferi, ciò è dovuto probabilmente alla conformazione ad alfa elica che riesce a degradare più facilmente la membrana batterica. È stato osservato, inoltre, come i ceppi batterici Gram negativi siano maggiormente suscettibili a tale proteina.⁸⁴ Questa caratteristica potrebbe essere interessante dal punto di vista farmacologico, ma anche limitare la proliferazione di batteri durante la shelf-life di un alimento.

1.3. Antiossidanti naturali come componenti di packaging

1.3.1 Cos'è un antiossidante naturale?

Quando si parla di antiossidante alimentare intende una sostanza in grado di contrastare, rallentare o neutralizzare la formazione di radicali liberi dell'ossigeno che si formano a partire dalle reazioni di ossidazione. Questi intermedi di reazione danneggiano le strutture cellulari e diverse molecole come per esempio DNA, proteine e lipidi, velocizzando la degradazione e l'invecchiamento dei tessuti sia vegetali che animali e determinando il deterioramento della qualità degli alimenti diminuendone la durata della shelf-life.

Gli antiossidanti sono delle molecole che si ossidano molto facilmente e reagiscono molto bene con i radicali liberi che al contrario si riducono con facilità. La proprietà interessante di tali sostanze, quindi, è quella di "catturare" l'elettrone spaiato dei radicali liberi al posto delle strutture e molecole cellulari, controllando in questo modo lo sviluppo dell'irrancidimento ossidativo, ritardando la formazione di prodotti tossici ottenuti da reazioni di ossidazione, prolungando la qualità nutrizionale e organolettica degli alimenti, oltre a migliorarne la conservazione.⁸⁴ Gli antiossidanti possono essere classificati in base a diversi criteri:

- **ORIGINE:**
 - endogeni se prodotti dall'organismo come meccanismi di difesa;
 - esogeni se introdotti nell'organismo attraverso la dieta.

- **STRUTTURA CHIMICA:**
 - enzimatici;
 - non enzimatici.

- **SOLUBILITA':**
 - liposolubili;
 - idrosolubili.

- **MECCANISMO D'AZIONE:**

- **preventivi:** se impediscono a monte la generazione di specie chimiche reattive attraverso la chelazione dei metalli di transizione, il “quenching” dei radicali liberi originati dalle reazioni di ossidazione o l’inattivazione dei perossidi.
- **scavenger e chain breaker:** i primi sono delle sostanze che hanno la capacità di ridurre la concentrazione di radicali liberi nel mezzo in cui si trovano interagendo con essi. I secondi, invece, sono in grado di bloccare la propagazione delle reazioni radicaliche.
- **riparatori:** contengono degli enzimi in grado di intervenire a seguito del danno dovuto alle specie reattive.

Tra le specie naturali esogene che il nostro corpo assume con la dieta ritroviamo le vitamine A, C, E, i carotenoidi, i composti enzimatici (ferro, zinco...) e i polifenoli.⁸⁶ Questi antiossidanti possono essere presenti naturalmente negli alimenti oppure possono essere addizionati come additivi alimentari fornendo un valore aggiunto al prodotto e aumentandone la conservazione. Secondo il regolamento UE 1333/2008 un additivo alimentare è qualsiasi sostanza abitualmente non consumata come alimento e non utilizzata come ingrediente caratteristico dell'alimento, volutamente aggiunta durante le fasi di: produzione, preparazione, trasformazione, trattamento, imballaggio, trasporto e stoccaggio, in scopo tecnologico che diventa una componente dell'alimento. Se gli antiossidanti vengono aggiunti come additivi in una delle fasi di produzione elencate allora deve essere riportato in etichetta con la relativa denominazione oppure con numero E, che nel caso di tali sostanze è compreso tra E 325 e E 385. (Reg. CE n. 1333/2008 e direttive 2008/84 CE, 2008/60/CE e 2008/128/ce)

1.3.2. I polifenoli

I composti fenolici (**Figura 1.15**) gli antiossidanti più abbondanti nella dieta umana, sono un gruppo di sostanze molto eterogenee, ma caratterizzate dalla presenza di gruppi ossidrilici legati ad anelli aromatici.

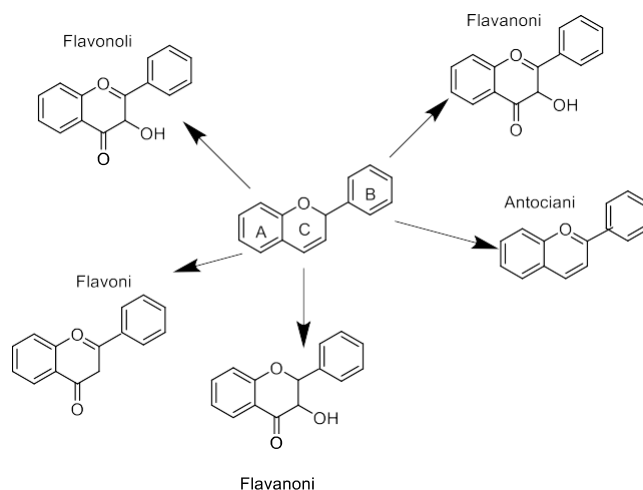


Figura 1.15: Struttura chimica dei polifenoli con relativi esempi.

In particolare, si tratta di metaboliti secondari che vengono prodotti da piante e animali come meccanismi di difesa, infatti agiscono come composti segnale per gli impollinatori o animali per la dispersione dei semi, inoltre proteggono le piante da sostanze ossidanti e i raggi UV del sole. I polifenoli assunti dall'uomo risultano essere sostanze fitochimiche, cioè capaci di avere potente attività biologiche, come i carotenoidi e i glucosilati.⁸⁷ Tuttavia, i polifenoli essendo estremamente diversificati si suddividono in lignani, stilbeni, acidi fenolici e flavonoidi, inoltre quest'ultimi si dividono in: isoflavoni, flavoni, flavonoli, antocianine, flavanoli e flavanoni. (**Figura 1.16**)

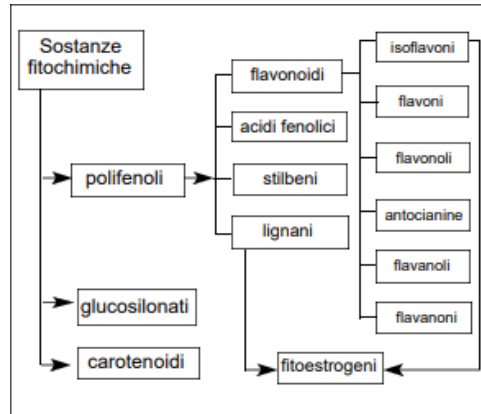
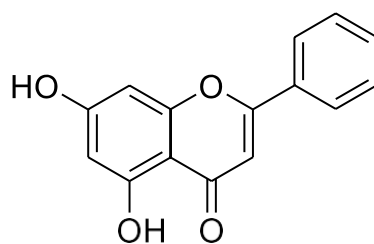


Figura 1.16: Suddivisione delle sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale.

In natura proteggono le piante ed i frutti da microrganismi e insetti oltre a conferire loro pigmentazione e caratteristiche organolettiche. Come detto precedentemente i polifenoli sono delle sostanze che derivano dal benzene, perché all'anello benzenico si addizionano uno o più gruppi ossidrilici in diverse posizioni.⁸⁹ È questa particolare struttura che li rende degli scavenging contro gli agenti riducenti e i radicali liberi. Ogni categoria di polifenoli ha delle caratteristiche strutturali e proprietà differenti dettate dalla posizione e composizione dei gruppi funzionali della molecola. Per esempio, una categoria molto interessante sono i flavonoidi, si tratta di più di 5000 sostanze con elevata bioattività, cioè hanno proprietà nutraceutiche e terapeutiche oltre a conferire caratteristiche sensoriali ai frutti e possedere una significativa attività antiossidante. Tale proprietà è dovuta alla loro reattività come donatori di idrogeno o elettroni, la loro capacità di stabilizzare i radicali liberi grazie all'anello aromatico e di chelare i metalli impedendo loro di fungere da catalizzatori di reazione di ossidazione.⁹⁰ La proprietà di antiossidante è determinata dalla loro struttura chimica, i flavonoidi infatti sono caratterizzati dalla presenza di un gruppo orto 3',4'-diidrossilico nell'anello B, un gruppo 5,7-diidrossilico nell'anello A e un doppio legame 2,3 in combinazione con il gruppo chetonico in 4 e il gruppo idrossilico in 3 nell'anello C. (Figura 1.17) La modificazione di un singolo legame potrebbe comportare la diminuzione dell'attività antiossidante di queste sostanze.



Flavonoidi

Figura 1.17: *Struttura chimica dei flavonoidi.*

flavonoidi sono delle molecole molto presenti negli alimenti e nelle specie che utilizziamo tutti i giorni in cucina; infatti, li ritroviamo spesso nella maggior parte dei prodotti alimentari; cereali, oli, semi, ortaggi, frutti, erbe aromatiche, agrumi e piante officinali.

1.3.3. *Salvia libanotica*

La Salvia è un genere che comprende moltissime varietà di piante (circa 900 specie) facenti parte della famiglia delle *Lamiaceae*. All'interno di questo genere di arbusti troviamo, per esempio, la salvia che utilizziamo comunemente in cucina, il cui nome scientifico è *Salvia officinalis*, ma anche numerose erbe orientali, tra cui la *Salvia libanotica* (**Figura 1.18**). Quest'ultima è chiaramente differente dalla salvia occidentale a causa delle foglie trifoliate caratteristiche. La salvia libanotica viene utilizzata sin dal 1400 a.C. come medicina popolare in Libano e poi successivamente anche da erboristi spagnoli e marocchini.⁹¹ Si tratta di una pianta che cresce tipicamente nelle zone orientali dell'Europa: in Libano, Grecia, Palestina, Siria, ma anche al Sud Italia anche se cresce in maggiori quantità in libano (come suggerisce la denominazione della specie).⁹²



Figura 1.18: Pianta di *S. libanotica*

È stato appurato che gli oli essenziali della salvia conferiscono a questa pianta le proprietà antimicrobiche e antiossidanti che la rendono utile per le cure farmaceutiche. Infatti, è in grado di controllare il livello di colesterolo, di incrementare le attività cognitive, prevenire i tumori e le infiammazioni, ed infine può contribuire a ridurre lo stress. Questi effetti sono dovuti alla presenza di moltissimi elementi chimici presenti negli estratti di salvia che insieme determinano un effetto benefico sulla salute umana, per esempio: idrocarburi, terpeni, l'eucaliptolo ed il borneolo. Le proprietà antimicrobiche di questa pianta libanese, come si è detto, sono riconosciute da molti anni ed oltre ad essere sfruttate in ambito farmacologico e fitopatologico hanno acquisito un ruolo fondamentale anche per quanto riguarda la conservazione degli alimenti.⁹⁴ Difatti, è stato dimostrato che questa specie di pianta officinale ha un'attività antimicrobica moderata contro alcuni patogeni alimentari come *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* e *S. aureus*, dettata dalla presenza all'interno del suo olio essenziale di 1,8-cineolo, α -pinene, β -pinene, β -cariofillene e carvacrolo.⁹⁴ Inoltre, altri studi hanno dimostrato come la *Salvia libanotica* abbia un'attività antifungina data dalla sinergia di molti composti tra cui i più potenti sono il 1,8- cineolo e la canfora. Questo effetto antimicrobico è efficace contro varie specie fungine come, per esempio, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solanif. Cucurbitae*.⁹⁷ Tuttavia, la principale attività che viene attribuita all'olio essenziale della salvia è quella di antiossidante. Infatti, all'interno del suo olio essenziale si trovano moltissimi composti polifenolici che hanno un effetto benefico sia per le cellule del nostro corpo, ma anche per la conservazione degli alimenti.⁹³

2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questo lavoro è sfruttare degli scarti inutilizzati di industrie agroalimentari per la realizzazione di materiali bio-plastici attivi utili per il futuro confezionamento di alimenti. Tali materiali, in grado di rilasciare peptidi antibatterici derivati dalla cheratina e antiossidanti naturali estratti dalla salvia, oltre ad aumentare la shelf-life del prodotto contenuto in essi, potrebbero sostituire l'utilizzo della plastica. In questo lavoro si cerca di incentivare l'economia circolare nel settore agroalimentare cercando di trovare degli utilizzi per materiali come piume di avicoli allevati per le carni bianche e sottoprodotti dei tagli bovini lavorandoli per estrarne le proteine (cheratine) e sfruttandole per la realizzazione di biofilm ecologico e funzionale per alimenti.

Lo studio prevede la realizzazione di diverse prove di biofilm per valutare le concentrazioni ottimali di cheratina, gelatina, PVA e antiossidanti. Successivamente per ogni campione verranno studiate le proprietà chimico-fisiche, meccaniche, la capacità di inibire le reazioni ossidative che intaccano l'alimento durante la conservazione e l'efficacia nell'evitare la proliferazione e la crescita di microrganismi deterioranti e patogeni.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Materiali

I reagenti utilizzati nel nostro lavoro sono: tanolo (C_2H_5OH , 96° RPE, UN 1179, Carlo Erba Reagents); Tris(idrossimetil) amminometano ($C_4H_{11}NO_3$); EDTA (acido etilendiamminotetraacetico, $C_{10}H_{16}N_2O_8$); Idrossido di sodio (NaOH, UN 1823, Acido cloridrico (HCl); Acetato di Sodio ($C_2H_3NaO_2$); Cloruro ferrico ($FeCl_3$). Carbonato di Sodio (Na_2CO_3); Sodium hydroxide pellets), (MnO_2), della Carlo Erba Reagents; Urea (CH_4N_2O , Sigma Ultra); Metabisolfito di Sodio ($H_2S_2O_5$); SDS (Sodio dodecil-solfato, $C_{12}H_{25}NaO_4S$ Urea (CH_4N_2O , Sigma Ultra); Metabisolfito di Sodio ($H_2S_2O_5$); SDS (Sodio dodecil-solfato, $C_{12}H_{25}NaO_4S$, SIGMA-ALDRICH); reattivo di Folin–Ciocâlteu; Acido Gallico ($C_7H_6O_5$); reattivo ABTS (acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico); reattivo TPTZ (2,4,6-tri (2- Piridil) –S-triazina).

Per la realizzazione dei biofilm sono stati utilizzati: Gelatina bovina (E. Mark AG. DARMSTADT); cheratina da piume di pollo (donate dalla Azienda Fileni); Glicerolo ($HOCH_2CHOHCH_2OH$, Baker Analyzed); PVA (alcool polivinilico; $[C_2H_4O]_n$); *Salvia libanotica*,

Gli strumenti di analisi utilizzati in questo lavoro sono stati: Incubatore/agitatore di ibridazione (Stuart Scientific); Centrifuga (Chemie SAS, AIC microcentrifuge); Rotavapor (BUCHI Rotavapor R-200); Spettrofotometro (FLUOstar Omega®); Microscopio a scansione elettronica SEM (ZEISS SIGMA 300 FESEM Field Emission SEM); Spettroscopia Raman (Horiba iHRr320); Spettroscopia infrarossi FT-IR (Perkin-Elmer System 2000 FT-IR instrument); Tensile Test ()

3.2. Estrazioni degli oli essenziali *S. libanotica*

Le foglie di *Salvia libanotica* utilizzata per ottenere l'estratto sono state raccolte in un'area libanese vicino a Beirut, in particolare a Bechamoun, per poi essere pulite ed essiccate all'ombra a temperatura ambiente. Tuttavia, per questa estrazione è possibile utilizzare anche la tipica *Salvia officinalis* presente in Italia. Le piante essiccate sono state portate e conservate presso il dipartimento di bioscienze dell'Università di Camerino.

3.2.1 Estrazioni etanolo/acqua

Le foglie di salvia essiccate inizialmente sono state pestate utilizzando un mortaio separando le parti legnose della pianta. Campioni di 13,5 g di polvere ottenuti sono stati aggiunti alla miscela etanolo ed acqua distillata a concentrazioni 80:20 (v/v) per un totale di 225 mL. La soluzione è stata fatta riscaldare a 40°C per un'ora, al termine dell'estrazione la miscela è stata lasciata raffreddare per 10 minuti, è stata filtrata e centrifugata per 10 minuti a 3800 rpm e successivamente per altri 10 minuti a 12000 rpm, i residui ottenuti sono stati scaricati.

Il sovranatante costituito dall'estratto in una miscela di etanolo ed acqua è stato sottoposto ad evaporazione tramite un rotavapor (**Figura 3.1**), uno strumento che permette di abbassare il punto di ebollizione della componente idroalcolica grazie alla pressione negativa e all'immersione a bagnomaria (50°C). Il vapore composto dal solvente puro passa all'interno del condensatore verticale che, entrando in contatto con una superficie fredda, si condensa e le gocce vengono raccolte in un pallone. Questo solvente puro può essere riutilizzato per un'ulteriore estrazione. L'estratto rimasto dopo l'estrazione ricco di oli essenziali, antiossidanti e antibatterici è stato congelato (-20°C) per poi essere liofilizzato.



Figura 3.5: BUCHI Rotavapo R-200 utilizzato per la separazione dell'estratto dal solvente.

3.2.2 Estrazioni per infusione

L'infusione prevede l'estrazione degli oli essenziali attraverso l'utilizzo di acqua distillata. Anche in questo caso la polvere di salvia (13,5 g) è stata aggiunta a 225 mL di acqua, la miscela è stata posta ad agitare per 3 ore a temperatura ambiente e gli ultimi 10 minuti a 60°C. Questo aumento della temperatura serve per favorire l'estrazione, evitando di distruggere i composti fenolici, sensibili ai lunghi trattamenti ad alte temperature. Successivamente la miscela è stata filtrata e centrifugata prima a 3800 rpm e poi a 12000 rpm per separare i residui presenti nell'olio essenziale. Il sovrantante costituito dall'estratto in soluzione acquosa è stato congelato a -20°C e successivamente sottoposto a liofilizzazione.

3.3 Estrazione della cheratina da piume

Le piume utilizzate in questo studio sono state donate all'Università di Camerino dallo stabilimento Fileni Alimentare SPA con sede a Cingoli in provincia di Macerata. Si tratta di una delle più grandi aziende agroalimentari produttrici di carni avicole in Italia. Le piume sono state conservate in congelatore presso il dipartimento di bioscienze dell'università.

3.3.1 Estrazione della cheratina utilizzando il Metabisolfito

Preliminarmente, le piume sono state lavate con soluzione saponata e abbondante acqua, a fine a trattamento con acqua distillata per allontanare i vari residui ed asciugate in stufa per 12 ore a 50°C.

Successivamente, allo scopo di rimuovere i grassi e le cere depositate nelle piume 4 g di piume sono state miscelate con 200 mL di etanolo riscaldando a 40°C per 2 ore in un recipiente chiuso sotto agitazione. Le piume sono state filtrate in modo da separarle dall'etanolo e dai grassi estratti e poi lasciate asciugare in stufa per una notte. Come visto precedentemente l'etanolo utilizzato viene recuperato utilizzando il rotavapor e può così essere riutilizzato per successive estrazioni¹⁰⁰.

Come descritto, nella cheratina, i legami a ponte dello zolfo sia inter che intramolecolari formano una struttura tridimensionale compatta che conferisce elevata stabilità e resistenza agli agenti chimici e agli attacchi enzimatici.

Il processo di estrazione della cheratina, per la sua elevata stabilità tridimensionale, è piuttosto complesso e può avvenire mediante la rottura dei ponti disolfuro dei residui di cistina⁷³.

Il metodo di estrazione della cheratina dalle piume prevede:

4 g di piume di pollo macinate (precedentemente degrassate) sono state immerse in 150 mL di acqua distillata contenente 47,7 g di urea, 7,5 g di SDS, 15 g di metabisolfito di sodio, 195 mg di EDTA e 4,84 g di tris(idrossimetil)amminometano, La soluzione è stata incubata a 70°C per 24 ore sotto agitazione continua in un recipiente chiuso e alla fine dell'incubazione la miscela è stata filtrata per rimuovere il residuo parzialmente digerito. Successivamente la soluzione è stata sottoposta a dialisi contro acqua utilizzando una membrana da 3500 DA per circa 3 giorni a temperatura ambiente con relativi cambi d'acqua ogni 8 ore. A questo punto la soluzione è stata centrifugata a 10.000 rpm per 5 minuti per separare la proteina precipitata e il supernatante ottenuto può essere congelato e liofilizzato per ottenere una polvere di cheratina pura. La cheratina ottenuta è stata conservata a -20°C. Con questo metodo di estrazione si ottiene una

resa di cheratina pura intorno al 70-75%¹⁰⁰. Il processo è brevemente rappresentato nella **Figura 3.2**.



Figura 3.2: Processo di estrazione della cheratina a partire dalle piume di pollo.

3.3.2 Estrazione della cheratina di piume utilizzando NaOH

Questo metodo di estrazione della cheratina sfrutta una idrolisi basica dove 5 g di piume degrassate vengono finemente macinate e aggiunte a una soluzione di 200 mL di NaOH 1 N. La soluzione è stata incubata in un incubatore di ibridazione per 3 ore a 80-90°C in modo che l'NaOH favorisca l'idrolisi dei legami peptidici S-S. Al termine del trattamento la soluzione omogenea e liquida ottenuta è stata portata a pH=7 utilizzando HCl concentrato. Infine, la soluzione di cheratina è stata inserita all'interno di una membrana da 3500 Da e messa a dializzare per 3 giorni con relativi cambi di acqua ogni 8 ore. Dopo la dialisi, la soluzione è stata centrifugata a 10.000 rpm per 5 minuti per separare la proteina precipitata e il supernatante ottenuto può essere congelato e liofilizzato (**Figura 3.3**) per ottenere una polvere di cheratina pura. La cheratina ottenuta è stata conservata a -20°C¹⁰¹.



Figura 3.3: Cheratina liofilizzata estratta con la soda.

3.4 Formazione del materiale plastico

Per la realizzazione del materiale plastico, sono state fatte diverse prove utilizzando concentrazioni differenti di sostanze (**Tabella3.1**). In questo modo è stato possibile ottimizzare le caratteristiche fisico-chimiche del materiale. In **Tabella3.1** sono riportate le diverse concentrazioni dei componenti delle quattro prove effettuate e dei due campioni bianchi (senza estratto), realizzati per poter confrontare l'efficacia degli antiossidanti aggiunti al materiale per i test successivi.

	Cheratina mL (conc.)	Gelatina (2)	Acqua (mL)	Glicerolo (mL)	Antiossidante
Controllo 1	23,5 (34mg/ml)	2	25,5	1	
Controllo 4	23,5 (34mg/ml)	2	24,5	2	
Prova 1	10 (40mg/ml)	2	38,5	1	0,5 ml EO origano
Prova 2	20 (40mg/ml)	2	28,5	1	0,5 ml di EO castagno
Prova 3	20 (40mg/ml)	2	28,5	1	0,2 g di salvia (ET/H ₂ O)
Prova 4	20 (40mg/ml)	2	27,5	2	0,2 g di salvia (H ₂ O)

Tabella3.2: Sostanze e quantità utilizzate per la realizzazione delle quattro prove di materiale plastico/biofilm arricchiti di sostanze antiossidanti (Prova 1-2-3-4) e dei bianchi (Campione 1-2).

Per ogni prova la gelatina è stata sciolta in acqua distillata e lasciata agitare per 20 min e successivamente sono stati aggiunti glicerolo e cheratina di piume in soluzione digerita con metabisolfito di cui è stata calcolata la concentrazione. La soluzione ottenuta è stata riscaldata a 50°C per due ore, attraverso la temperatura le sostanze si sono amalgamate formando un composto denso. Al termine del riscaldamento, ove necessario, sono stati aggiunti gli oli essenziali naturali ricchi di sostanze fenoliche e antiossidanti. La soluzione è stata lasciata raffreddare per qualche minuto e poi versata in una piastra Petri di diametro 11 cm per due notti a temperatura ambiente.

Al fine di ottimizzare maggiormente la resistenza alle temperature, all'attività proteolitica dei microrganismi ed il mantenimento della forma originale sono state effettuate altre prove con l'utilizzo del PVA (alcool polivinilico) in sostituzione della gelatina. Anche in questo caso i campioni sono stati realizzati modificando una variabile alla volta per osservare i cambiamenti del loro comportamento (**Tabella3.2**).

	<u>Cheratina metabisolfito (mg)</u>	<u>Cheratina soda (mg)</u>	<u>Acqua (mL)</u>	<u>Glicerolo (mL)</u>	<u>PVA (g)</u>	<u>Antiossidante (mg)</u>
PVA C4	600	/	50	1	1,5	/
PVA 4.1	600	/	50	1	1,5	200
PVA 4.2	600	/	50	1	1,5	100
PVA 4.3	600	/	50	1	1,5	50
PVA C5	600	/	50	1	2,5	/
PVA C6	300	/	50	1	1,5	/
PVA NOC 4	/	/	50	1	1,5	100
PVA C7	150	/	50	1	1,5	/
PVA C8	/	150	50	1	1,5	/
PVA 8.1	/	150	50	1	1,5	50
SOLO PVA	/	/	50	1	1,5	/

***Tabella3.3:** Materiali e rispettive quantità utilizzati per la realizzazione dei film di PVA arricchiti di antiossidanti presenti negli estratti di salvia (con relativi controlli).*

Il protocollo per la realizzazione dei biofilm è lo stesso: il PVA è stato solubilizzato in 15 mL di acqua tramite riscaldamento a 80°C per 1 ora. In un altro becher la cheratina è stata sciolta in acqua. Quando entrambe le soluzioni sono risultate limpide sono state unite in un unico becher a cui sono stati aggiunti il glicerolo (1 mL) e l'estratto precedentemente solubilizzato in 5 mL di acqua. In alcuni campioni, come si vede dalla **Tabella3.2**, non è stato aggiunto l'estratto in quanto rappresentano dei controlli per le analisi successivamente effettuate.

In ogni caso tutte le soluzioni presentano un volume finale di 51 mL e dopo essere state omogenizzate per 30 min sotto agitazione sono state versate in una Petri di diametro 11 cm. Il biofilm dev'essere fatto asciugare per 3 giorni a temperatura ambiente prima di essere rimosso dalla piastra.

3.5 Quantificazione dei composti antiossidanti negli EO

Le analisi effettuate sfruttano l'ausilio di sostanze colorimetriche, che attraverso una reazione di ossido-riduzione reagiscono con fenoli e composti antiossidanti virando di colore. In seguito ad un'incubazione, i campioni vengono sottoposti a spettrometria molecolare UV-visibile; la quantità di luce assorbita dallo strumento è direttamente proporzionale alla concentrazione degli analiti. I dati ottenuti dalla spettrofotometria degli standard utilizzati, sono necessari per la costruzione delle rette di calibrazione avendo concentrazioni note di antiossidanti o fenoli. La retta mette in relazione la risposta dell'analita, in questo caso le lunghezze d'onda dei picchi ottenuti dallo standard (ordinate) con le concentrazioni (ascisse) delle molecole ricercate. Una volta determinato lo spettro di assorbanza dei campioni si individua il punto della retta corrispondente alla concentrazione, quantificando così antiossidanti o fenoli presenti negli estratti.

3.5.1 ABTS (Radical Cation Scavenging assay)

L'analisi ABTS viene applicata agli estratti vegetali per la quantificazione dei radicali antiossidanti sfruttando una reazione di ossido-riduzione che provoca una colorazione della soluzione campione in base alla concentrazione di antiossidanti presenti al suo interno. Per calibrare la relazione tra assorbanza, calcolata tramite spettrofotometro UV, e concentrazione di antiossidanti dev'essere costruita una retta di taratura utilizzando come standard di riferimento il Trolox. Nel saggio antiossidante ABTS, il composto sintetico ABTS viene ossidato in soluzione da ossido di manganese o persolfato di potassio per generare il catione radicalico di colore verde ABTS•. Composti antiossidanti in grado di trasferire un atomo di idrogeno o un elettrone causano la decolorazione della soluzione di ABTS•.

La soluzione concentrata di ABTS è così preparata: vengono pesati 10 mg di ABTS e solubilizzati in 4 mL di acqua distillata, poi si aggiungono 750 mg MnO₂. Si tiene in incubazione per minimo 30 min. Per preparare la soluzione diluita di ABTS si preleva 1 mL e si filtra, dopo di che si diluisce con etanolo fino a 50 mL. Il controllo è rappresentato dal Trolox che si prepara in concentrazione 1mg/mL di etanolo.

Si procede prendendo una piastra e inserendo 50 µL di ogni campione (5mg/ml) in doppio, incluso il controllo, nella prima riga. Per l'analisi si utilizza una piastra da 96 pozzetti con capacità di 300 µL, distribuiti su 8 righe e 12 colonne. Nella riga 1 si inietta con una

micropipetta 100 μL dei nostri campioni (5 mg/mL), uno per pozzetto, incluso il controllo. Ogni campione va analizzato in doppio, così nella riga 1, in due pozzetti adiacenti, si inserisce lo stesso campione. Dalla seconda riga fino all'ultima si iniettano 50 μL di etanolo in ogni pozzetto con una micropipetta multicanale. Si effettua una diluizione progressiva: con la pipetta multicanale si prelevano 50 μL dai pozzetti della riga 1 e si mischiano nella riga 2 e così progressivamente dai pozzetti della riga 1 fino ai pozzetti della riga 7. In questa riga si prelevano i 50 μL ma invece di iniettarli nei pozzetti dell'ultima, vanno buttati. Infine, in ogni pozzetto si aggiungono 200 μL di soluzione diluita di ABTS. Si mantiene in incubazione per 20 min, trascorsi i quali si legge l'assorbanza delle soluzioni a diversa diluizione nei pozzetti allo Spettrofotometro (**Figura 3.4**). I dati ottenuti, con l'ausilio della retta di calibrazione, determinano la concentrazione di antiossidanti espressa in IC50 mg/mL cioè concentrazione inibente: concentrazione di antiossidante necessaria per inibire del 50% le reazioni di ossidazione.

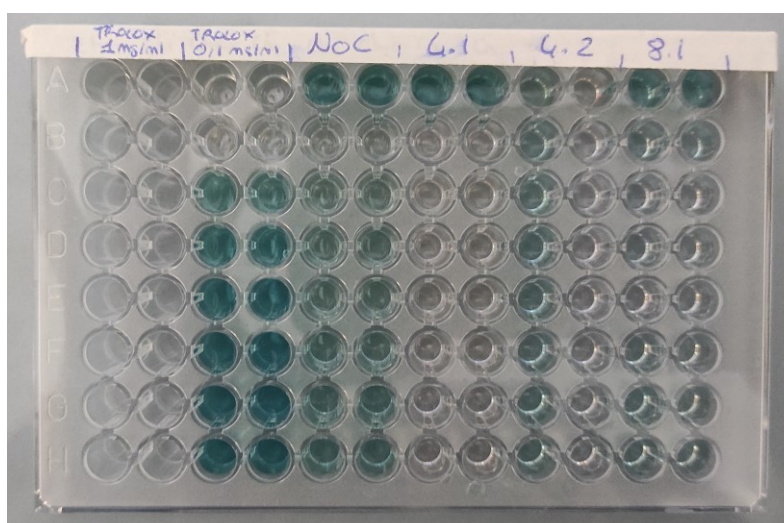


Figura 3.4: Saggio ABTS su piastra 96 pozzetti dopo incubazione

3.5.2 FRAP (Ferric Reducing Antiox Power Assay)

Il test FRAP è stato originariamente sviluppato da Benzie e Strain (1996) per misurare il potere riducente nel plasma. Successivamente è stato adattato e utilizzato anche per la determinazione di antiossidanti negli estratti botanici. Anche in questo caso per la quantificazione esatta di antiossidanti presenti negli oli essenziali è necessario costruire una retta di taratura che metta in relazione concentrazione ed assorbanza, utilizzando uno standard: il Trolox. (0,1 mg/mL)

La soluzione FRAP è stata preparata unendo 300 mM di tampone di acetato di sodio (pH 3.6) (per un volume totale di 15m l) a 10 mM di TPTZ solubilizzato in 40 mM di HCl (3 mL) e 20 Mm di FeCl₃ (1.875 mL).

Come nell'analisi precedente è stata usata una piastra da 96 pozzetti (**Figura 3.5**), nella prima riga della piastra si inseriscono 50 µL di ogni campione in doppio. Dalla seconda riga fino all'ultima con la micropipetta multicanale si aggiungono in ogni pozzetto 50µL di acqua. Si effettua la diluizione progressiva come nel caso precedente, dopo la quale in ogni pozzetto di ciascuna riga si aggiungono 200 µL di reattivo FRAP alla diluizione preparata. Si porta in incubazione per 15 min, trascorsi i quali si analizzano le assorbanze allo Spettrofotometro.

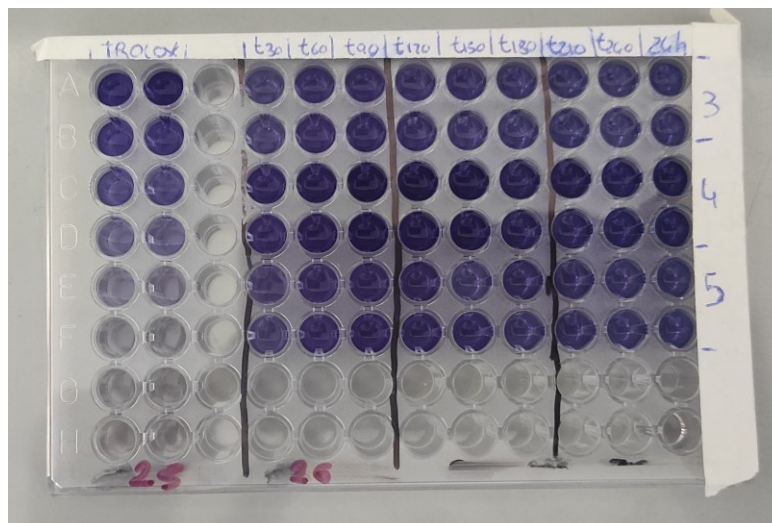


Figura 3.5: Saggio FRAP su piastra 96 pozzetti dopo incubazione

3.5.3 TPC (Total Phenolic Content)

Il Total Phenolic Content è una procedura di controllo ufficiale che viene utilizzata per la quantificazione dei fenoli presenti all'interno di un estratto vegetale. L'analisi prevede la determinazione spettrofotometrica tramite il reattivo di Folin-Ciocalteu, si basa su una reazione di ossido-riduzione che fa decolorare il cromoforo a seconda della quantità di fenoli presenti nella soluzione. Infine, attraverso una curva di calibrazione ottenuta con uno standard di riferimento (acido gallico) si determina la concentrazione fenolica del campione espressa in GAE (acido gallico equivalente per grammo estratto).

Per la soluzione diluita di reagente si diluisce 1 mL di reattivo di Folin-Ciocalteu (miscela in soluzione acquosa di fosfomolibdato e fosfotungstato) con 3 mL di acqua distillata (diluizione 1:4). Il controllo in questo saggio è rappresentato da una soluzione di acido gallico 0,1mg/mL di acqua.

Nella prima riga della piastra si inseriscono 100 μ L di ogni campione in doppio. Dalla seconda riga fino all'ultima con la micropipetta multicanale si aggiungono in ogni pozzetto 50 μ L di acqua. Si effettua la diluizione progressiva come nei due saggi precedenti, dopo la quale in ogni pozzetto di ciascuna riga si aggiungono 200 μ L di reattivo di Folin-Ciocalteu alla diluizione preparata. Si porta in incubazione per 20 min, trascorsi i quali si analizzano le assorbanze allo Spettrofotometro.

3.6. Caratterizzazione fisico-chimica del materiale plastico

3.6.1 Microscopia elettronica a scansione (SEM)

La microscopia elettronica a scansione (SEM) permette di osservare dettagliatamente le superfici dei campioni. Infatti, lo strumento genera un fascio di elettroni ad elevata energia che vengono veicolati verso la superficie del biofilm. La presenza del vuoto all'interno della camera che collega il generatore di elettroni e il campione, permette di ottenere un'immagine ad alta risoluzione della superficie analizzata. L'interazione degli elettroni con il campione genera due tipi di elettroni: quelli retrodiffusi (BSE) e quelli secondari (SE). Questi due tipi di ioni forniscono informazioni differenti, infatti i BSE sono molto sensibili alle differenze di numero atomico, in particolare più è alto il numero atomico, più chiara risulta l'immagine del materiale. Gli atomi SE permettono l'analisi elementare della superficie del campione, ma anche quella a raggi X rilevando gli spettri di ogni componente della superficie, anche gli atomi. Si tratta di un'analisi qualitativa perché permette di osservare quasi tutti gli elementi che compongono la superficie del campione, ma non è in grado di quantificarli, inoltre non è possibile vedere le sostanze organiche perché gli ioni H^+ non vengono rilevati.

L'analisi SEM è stata effettuata sui campioni: estratto di salvia, C4, C6, NoC 4.2, 8.1, 4.1, 4.2 e C8. I campioni sono stati prima metallizzati con il Cromo nm in modo da renderli conduttivi e poi analizzati con microscopia elettronica a scansione (**Figura 3.6**) con una tensione elettronica di 2 kV.



Figura 3.6: Strumentazione SEM utilizzata per questo studio.

2.6.2 Spettroscopia Raman

La spettroscopia Raman è una tecnica di spettroscopia molecolare che attraverso l'interazione tra luce e materia permette di identificare la struttura molecolare di un materiale. Si tratta di una rilevazione basata sull'assorbimento della materia di una luce monocromatica che determina una vibrazione dei legami intra- e intermolecolari. In base alla banda di assorbimento e l'altezza del picco è possibile identificare la natura delle molecole che compongono la materia analizzata. Tutti i campioni sono stati analizzati con spettrometro Raman con laser verde ad una lunghezza d'onda di 532 nm e con laser rosso ad una lunghezza d'onda di 798nm. La potenza dello strumento è stata impostata a 40 mV. (**Figura 3.7**)

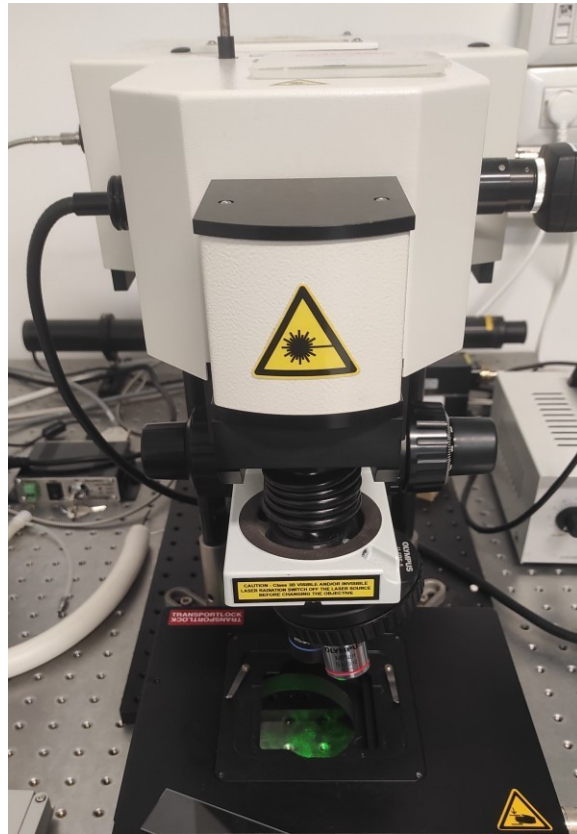


Figura 3.7: Spettroscopio Raman utilizzato in questo studio.

3.6.3 Spettroscopia ad infrarossi (IR)

La spettroscopia IR (**Figura 3.8**) è una tecnica analitica basata sull'interazione tra una radiazione elettromagnetica e la materia. Lo strumento funziona attraverso le frequenze d'onda dell'infrarosso che sono in grado di indurre delle vibrazioni agli atomi che compongono le molecole. Solitamente vengono analizzate molecole organiche la cui lunghezza d'onda applicata è compresa tra 4.000 e 400 cm^{-1} . La spettroscopia IR è una tecnica analitica qualitativa perché permette di determinare la tipologia di molecole presenti all'interno di un campione sulla base della lunghezza d'onda necessaria per farle vibrare. Il risultato che si ottiene da tale analisi è uno spettro di assorbimento i cui picchi rappresentano i gruppi funzionali delle molecole del campione. Questa tecnica analitica è molto utilizzata come tecnica predittiva perché lavora con il campione intatto, è un'analisi rapida e semplice da utilizzare.



Figura 3.8: Spettroscopia IR utilizzato per l'analisi dei campioni di questo studio.

I biofilm sono stati analizzati ponendoli tal quali sulla strumentazione IR ad una lunghezza d'onda tra i tra 4.000 e 400 cm^{-1} in modo da poter osservare le differenze tra le sostanze che compongono i diversi campioni.

3.6.4 Misurazione del grado igroscopico rispetto all'acqua

La misurazione del grado igroscopico rispetto all'acqua è stata fatta tagliando i materiali ottenuti in dischetti di diametro pari a 1 cm e pesati. Successivamente, ad ogni campione è stata aggiunta una quantità di acqua pari al suo peso. Una volta che il dischetto aveva assorbito tutta l'acqua presente è stata aggiunta nuovamente la stessa quantità d'acqua. Questa operazione è stata ripetuta per ogni campione finché il dischetto non aveva raggiunto il punto di saturazione. Questo parametro è stato valutato per capire la quantità d'acqua che il materiale è in grado di assorbire, utile per capire se il biofilm ha la capacità di trattenere i liquidi che possono fuoriuscire dal prodotto che fanno perdere l'accettabilità del consumatore, allungando così la shelf-life dell'alimento.

3.6.5 Misurazione della solubilità in acqua

La solubilità in acqua dei campioni è stata determinata attraverso il metodo di Narasagoudr, Hegde, Chougale et al. (2020) e Amalraj, Haponiuk, Thomas e Gopi (2020)⁹⁹ a cui sono state apportate delle modifiche. I film sono stati tagliati a dischetti di diametro 1 cm ed essiccati per 24 h ad una temperatura di 60°C. Successivamente, ogni dischetto è stato pesato (W_i) e poi immerso in 50 mL di acqua distillata e lasciato per 24 h a temperatura ambiente. Infine, i film sono stati nuovamente essiccati a 60°C per 24 h e ripesati (W_f). La solubilità è stata calcolata con la seguente formula:

$$\text{SOLUBILITA' (\%)} = \frac{W_i - W_f}{w_i} \times 100$$

Questo parametro è fondamentale per poter classificare un materiale come compostabile e biodegradabile. Indica, infatti la capacità del materiale di degradarsi in poco tempo in natura.

3.6.6 Misurazione del rilascio di antiossidanti da parte dei biofilm

Un materiale per essere considerato attivo deve poter determinare un effetto positivo al prodotto confezionato, in questo caso il biofilm essendo arricchito di salvia deve essere in grado di rilasciare sostanze antiossidanti nell'alimento favorendone la shelf-life.

La misurazione del rilascio di antiossidanti è stata fatta inserendo i campioni (tagliati a dischetti di diametro pari ad 1 cm) all'interno di 5 mL di acqua distillata. Ogni mezz'ora sono stati prelevati 0,5 mL di quest'acqua ricca di sostanze rilasciate dai biofilm e ogni volta sono stati reinserti 0,5 mL di acqua distillata pulita. Questo processo è stato ripetuto per tutti i campioni per un totale di 4h, l'ultimo prelievo è stato fatto dopo aver aspettato 24h di rilascio.

Sono state ottenute in totale 9 aliquote per ogni biofilm, per poter osservare l'andamento del rilascio di antiossidanti nel tempo è stato valutato attraverso l'analisi ABTS seguendo lo stesso protocollo descritto nei capitoli 3.4.2. (**Figura 3.9**)

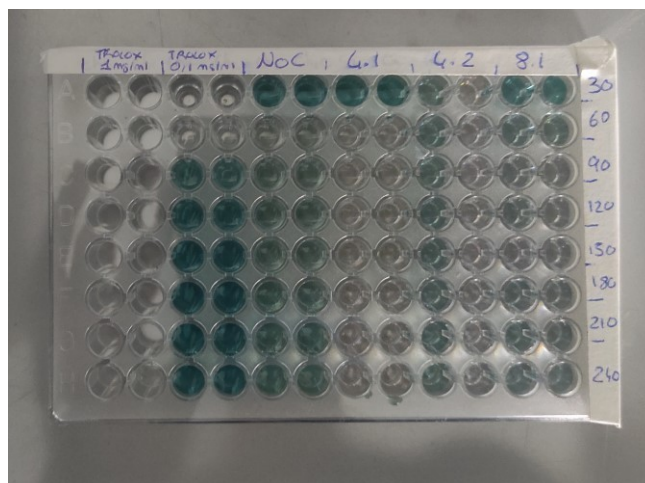


Figura 3.9: Analisi ABTS eseguita in questo studio.

3.5.7 Proprietà meccaniche: resistenza alla trazione

Il Tensile test o test di trazione permette la valutazione della resistenza alla trazione ultima, la resistenza alla rottura, l'allungamento massimo e la riduzione dell'area. La resistenza alla trazione (R_m) viene determinata per i materiali plastici seguendo la norma ISO 527. L'analisi viene effettuata posizionando il campione tra due "grip" che lo fissano, successivamente si applica un peso ad un'estremità, mentre l'altra rimane fissata, la forza viene aumentata continuamente mentre si monitora la variazione di lunghezza del campione.

I campioni PVA C4, PVA 4.1, PVA 4.2, PVA C7, PVA C8 e PVA 8.1, sono stati analizzati seguendo la norma ISO 527 ed in base ai dati relativi allo spostamento espresso in millimetri e al carico a cui ogni campione è stato sottoposto espresso in Newton è stato realizzato un grafico.

3.7 Inibizione microbica da parte dei componenti attivi del materiale plastico

3.7.1 Crescita di *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* su gelatina e cheratina di piume

L'attività antimicrobica dei componenti attivi dei film è stata fatta seguendo la norma ISO 20645:2004. Prevista per i test su tessuti con alcune variazioni descritte in seguito. Le specie batteriche utilizzati per verificare l'inibizione della gelatina, della cheratina di piume utilizzate per la realizzazione dei biofilms polimerici sono: *S. aureus* e *K. pneumoniae* come riportato in **Tabella3.3**.

Ceppo	Caratteristiche/utilizzo	Fonte riferimento	o
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	Ceppo isolato da lesioni, ampiamente impiegato per analizzare la sterilità, la sanificazione, la disinfezione di superfici industriali, la resistenza batterica a trattamenti antimicrobici nei tessuti e nelle piastre e come ceppo di per controllo per prodotti di Biosynth. L'utilizzo di questo ceppo è raccomandato da ATCC® per i test descritti dalle specifiche MIL G-13734B dove viene specificata solamente la tossicità. Questo ceppo viene utilizzato come riferimento per analisi genomiche ; sviluppo di farmaci; ricerca sulle malattie enteriche; test sugli alimenti; ricerca sulle malattie infettive; controllo di qualità; test dell'acqua.	ATCC (American Type Culture Collection)	
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 4352	Questo ceppo viene isolato dal latte bovino e applicato in ambito bioinformatico; nella ricerca di malattie infettive, controllo qualità, ricerca sulle malattie respiratorie.	ATCC	

Tabella3.3: *Ceppi batterici utilizzati per analizzare l'attività antimicrobica dei film e della cheratina.*

I terreni utilizzati riportati in **Tabella3.4** sono stati sterilizzati mediante calore in autoclave per 20 minuti a 121°C.

Mezzo di crescita	Ditta produttrice e composizione (g/L)
NBA	Realizzato con Nutrient Broth No.2 (OXOID CM0067, 25 g/L) e Agar Bacteriological No. 1 (OXOID LP0011, 1,2% p/v)
THIOGLYCOLLATE MEDIUM U.S.P	OXOID (CM0173)

Tabella3.4: Mezzi di crescita utilizzati nelle analisi microbiologiche presenti in questo studio.

Le piastre sono state allestite con due strati. Il primo, quello inferiore è stato realizzato ponendo 10 mL di NBA. Dopo solidificazione, è stato depositato il secondo strato superiore costituito da 7 mL di NBA al quale sono stati aggiunti in un terreno 4% p/v di cheratina estratta con metabisolfito e in un altro 4% p/v di gelatina. L'inoculo batterico è stato eseguito attraverso strisciamento. Le piastre sono state poste in incubatore per 24 ore a 37°C.

Successivamente è stata fatta un'ulteriore analisi per osservare l'attività inibitoria della cheratina estratta con due metodi differenti. In questo caso sono stati utilizzati entrambi i terreni presenti in **Tabella3.4**. Le piastre sono state preparate ponendo 10 ml di NBA/TGM nello strato inferiore e 7 mL di agar inoculato con 5×10^6 CFU di *S. aureus* o *K. Pneumoniae* in quello superiore. Nelle terreno agarizzato delle piastre così allestite sono stati creati dei pozzetti cilindrici a tutto spessore. In questi ultimi sono stati inseriti 100 µl di soluzione al 4% p/v di cheratina estratta con soda, metabisolfito o cheratina estratta prima con soda e poi con metabisolfito. La stessa procedura è stata effettuata su terreno di NBA inserendo nel pozzetto 25% p/v di PVA per verificare che il polimero di base non avesse attività contro i patogeni utilizzati nello studio.

3.7.2 Valutazione inibizione microbica dei biofilm

La valutazione dell'inibizione microbica dei biofilm polimerici allestiti è stata effettuata secondo la procedura ISO 20645:2004, con alcune modifiche. I ceppi utilizzati sono riportati in **Tabella 3.3** ed il terreno NBA descritto in **Tabella 3.4**. I mezzi di cultura sono stati realizzati come riportato nel capitolo **3.7.1** ed inoculati per inclusione.

In questo caso su ogni piastra sono stati posti due dischetti del polimero da 1 cm di diametro, i campioni analizzati sono: C4, 4.1, C7, C8, 8.1, un campione di solo PVA e di PVA (campione denominato NoC nella **Tabella3.2**) con salvia; in questo modo sono stati confrontati i campioni con diversa quantità di cheratina (con e senza salvia), i campioni realizzati con la stessa concentrazione di cheratina ma estratta in modo differente (con e senza salvia) e come controllo sono stati utilizzati i campioni realizzati senza la proteina ma con solo PVA (con e senza estratto di salvia).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Quantificazione delle sostanze antiossidanti negli estratti di *S. libanotica*

Le analisi effettuate per la quantificazione delle sostanze antiossidanti negli estratti hanno dimostrato, come riportato in **Tabella4.1**, come la salvia contenga una quantità significativa di fenoli e polifenoli. In particolare, risulta che il metodo di estrazione più efficace sia l'estrazione con la soluzione di etanolo e acqua.

	ABTS IC50 mg/mL	FOLIN mg A. Gallico/grammo	FRAP mg Trolox/grammo
SALVIA acqua	0,0121	39,6 (+/- 10)	3,28 (+/- 1,2)
SALVIA EtOH- acqua	0,0255	81,6 (+/- 27)	4,99
TROLOX 1 mg/MI	0,0182		
TROLOX 0,1 mg/mL	0,0107		

Tabella4.1: Risultati analisi ABTS, TPC e FRAP degli estratti di salvia.

Dai dati riportati per il saggio ABTS possiamo notare che gli estratti hanno una notevole attività antiossidante, infatti, risultano avere una IC50 pari a quella ottenuta dal Trolox utilizzato come riferimento.

4.2. Materiale plastico realizzato

Come indicato nei Materiali e Metodi (Tabella 3.1), le pellicole realizzate nel presente lavoro di tesi presentano caratteristiche diverse in base alla quantità di cheratina aggiunta, al metodo di estrazione della cheratina adottato ed alla presenza e quantità di estratto di estratto

Sono state infatti sviluppate e preparate 4 diverse tipologie di pellicole (P) denominate: P1, P2, P3 e P4 (**Figura 4.1**). Le pellicole realizzate con cheratina di piume in soluzione appaiono tutte uniformi e dotate di una apprezzabile trasparenza. Al crescere della quantità di glicerolo utilizzato le pellicole al tatto risultano più flessibili, caratteristica ottenuta grazie anche alla presenza della gelatina. È stato osservato che la presenza dell'estratto nella prova P4 rende i film più flessibili rispetto al campione di controllo. Come si può notare in figura tra i biofilm realizzati con gelatina la pellicola P4 appare la preparazione ottimale perché più flessibile e trasparente.

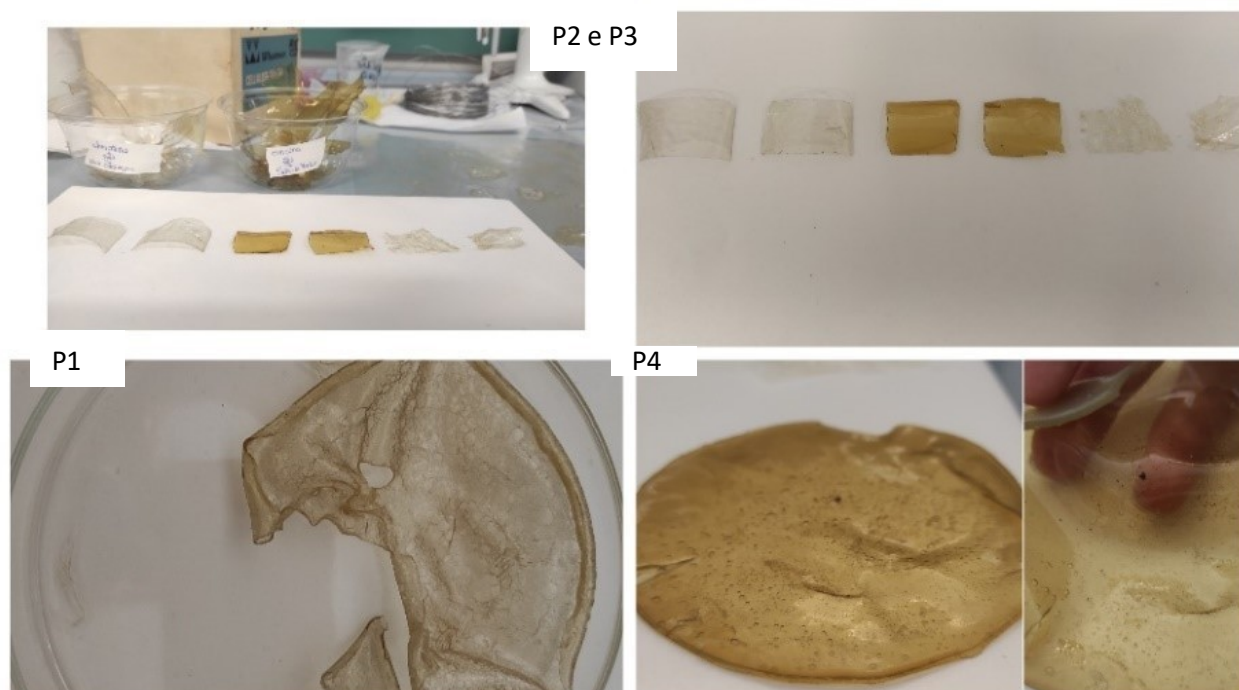


Figura 4.4: Pellicole realizzate in questo studio in alto P3 (20 mL di cheratina ed estratto di salvia) e P2 (20 mL di cheratina ed estratto di castagno), in basso a sinistra P1 (10 mL di cheratina e d'estratto di origano) e in basso a destra P4 (20 mL di cheratina, estratto di salvia ma 2 glicerolo)

Le varie formulazioni sono state sottoposte a successive prove per verificare la resistenza dei materiali a diverse temperature, quantità d'acqua assorbita e attività nei confronti dei

microrganismi ed è stato constatato che la presenza della gelatina tutte le formulazioni rendeva suscettibili all'azione di tali fattori, soprattutto le pellicole P1, P2, P3 e P4, erano estremamente sensibili all'acqua e si dissolvevano rapidamente trasformandosi in un gel (**Tabella 4.2**). Per questa ragione successivamente la formulazione del materiale plastico è stata modificata realizzando nuovi campioni sostituendo la gelatina con il polimero PVA (**Tabella 3.2**). Il PVA era stato scelto perché conferisce una maggior resistenza sia alle alte temperature che maggiore indeformabilità, alta resistenza al rigonfiamento quanto posto a contatto con l'acqua, maggior plasticità e resistenza alla trazione (**Figura 4.2**).

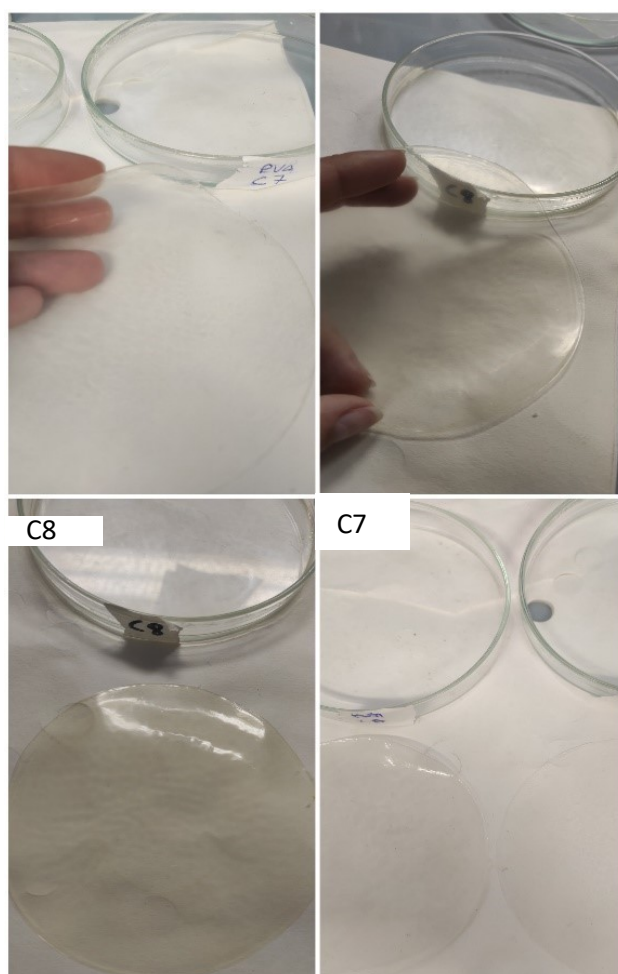


Figura 4.3: Confronto tra i campioni C7 (150 mg di cheratina estratta con NaOH, PVA e glicerolo) e C8 (150 mg di cheratina estratta con metabisolfito, PVA e glicerolo)

Sono state realizzate varie pellicole con composizione variabile della cheratina e soprattutto con cheratine digerite con metodi diversi seguendo lo schema mostrato in **Tabella 4.2**. In **Figura 4.3** è possibile notare come le pellicole realizzate con la cheratina di piume estratta con NaOH (C8), essendo maggiormente solubile, risultino molto più trasparenti ed omogenee

rispetto a quelle realizzate con la cheratina estratta con metabisolfito (C7), mantenendo in entrambi i casi la concentrazione costante dei componenti. Questa differenza può essere dovuta alla solubilità delle due cheratine, infatti la cheratina estratta con NaOH, essendo più frazionata durante la digestione, risulta più facilmente solubile in acqua, mentre quella estratta con metabisolfito in acqua non genera mai una soluzione totalmente omogenea, probabilmente perché le catene di cheratina presenti risultano di peso molecolare più alto rispetto a quelle ottenute attraverso la digestione con NaOH. La preparazione delle pellicole C4 e C5 realizzate con concentrazioni differenti di cheratina estratta con metabisolfito mostrano delle apprezzabili differenze di opacità (**Figura 4.4**).

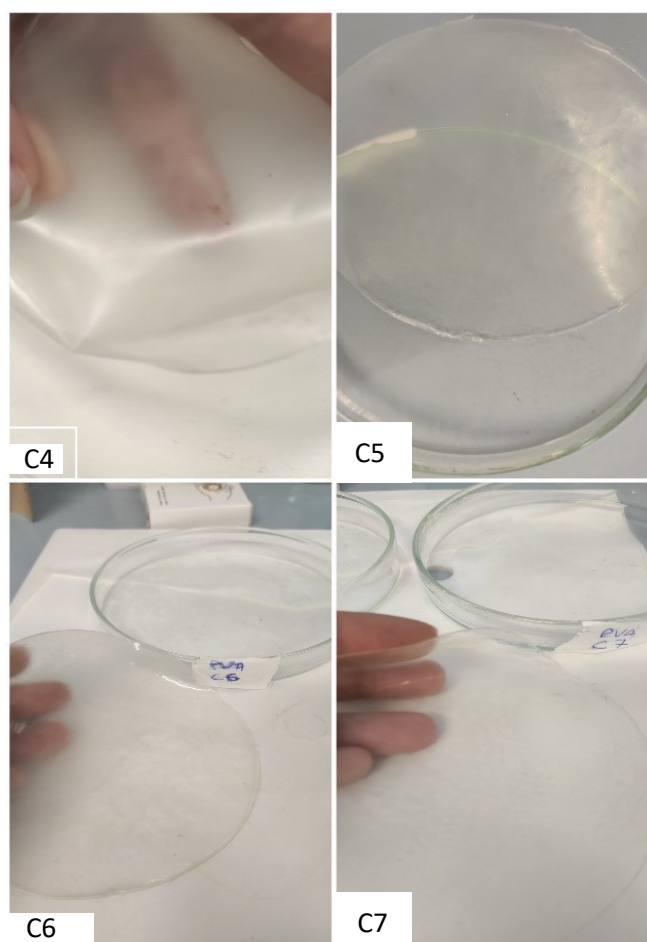


Figura 4.4: C4 in alto a sinistra (600 mg di cheratina estratta con metabisolfito, PVA e glicerolo), C5 in alto a destra (300 mg di cheratina estratta con metabisolfito, PVA e glicerolo), C6 in basso a sinistra (300 mg di cheratina estratta con metabisolfito, PVA e glicerolo) e C7 in basso a destra (150 mg di cheratina estratta con NaOH, PVA e glicerolo).

Anche in questo caso la differenza di opacità tra le pellicole riportate nella figura è dovuta alla solubilità della cheratina estratta con metabisolfito. Infatti, C4 e C5 che contengono rispettivamente 600 mg e 300 mg risultano disomogenee ed opache. Mentre, man mano che la concentrazione di cheratina diminuisce, C6 e C7, i biofilm appaiono più trasparenti ed omogenei. La concentrazione di proteina che determina a livello visivo il miglior risultato è 150 mg, mentre la tipologia di estrazione della cheratina che permette di realizzare dei biofilm perfettamente omogenei e trasparenti è l'estrazione con la NaOH.

Allo scopo di formulare un esempio di packaging attivo è stato aggiunto, ai vari tipi di pellicole, l'estratto di salvia, del quale avevamo testato le proprietà antiossidanti a diverse concentrazioni (**Figura 4.5**). L'estratto conferisce un colore scuro alle pellicole proporzionale alla quantità di estratto aggiunta.

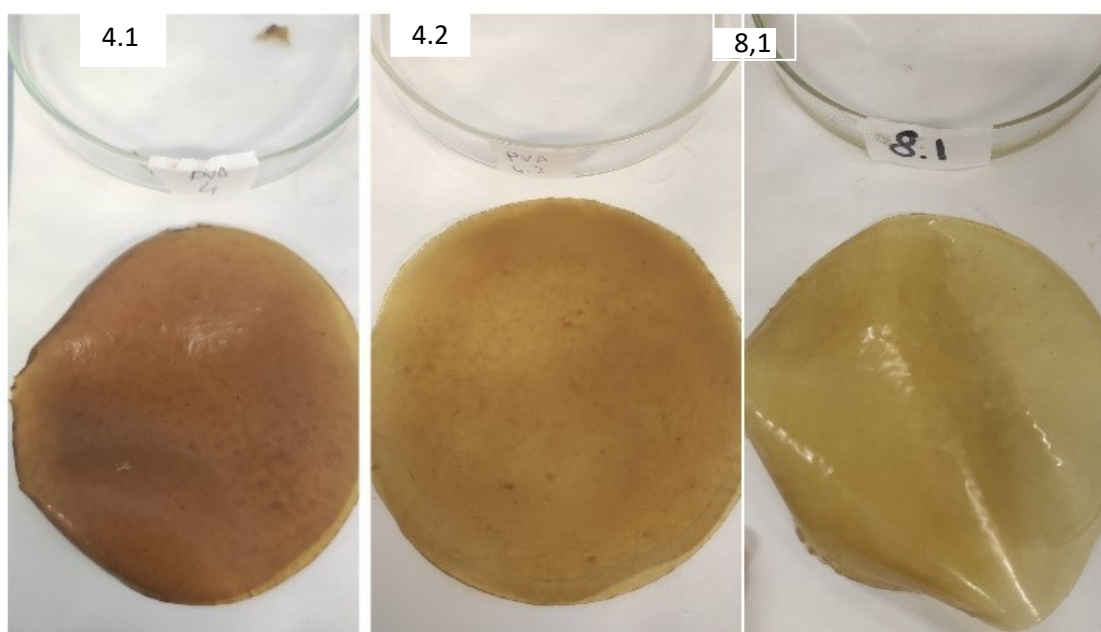


Figura 4.5: In ordine da sinistra il campione 4.1, 4.2 e 8.1 con concentrazioni decrescenti di estratto di salvia.

È possibile notare come la presenza dell'estratto non incida sull'opacità del materiale ma solamente sull'intensità del suo colore. La concentrazione di estratto ottimale a livello visivo sia per la tonalità di colore sia per omogenizzazione nel materiale è 50 mg.

4.3. Caratterizzazione fisico-chimica del materiale plastico

4.3.1 Microscopia elettronica a scansione (SEM)

I campioni di pellicole prodotte che sono stati analizzati dalla tecnologia SEM e in particolare: C4, 4.1, 4.2, C6, C8, 8.1, NOC 4 e l'estratto di salvia. La **figura 4.6** rappresenta la morfologia dell'estratto di salvia.

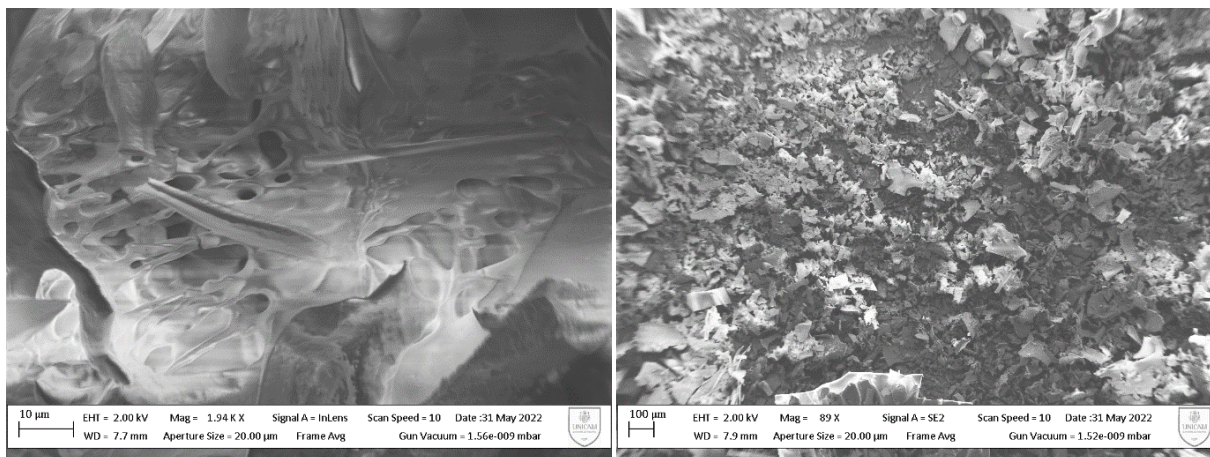


Figura 4.6: Immagini SEM dell'estratto di salvia visto a diversi ingrandimenti.

Nelle immagini si può notare la struttura cristallina dell'estratto di salvia, struttura che risulta essere parzialmente evidente anche nei biofilm analizzati in cui è stato aggiunto l'estratto, cioè i campioni 4.2 e 8.1 (**Figura 4.7**). Tuttavia, l'analisi SEM dei materiali plastici è risultata difficoltosa, le immagini raccolte hanno una risoluzione compresa da 2 a 100 µm, che permette un'osservazione della superficie molto distante (**Figura 4.8**). L'aumento della precisione dell'osservazione non è stato possibile a causa della presenza del glicerolo e della cheratina, composti che si danneggiano facilmente al passaggio del fascio elettronico data l'alta temperatura generata. È, infatti, noto che la microscopia elettronica sia una tecnica molto invasiva⁹⁸.

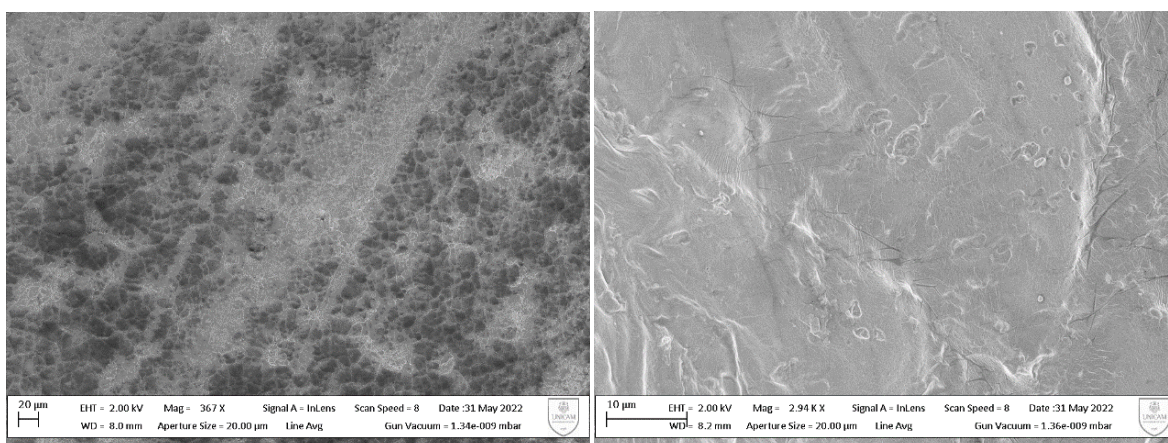


Figura 4.7: Immagini SEM di 4.2 (pellicola con 600 mg di cheratina estratta con metabisolfito, PVA, glicerolo e 100 mg di estratto di salvia) a sinistra e 8.1 (pellicola con 150mg di cheratina estratta con NaOH, PVA, glicerolo e 50 mg di estratto di salvia) a destra.

I due materiali confrontati nella **Figura 4.7**, contengono la stessa quantità di estratto e la risoluzione è la stessa. I biofilm arricchiti con estratto di salvia risultano abbastanza omogenei anche se presentano dei piccoli cristalli di estratto, che si notano soprattutto nel campione 4.2. L'immagine del campione 4.2 presenta delle piccole macchie nere dovute a zone specifiche che hanno subito un parziale incenerimento durante l'analisi.

Le immagini SEM rappresentate nella **Figura 4.8** mettono a confronto tre campioni: rispettivamente C4, C6 e C8. In particolare, i campioni C4 e C6 sono realizzati con due concentrazioni differenti di cheratina estratta con il metabisolfito mentre i campioni C6 e C8 contengono la stessa quantità di cheratina C6 è stata utilizzata la cheratina estratta con metabisolfito mentre C8 la cheratina estratta con NaOH. L'analisi SEM conferma quanto precedentemente notato in quanto è possibile notare come la cheratina estratta con NaOH si sia solubilizzata maggiormente rispetto alle precedenti e abbia originato un film abbastanza omogeneo.

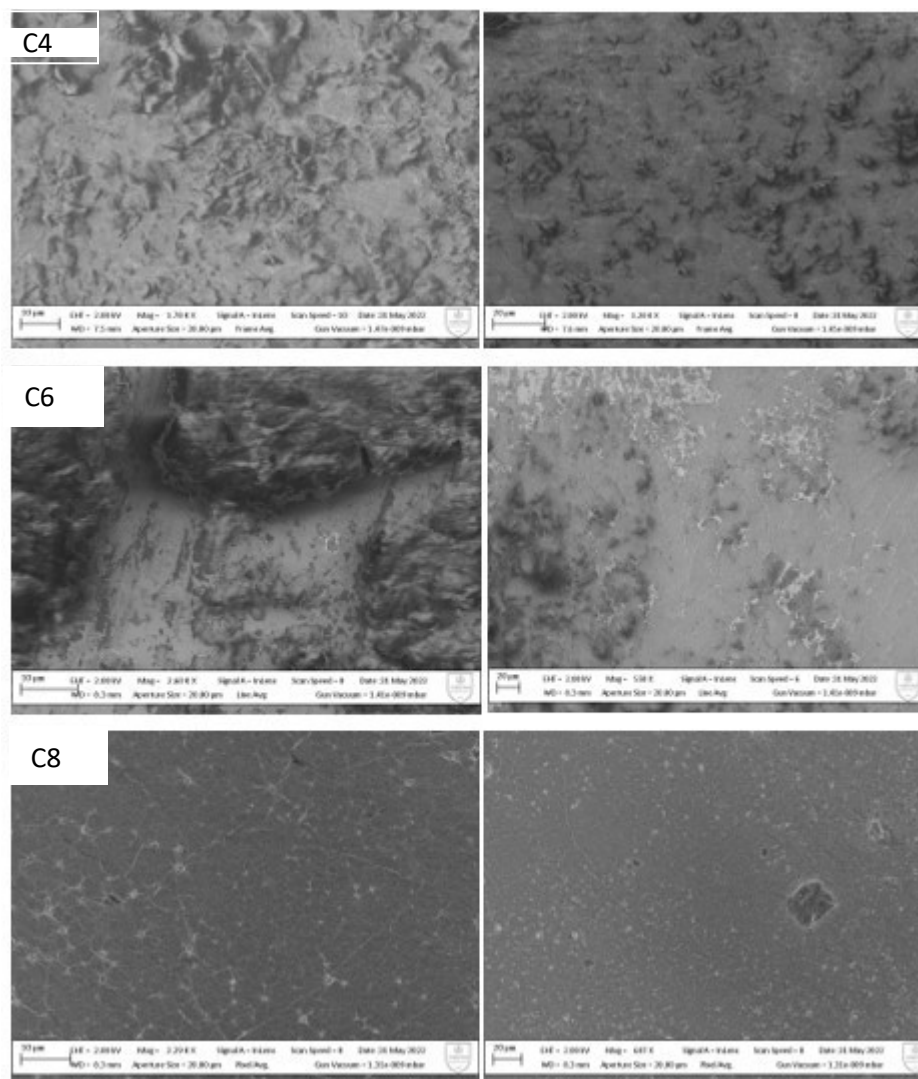


Figura 4.8: Immagini SEM ordinate dall'alto al basso rispettivamente C4 (pellicola con 600 mg di cheratina estratta con metabisolfito, PVA e glicerolo), C6 (pellicola con 300 mg di cheratina estratta con metabisolfito, PVA e glicerolo) e C8 (pellicola con 150 mg di cheratina estratta con NaOH, PVA e metabisolfito).

Anche in questo caso le eventuali macchie scure presenti sulle immagini sono dovute all'incenerimento del materiale durante l'analisi. Tuttavia, molto importante, è possibile notare come in tutti i casi la cheratina si leghi con il PVA, dando vita ad una struttura lineare tipica delle proteine a β -foglietto visibile attraverso le linee bianche che si intravedono nelle immagini.

4.3.2 Analisi dei campioni mediante spettroscopia Raman

L'analisi dei vari preparati mediante spettroscopia Raman ha dato dei risultati significativi solamente per i campioni a cui non era stato aggiunto l'estratto. Questo perché, molto probabilmente, i segnali dovuti alla presenza dell'estratto di salvia, produce una saturazione del segnale e copre eventuali i segnali degli altri componenti del biofilm. Gli spettri ottenuti dai campioni C4, C6 C8 (**Figura 4.9**) mostrano i picchi caratteristici di PVA e glicerolo, tuttavia le bande caratteristiche della cheratina rispettivamente al numero d'onda 1600 cm^{-1} dell'amide I, 1450 cm^{-1} del gruppo CH_2 e $1200\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ dell'amide III, sono molto poco pronunciati.

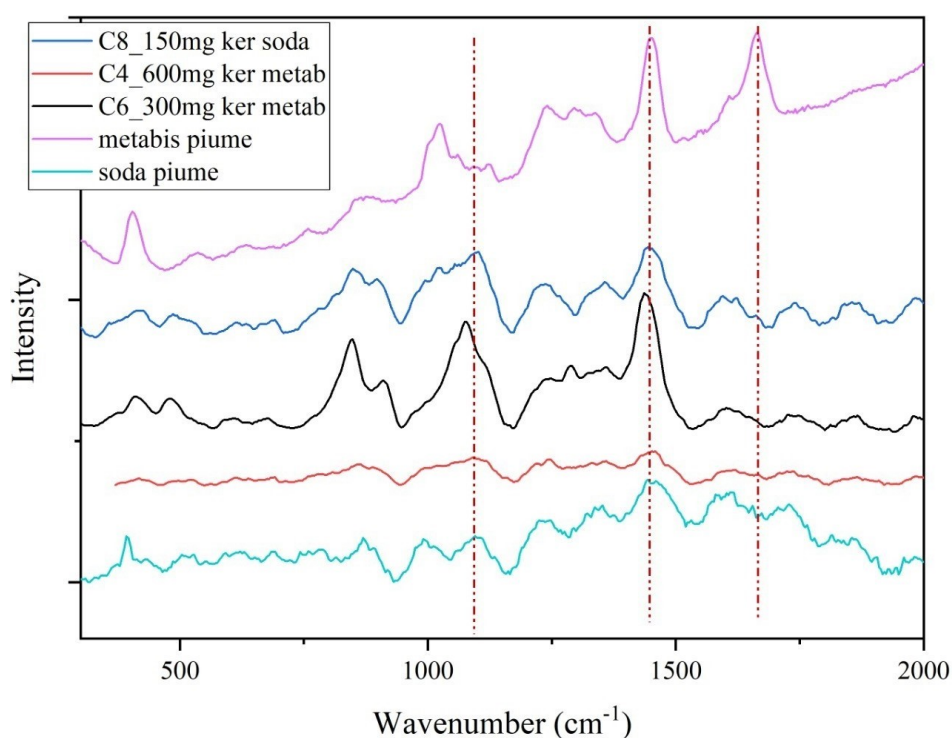


Figura 4.9: Confronto spettri Raman dei campioni C4 (pellicola con 600 mg di cheratina estratta con metabisolfito, PVA e glicerolo), C6 (pellicola con 300 mg di cheratina estratta con metabisolfito, PVA e glicerolo) e C8 (pellicola con 150 mg di cheratina estratta con NaOH, PVA e metabisolfito e della cheratina tal quale estratta con metabisolfito e con NaOH)

4.3.3 Analisi dei campioni mediante spettroscopia ad infrarossi (IR)

Gli spettri ottenuti dalle analisi IR dei campioni sono stati confrontati tra loro in modo da poter osservare le differenze dovute alla diversa composizione dei biofilm. Nella **Figura 4.10** sono stati messi a confronto lo spettro della cheratina di piume estratta con metabisolfito e quello della cheratina di piume estratta con soda. La cheratina nell'analisi IR viene identificata attraverso la presenza di picchi caratteristici cioè:

- 3300 cm^{-1} → Ammide A, corrisponde alla vibrazione stretching dei legami OH e NH;
- Tra 1600 e 1700 cm^{-1} → Ammide I, corrisponde alla vibrazione bending del doppio legame CO;
- 1520 cm^{-1} → Ammide II, corrisponde alla vibrazione stretching del legame NH;
- Tra 1220 e 1300 cm^{-1} → Ammide III, corrisponde alla vibrazione bending del legame NH e alla vibrazione stretching del doppio legame CO.⁹⁷

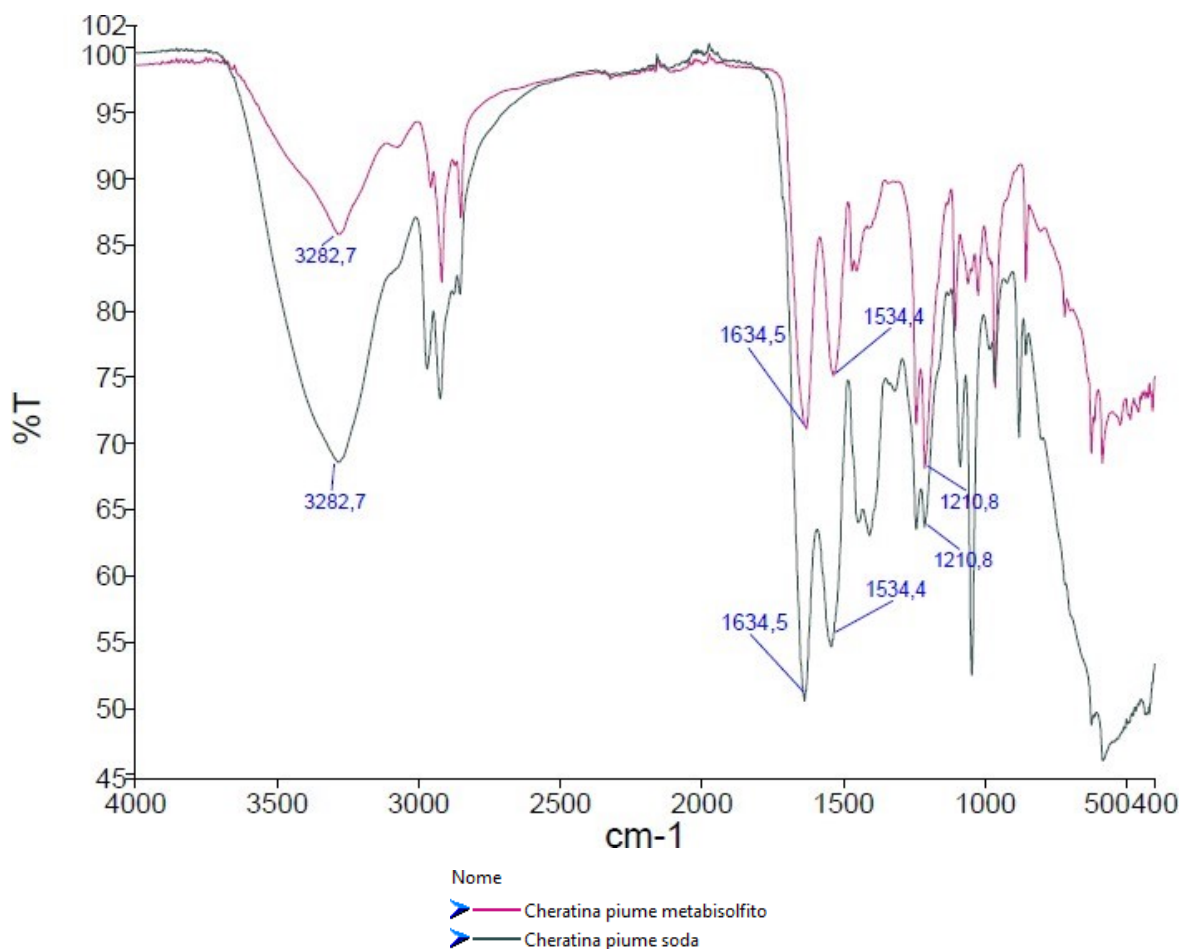


Figura 4.10: Confronto spettri delle cheratine di piume estratte con due metodi differenti.

L'immagine sottolinea le differenze tra le cheratine ottenute tramite i due metodi di estrazione. In entrambi i casi sono evidenti i picchi caratteristici della cheratina anche se nel caso della cheratina estratta con soda sono molto più netti, questo può sottolineare la capacità della soda di realizzare dei peptidi di peso molecolare minore e quindi i gruppi funzionali caratteristici della cheratina essendo più liberi vengono riconosciuti dallo strumento con più facilità.

Nella **Figura 4.11** sono stati messi a confronto il biofilm C4 (**Tabella 3.2**) e la cheratina liofilizzata utilizzata per realizzarlo.

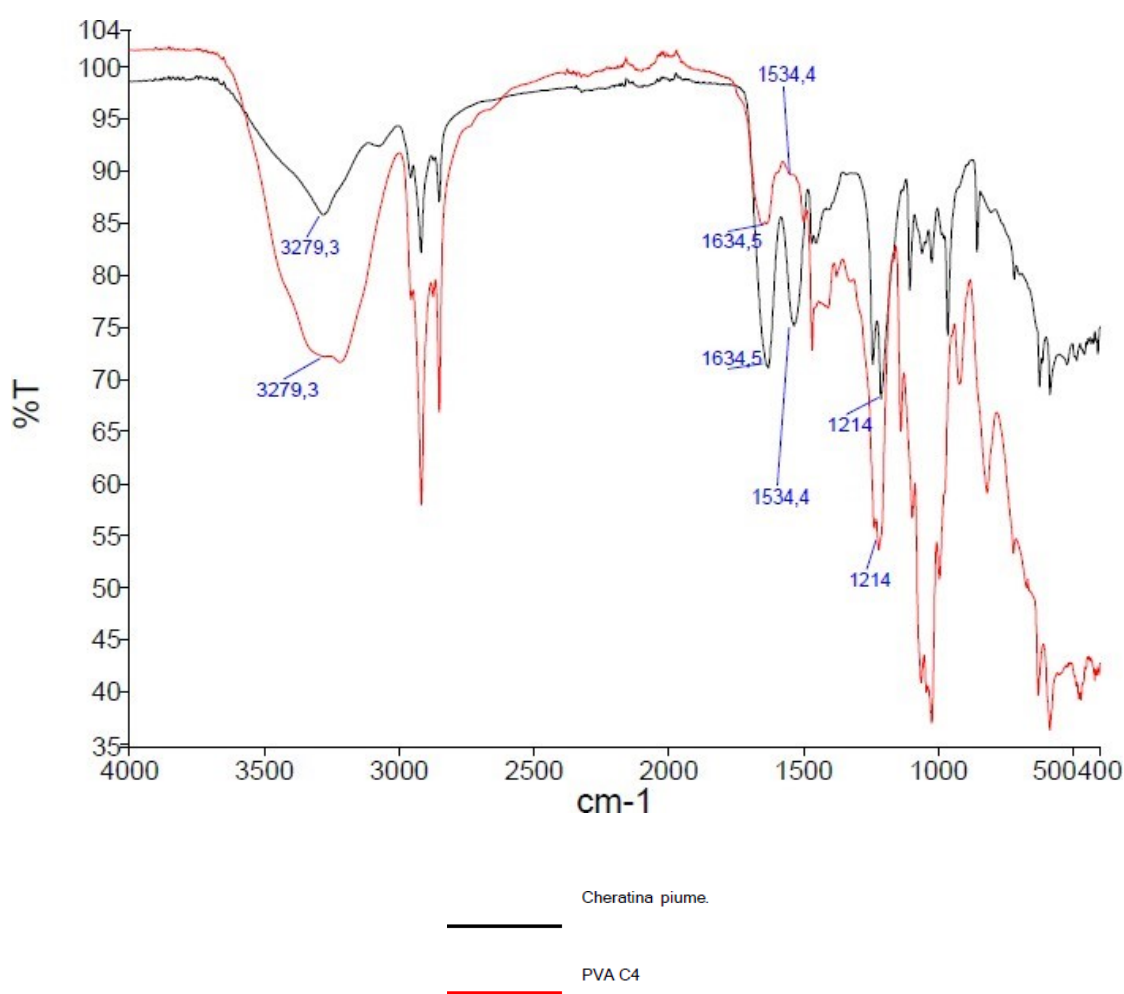


Figura 4.11: Confronto campione C4 (600 mg di cheratina estratta con metabisolfito, PVA e glicerolo) e la polvere di cheratina utilizzata per realizzarlo.

I picchi caratteristici delle ammidi sono molto più pronunciati nel film rispetto allo spettro della cheratina tal quale, in particolar modo il picco intorno a 3300 cm^{-1} relativo all'ammide A, il picco a 1634 cm^{-1} relativo all'ammide I e il picco a 1214 cm^{-1} relativo all'ammide III. Interessante

invece è l'attenuarsi del picco relativo all'ammide II nella banda 1534 cm^{-1} , questo potrebbe significare che il PVA abbia interagito con la cheratina oppure, essendo in concentrazioni maggiori rispetto alla cheratina all'interno del biofilm, abbia coperto il segnale del gruppo funzionale. La presenza del PVA è visibile attraverso il picco molto evidente nella banda intorno a 1000 cm^{-1} , presente anche nel confronto tra il campione e il film realizzato con PVA e glicerolo senza cheratina. (**Figura 4.12**)

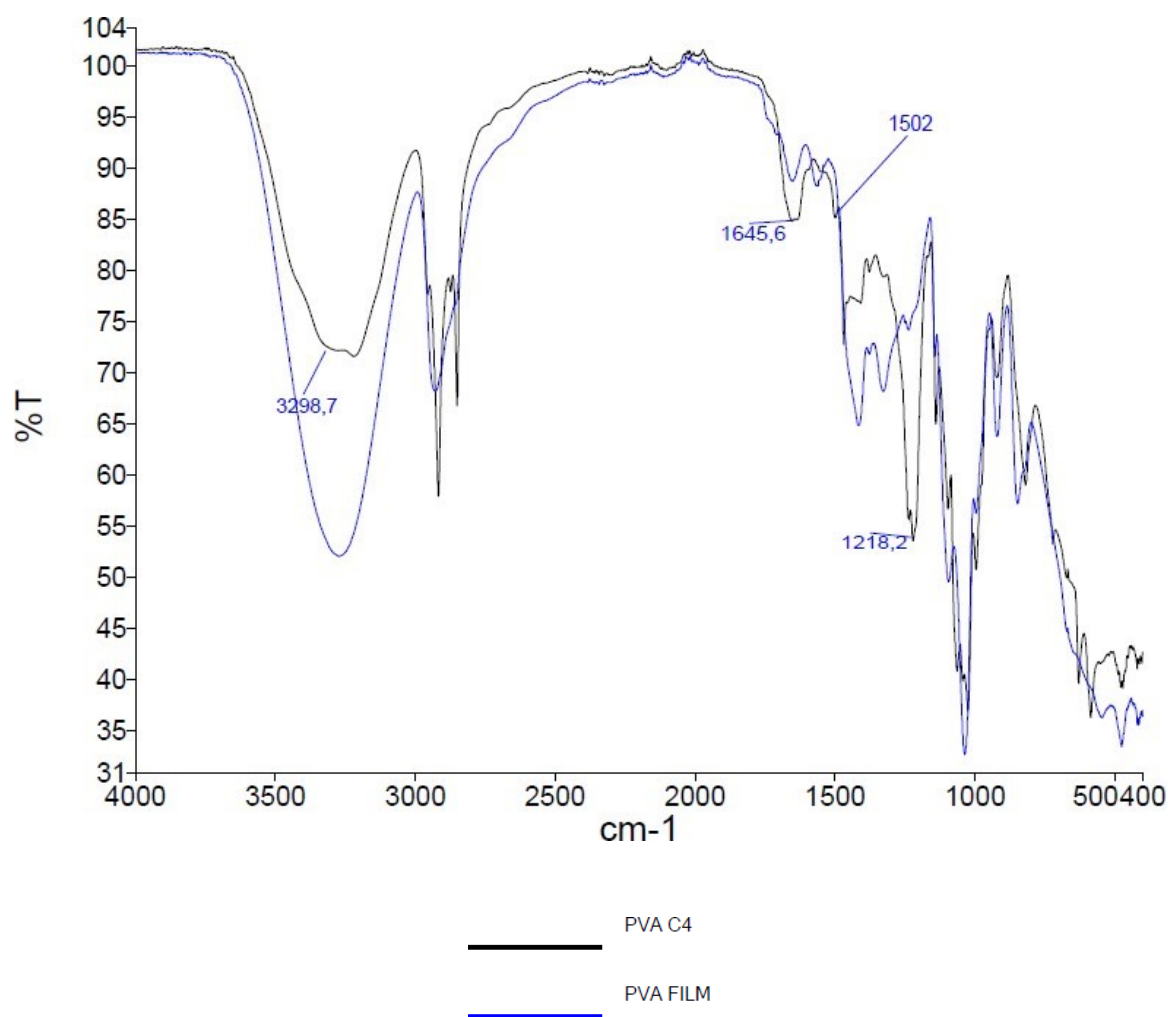


Figura 4.12: Confronto C4 (600 mg di cheratina estratta con metabisolfito, PVA e glicerolo) e film di solo PVA.

Il confronto in **Figura 4.12**, oltre a rappresentare i picchi identificativi del PVA che si sommano spesso a quelli del profilo della proteina, evidenzia soprattutto la presenza della cheratina nel biofilm; infatti, il campione C4 presenta due picchi in più rispetto al film di solo PVA, che si

trovano nelle bande 2800 cm^{-1} , 1645 cm^{-1} e 1218 cm^{-1} . In particolare, gli ultimi due rappresentano rispettivamente l'ammide I e l'ammide II.

Gli stessi confronti sono stati fatti anche per il campione realizzato con cheratina estratta con NaOH. (Figura 4.13 e Figura 4.14). Come nel caso precedente il profilo del campione C8 (Tab. 3.2) è molto simile a quello della cheratina utilizzata per estrarlo ma la presenza del PVA intensifica i picchi nelle bande 3279 cm^{-1} e intorno alla banda 1000 cm^{-1} , allo stesso tempo ammorbidisce il picco relativo all'ammide I.

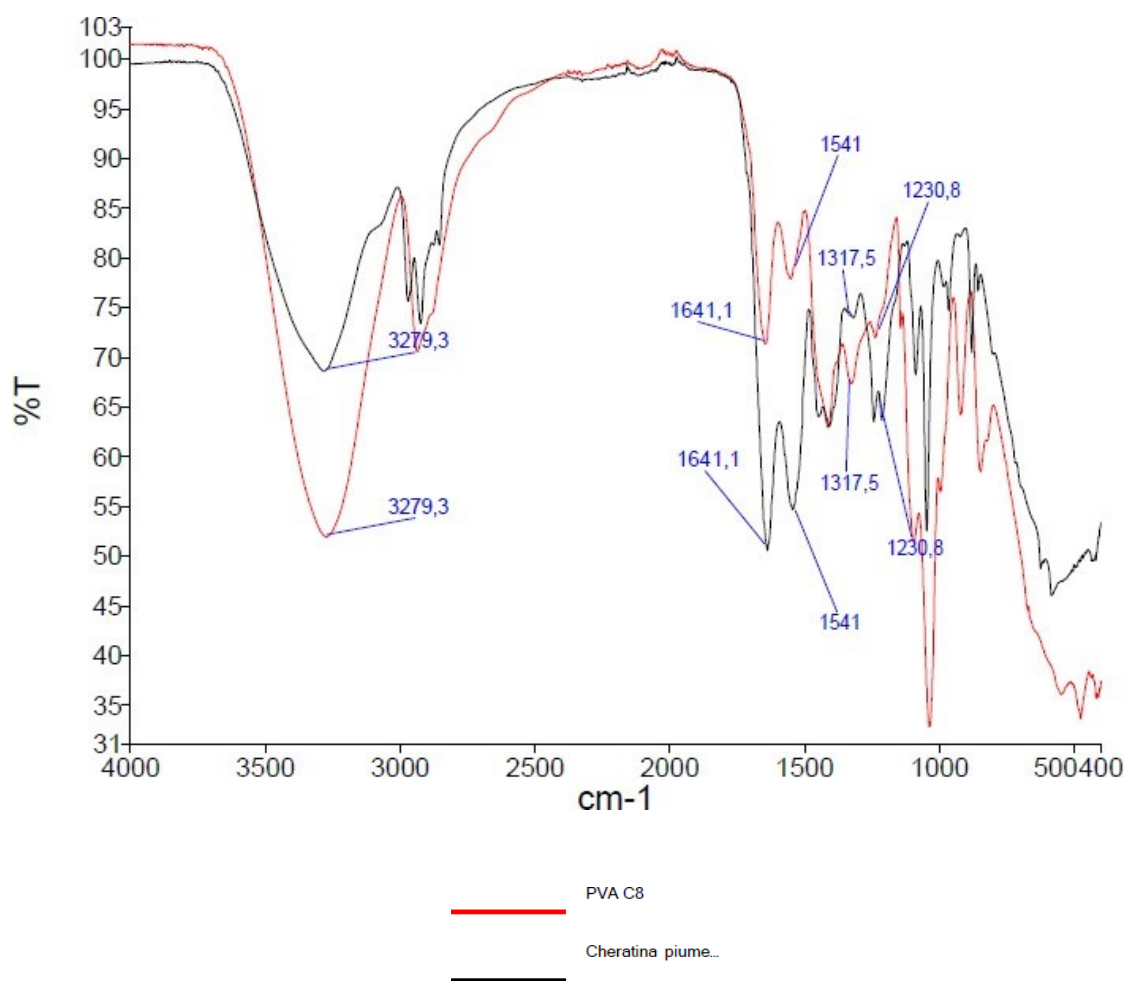


Figura 4.13: Confronto film realizzato con cheratina estratta con soda e la cheratina utilizzata per estrarlo.

La Figura 4.14, invece, evidenzia la presenza della cheratina nel campione C8 determinata da un picco caratteristico che differisce dallo spettro del campione in cui la proteina non è presente, cioè il picco nella banda 1645 cm^{-1} che rappresenta l'ammide I.

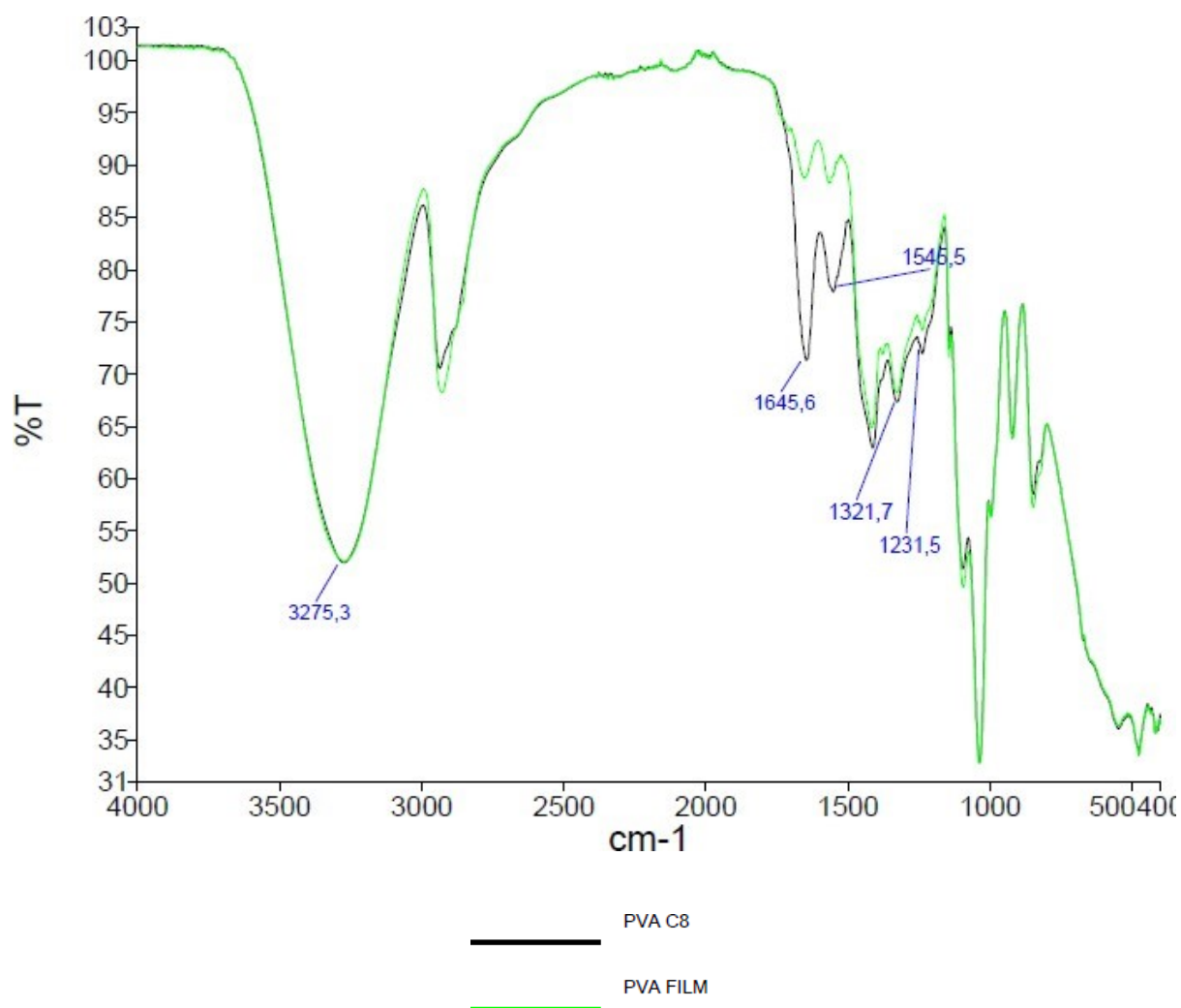


Figura 4.14: Confronto tra il campione C8 (150 mg di cheratina estratta con NaOH, PVA e glicerolo) e quello realizzato con solo PVA.

Ai biofilm realizzati sono state aggiunte diverse concentrazioni di estratto per conferire loro una proprietà antiossidante. I seguenti confronti sono stati fatti per osservare se la sostanza organica fosse visibile dallo spettroscopio IR e se al variare della concentrazione ci fossero delle differenze tra gli spettri. In primo luogo, è stato analizzato l'estratto, nello spettro (**Figura 4.15**) si possono osservare dei picchi che identificano la composizione aromatica e i gruppi funzionali dei polifenoli di cui la *Salvia libanotica* è ricca. In particolare la banda 3218 cm⁻¹ rappresenta la vibrazione stretching del gruppo OH presente nei composti fenolici, la banda 1395 cm⁻¹ potrebbe rappresentare il bending dei gruppi CH₃ e CH₂ dei flavonoidi e lo stiramento degli anelli aromatici, il picco 1265 cm⁻¹ rappresenta il bending del gruppo CO e CH presenti nei polioli e nell'idrossiflavonoidi, il picco presente a 1585 cm⁻¹ potrebbe rappresentare lo

stiramento dell'anello aromatico e infine la banda a 1040 cm^{-1} rappresenta la vibrazione dei gruppi OH tipici dei polifenoli.⁹⁸

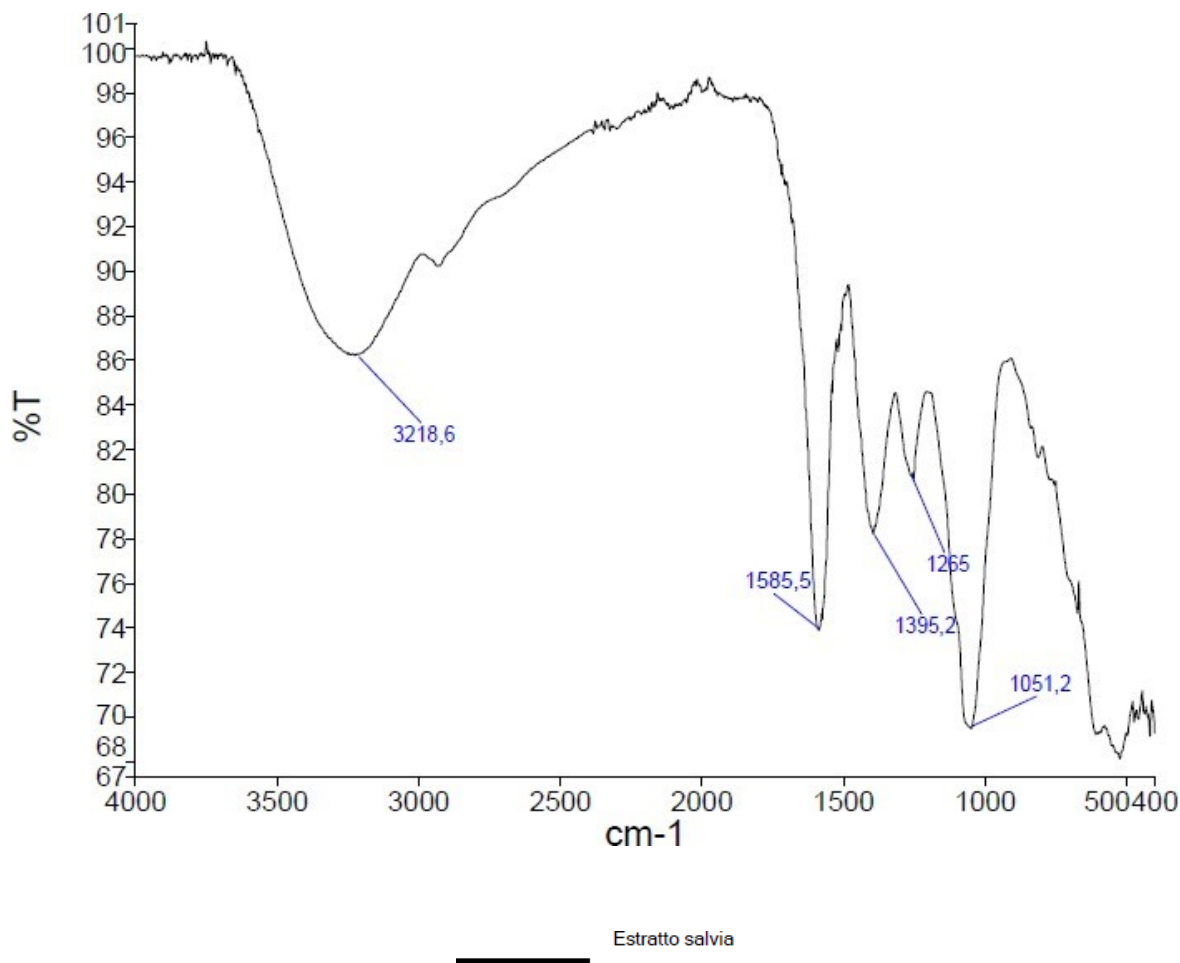


Figura 4.15: Spettro IR dell'estratto di *Salvia libanotica*.

Gli spettri dei campioni confrontati con quello dell'estratto sono C4, 4.1 e 4.2 che contengono una concentrazione di salvia pari a 0, 200 mg e 100 mg. Nella Figura 4.16 sono stati messi a confronto sono il campione C4 e 4.1 per denotare le differenze scaturite dalla presenza di estratto.

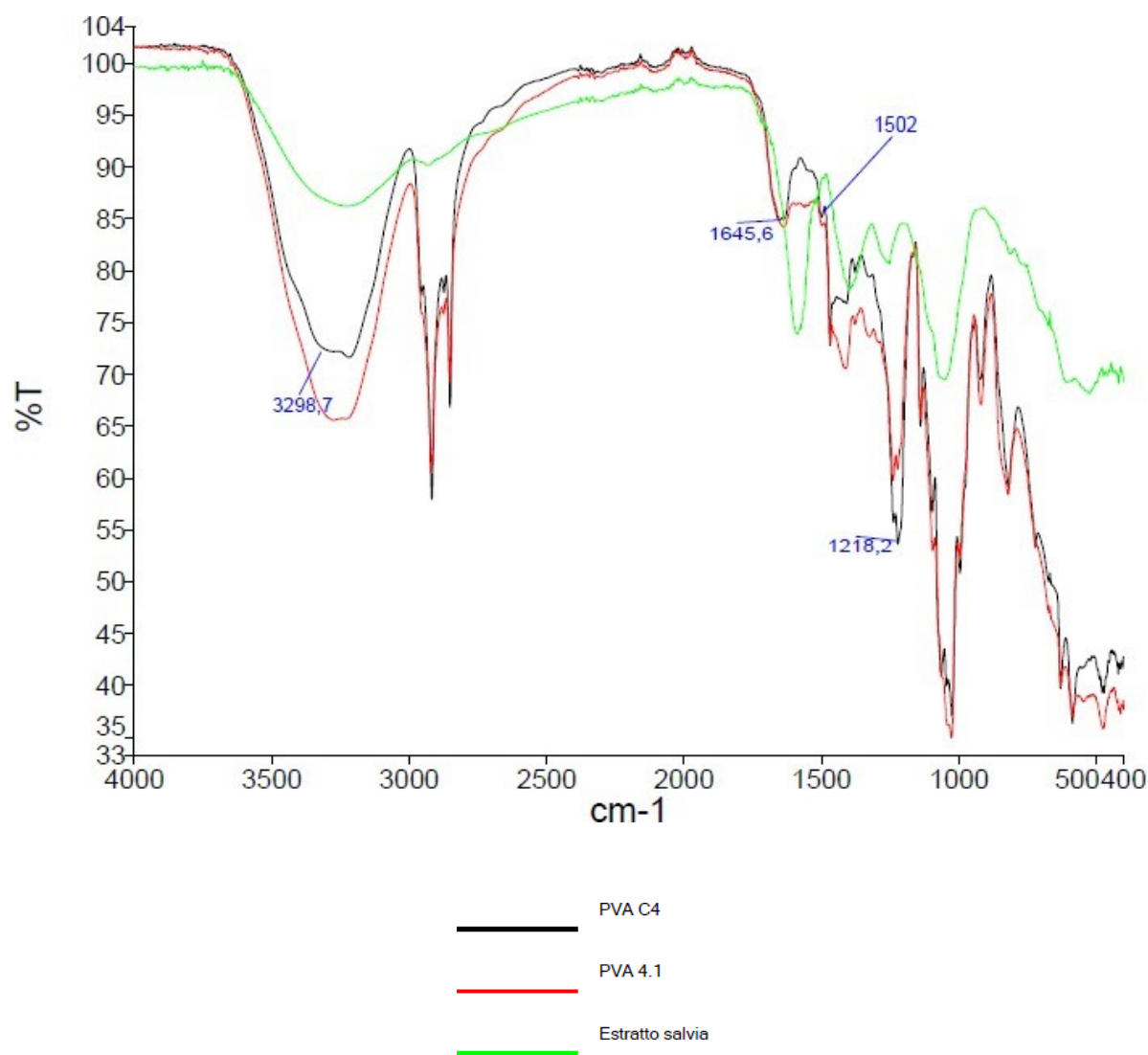


Figura 4.16: Confronto degli spettri IR di C4(600 mg di cheratina estratta con metabisolfito, PVA e glicerolo), 4.1(600 mg di cheratina estratta con metabisolfito, PVA, glicerolo e 200 mg di estratto di salvia) e l'estratto di salvia.

I campioni C4 e 4.1 hanno uno spettro molto simile anche se la presenza della salvia in 4.1 determina delle differenze seppur minime. Per esempio, nella banda 1600 cm^{-1} è possibile notare come la presenza della salvia determina un distacco tra gli spettri dei due biofilm ma non ci sono dei picchi evidenti che differenziano il campione con antiossidante rispetto a quello senza. Queste poche evidenze sono dovute alla poca concentrazione di estratto all'interno del film rispetto al PVA e alla cheratina.

Allo stesso modo sono stati confrontati gli spettri dei biofilm realizzati con cheratina estratta con soda (**Figura 4.17**).

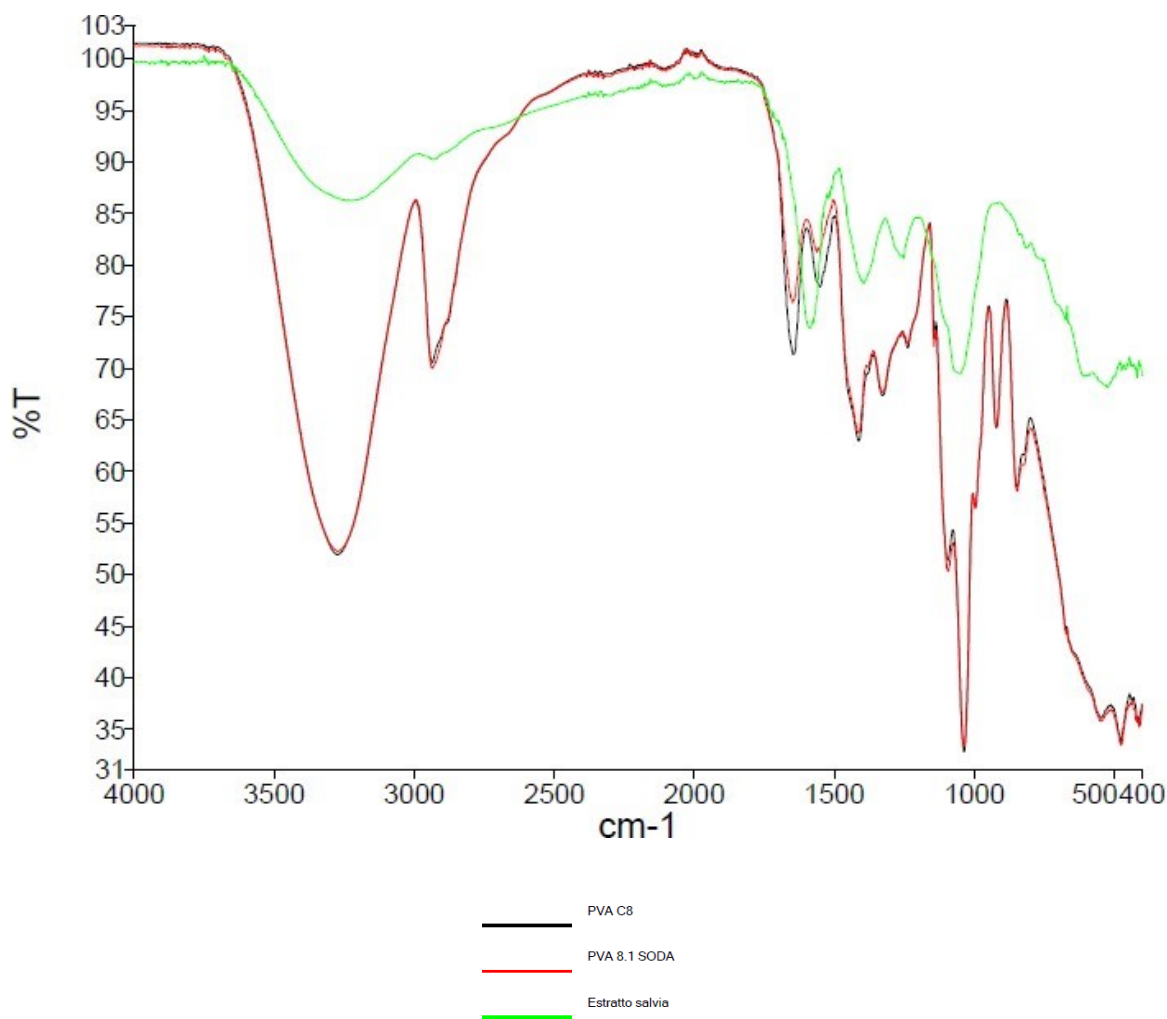


Figura 4.17: Confronto tra C8 (150 mg di cheratina estratta con NaOH, PVA e glicerolo), 8.1 (150 mg di cheratina estratta con NaOH, PVA, glicerolo e 50 mg di estratto di salvia) ed estratto di salvia.

Anche in questo caso la composizione dei biofilm di cheratina e PVA sovrasta i picchi relativi all'estratto di salvia, infatti gli spettri di C8 e 8.1 si sovrappongono seppur 8.1 abbia all'interno 50 mg di antiossidante. Tuttavia, lo spettro di 8.1 presenta una leggera differenza nella banda 1600 cm^{-1} , che rappresenta la vibrazione degli anelli aromatici delle sostanze fenoliche.

Quindi, attraverso gli spettri IR è stato possibile osservare le differenze tra cheratine estratte con metodi differenti. Inoltre, anche se la presenza del PVA ha coperto molto i picchi relativi alla proteina, in tutti i casi la sua presenza è stata visibile. La concentrazione dell'estratto essendo molto minore rispetto agli altri elementi che compongono i film è quasi impercettibile.

4.3.4 Analisi del grado igroscopico rispetto all'acqua

In questa misurazione sono stati analizzati campioni differenti che hanno dimostrato avere dei comportamenti diversi se messi a contatto con l'acqua (**Tab. 4.2**).

CAMPIONE	H ₂ O x1	H ₂ O x2	H ₂ O x3	H ₂ O x4	H ₂ O x5	H ₂ O x6
P 2	90 min	30 min	30 min	/	2 giorni	GEL
P 3	1 ora	/	45 min	/	2 giorni	GEL
P 4	30 min	2 ore	/	/	2 giorni	GEL
Controllo 4	30 min	30 min	30 min	45 min	2 giorni	GEL

Tabella 4.5: Tempo impiegato da ogni campione analizzato per assorbire il proprio peso in acqua e successive aggiunte.

In particolare, si è osservato che i campioni iniziali contenenti la gelatina (P2, P3 e P4 con relativo controllo) hanno assorbito facilmente l'acqua fino a raggiungere la saturazione. Tuttavia, dopo aver aggiunto 6 volte il peso del dischetto in acqua i campioni tendevano a disciogliersi, perdendo completamente la loro struttura solida miscelandosi con l'acqua e divenendo simile ad una crema (**Figura 4.18**).

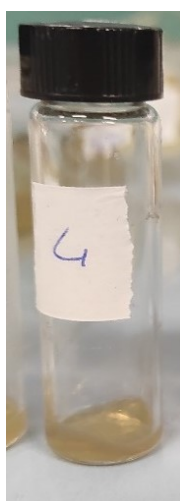


Figura 4.18: Campione composto di cheratina e gelatina a fine della misurazione dell'assorbimento d'acqua.

Mentre, i campioni realizzati con il PVA hanno la capacità di assorbire velocemente la quantità di acqua pari al loro peso, allo stesso tempo hanno una buona resistenza e mantengono la loro struttura iniziale (**Figura 4.19**). Inoltre, raggiungono la saturazione dopo aver assorbito acqua pari al loro peso quindi, i volumi aggiunti in seguito rimangono fuori dal materiale (**Tabella4.3**)



Figura 4.19: Esempio della differenza tra i dischetti primadell'analisi del grado igroscopico rispetto all'acqua e dopo 48 ore immerse in un volume di sei volte superiore al peso dei dischetti.

CAMPIONE	H ₂ O x1	H ₂ O x2	H ₂ O x3	H ₂ O x4	H ₂ O x5	H ₂ O x6
PVA C4	30 min	/	/	/	/	/
PVA C5	30 min	/	/	/	/	/
PVA C6	30 min	/	/	/	/	/
PVA C7	30 min	/	/	/	/	/
PVA C8	30 min	/	/	/	/	/
PVA NoC 4	30min	/	/	/	/	/

Tabella4.3: Tempo impiegato da ogni campione analizzato per assorbire il proprio peso in acqua e successive aggiunte

Infatti, dalla **Tabella 4.3** è possibile notare che dopo l'assorbimento del primo volume d'acqua anche dopo 2 giorni, i volumi successivamente aggiunti non vengono assorbiti e rimangono esterno alle pellicole (**Figura 4.20**)

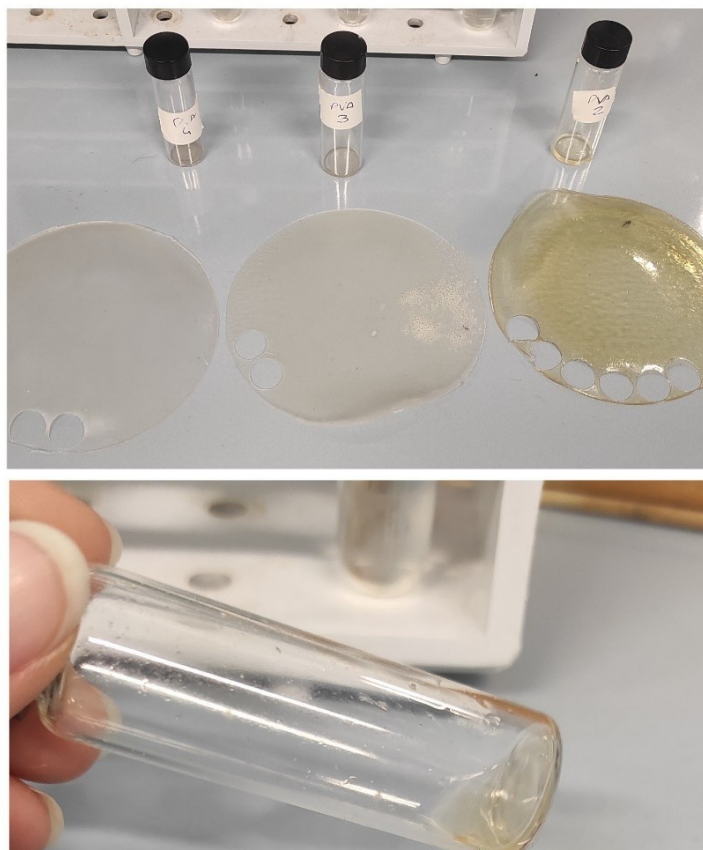


Figura 4.20: Immagini relative alla misurazione dell'analisi del grado igroscopico rispetto all'acqua d'acqua da parte di alcuni biofilm con PVA.

I campioni analizzati, composti da PVA sono stati pesati prima dell'analisi e ripesati dopo le 48 ore di incubazione nel volume finale di acqua. Le differenze di peso riportate in **Tabella4.4** confermano la capacità dei biofilms realizzati con PVA di assorbire piccole quantità d'acqua fino a raggiungimento della saturazione che presenta un valore assoluto simile per tutti i campioni analizzati.

CAMPIONE	Peso iniziale (g)	Peso finale (g)	Differenza (g)	Acqua assorbita
PVA 4	0,0633	0,1485	0,0852	57%
PVA 4.1	0,0349	0,124	0,0891	72%
PVA 4.2	0,0397	0,115	0,0753	66%
PVA 5	0,0343	0,1217	0,0874	72%
PVA 7	0,0397	0,1195	0,0798	67%
PVA 8	0,0381	0,1246	0,0865	69%
PVA NoC 4	0,0205	0,1081	0,0876	81%

Tabella4.4: Differenze di peso dei campioni analizzati prima e dopo la misurazione della loro capacità di assorbimento d'acqua.

4.3.5 Risultati della solubilità dei biofilm in acqua

La **Tabella4.5** riporta i dati relativi alla misurazione della solubilità dei biofilm, tale parametro è fondamentale per verificare la biodegradabilità di un materiale, e quindi la sua capacità di degradarsi in natura in pochi mesi.

CAMPIONE	PESO INIZIALE (g)	PESO FINALE (g)	DIFFERENZA	SOLUBILITA' %
PVA C4	0,0528	0,0333	0,0195	38%
PVA 4.1	0,0397	0,0272	0,0125	32%
PVA 4.2	0,0353	0,0173	0,018	51%
PVA NoC 4	0,0174	0,0107	0,0067	38%
PVA C5	0,1157	0,0713	0,0444	38%
PVA C7	0,0304	0,0185	0,0132	44%
PVA C8	0,0329	0,0185	0,0144	44%
PVA 8.1	0,0281	0,0145	0,0136	50%

Tabella4.5: Dati relativi alla misurazione della solubilità dei campioni.

I campioni che hanno una percentuale uguale o superiore a 50% sono quelli che contengono l'estratto di salvia. È noto, infatti, che la presenza degli estratti vegetali incrementino la solubilità dei materiali.⁹⁹ La concentrazione di cheratina all'interno dei film non apporta, invece, delle modificazioni significative sulla loro capacità di solubilizzarsi, anche se la percentuale sembra crescere di qualche punto nel campione C7, che contiene un terzo e metà della cheratina rispettivamente di C4 e C5. Non c'è alcuna differenza di solubilità tra le cheratine estratte con due metodi differenti (C7 e C8).

La solubilità dei campioni è abbastanza alta, tenendo conto che la cheratina è una proteina poco solubile in acqua. I buoni risultati confermano che questi biofilm possono essere utilizzati per la produzione di packaging in grado di compostarsi in natura.

4.3.6. Rilascio di antiossidanti da parte dei biofilm

Il biofilm per essere chiamato attivo deve esercitare un effetto positivo sull'alimento rilasciando la sostanza attiva sulla superficie del prodotto oppure all'interfaccia tra pellicola e superficie dell'alimento rimanendo legata al materiale di packaging (come nel nostro caso come antiossidante). Per questa ragione è stata analizzata la possibilità che l'antiossidante aggiunto alla matrice del biofilm fosse rilasciato o meno dalle bioplastiche. La valutazione è stata fatta utilizzando l'analisi ABTS sulle soluzioni messe a contatto con il biofilm. Da ricordare che l'estratto utilizzato nel nostro lavoro derivando da salvia, contiene composti non tossici per l'uomo e può essere utilizzato per varie applicazioni culinarie e in medicina tradizionale. La **figura 4.21** raffigura l'andamento di rilascio di sostanze antiossidanti nel tempo da parte dei campioni analizzati.

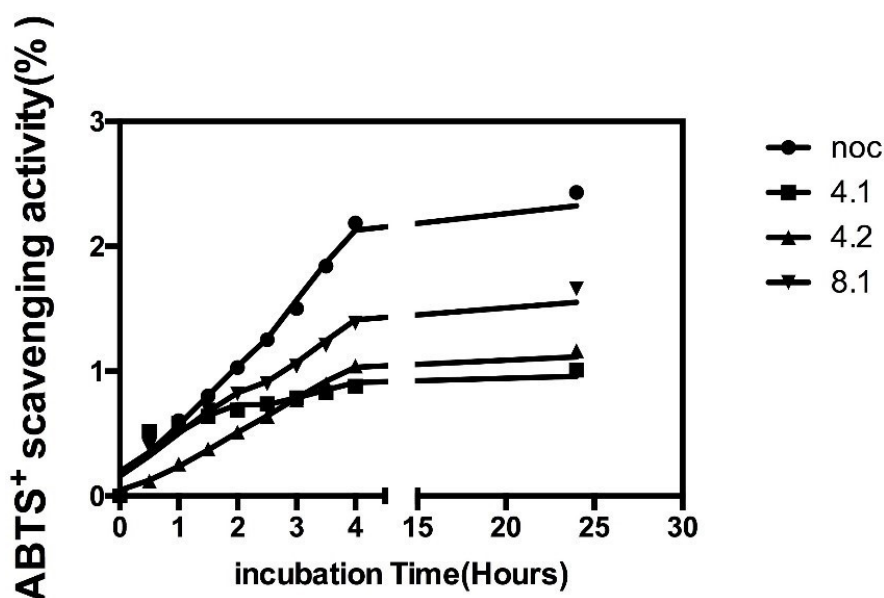


Figura 4.21: Rilascio di antiossidanti nel tempo da parte dei campioni analizzati.

I campioni contengono diverse concentrazioni di estratto di salvia e di cheratina. In figura 4.21 si nota come il campione NoC realizzato senza cheratina, ma con solo PVA e aggiunta di 100 mg di estratto salvia libanotica, rilasci una quantità maggiore di antiossidante nel tempo rispetto agli altri campioni e raggiunga un plateau in circa 4/5 ore. Nei campioni contenenti cheratina, sia estratta con NaOH che con metabisolfito si nota un rilascio minore dell'estratto che risulta essere circa il 50% della quantità di estratto in essi contenuta, nello stesso periodo di incubazione del gel formato con solo PVA. Appare evidente che la cheratina abbia la capacità

di formare delle interazioni con l'estratto formando un film omogeneo ma allo stesso tempo in grado di rilasciare quantità minori di sostanze solubili in acqua, conservando parte dell'estratto all'interno e consentendone un rilascio più lungo fino, anche in questo caso, del raggiungimento di un plateau pari a quello mostrato dal gel di solo PVA ma in tempi più lunghi e con uno scambio di liquido maggiore. I campioni 4.2 e 4.1 contengono la stessa concentrazione e tipologia di cheratina, estratta con metabisolfito, ma il primo campione contiene 200 mg di estratto e il secondo 100 mg. Nel grafico si osserva come questi due biofilm abbiano un rilascio simile seppur il campione 4.2 contenendo più estratto ne libera una concentrazione leggermente maggiore. È interessante notare, invece, come il campione 8.1, contenente solamente 50 mg di estratto di salvia, rilasci una concentrazione di antiossidanti con una velocità maggiore rispetto ai campioni 4.2 e 4.1 che ne contengono rispettivamente il doppio e il triplo. Questo potrebbe significare che l'interazione tra l'estratto di salvia e la cheratina estratta con soda siano più deboli rispetto a quelli che si formano con la cheratina estratta con metabisolfito. L'attività del materiale a cui viene addizionato un particolare principio attivo potrebbe dipendere anche dalle caratteristiche della cheratina utilizzata che ne determina anche la sua più o meno immediata disponibilità. I risultati sono in accordo con l'ipotesi che le proprietà della cheratina dipenda molto dal modo con cui viene preparata.

4.3.7 Resistenza alla trazione (Tensile-Test)

I dati ottenuti dall'analisi per la valutazione della resistenza alla trazione hanno evidenziato la capacità di tutti i biofilms analizzati di sopportare la forza applicata senza raggiungere il punto di rompimento. Infatti, il grafico riportato in **Figura 4.22** che mette in relazione la forza applicata espressa in Newton e la deformazione o spostamento dei campioni espresso in millimetri, dimostra come tutti i biofilm non raggiungono il punto di rottura. I dati ottenuti, seppur non sia stata calcolata ancora l'elasticità di ogni campione, confermano la forte resistenza alla trazione del materiale dovuta soprattutto alla presenza del PVA.

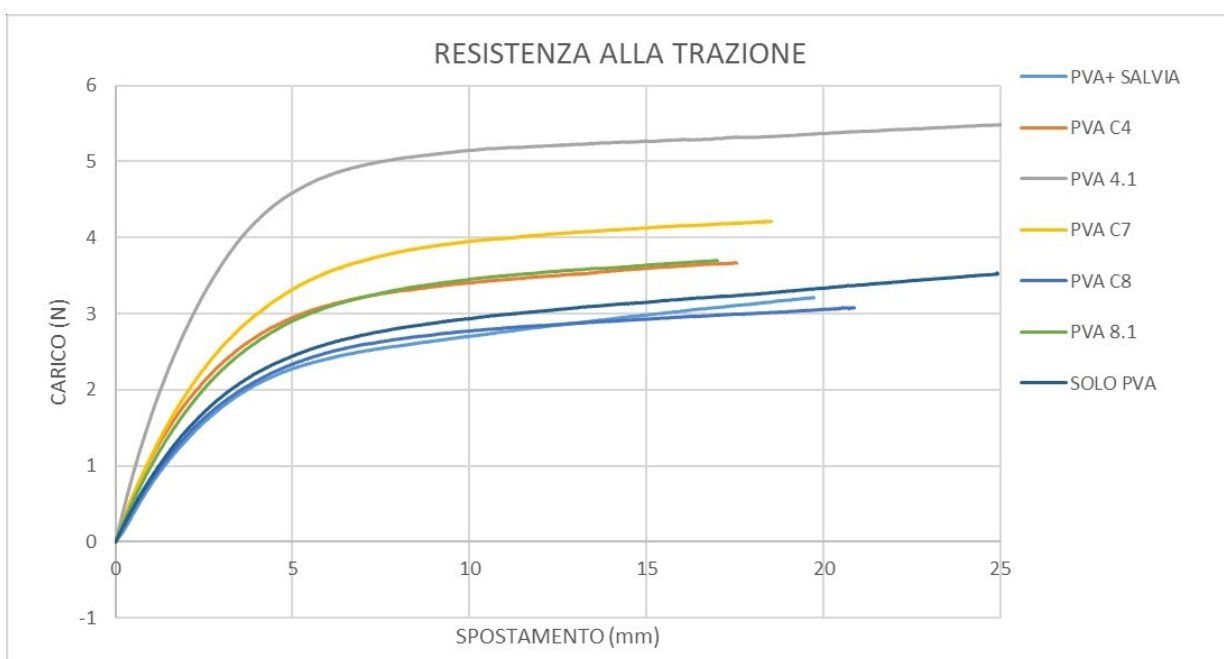


Figura 4.22: Relazione tra la deformazione (o spostamento) dei campioni e la forza a cui sono stati sottoposti durante il Tensile-test per la valutazione della loro resistenza alla trazione.

4.4 Risultati dell'attività di inibizione microbica dei biofilm

4.4.1 Crescita di *S. aureus* e *K. pneumoniae* su gelatina e cheratina di piume

I primi biofilm polimerici realizzati contengono gelatina e cheratina, per questo motivo la prima valutazione è stata verificare se le due sostanze fossero degradate da attività di proteolisi da parte di enzimi prodotti dai batteri stessi. Questa attività è evidenziabile con la formazione di aloni di proteolisi attorno alle colonie batteriche. Come è possibile osservare nella **Figura 4.22**, la gelatina non viene degradata nelle condizioni di saggio applicate, non evidenziandosi alcun alone attorno alle colonie batteriche, mentre il terreno contenente la cheratina mostra una inibizione completa della crescita microbica, segno evidente di un'attività antimicrobica diretta della proteina.

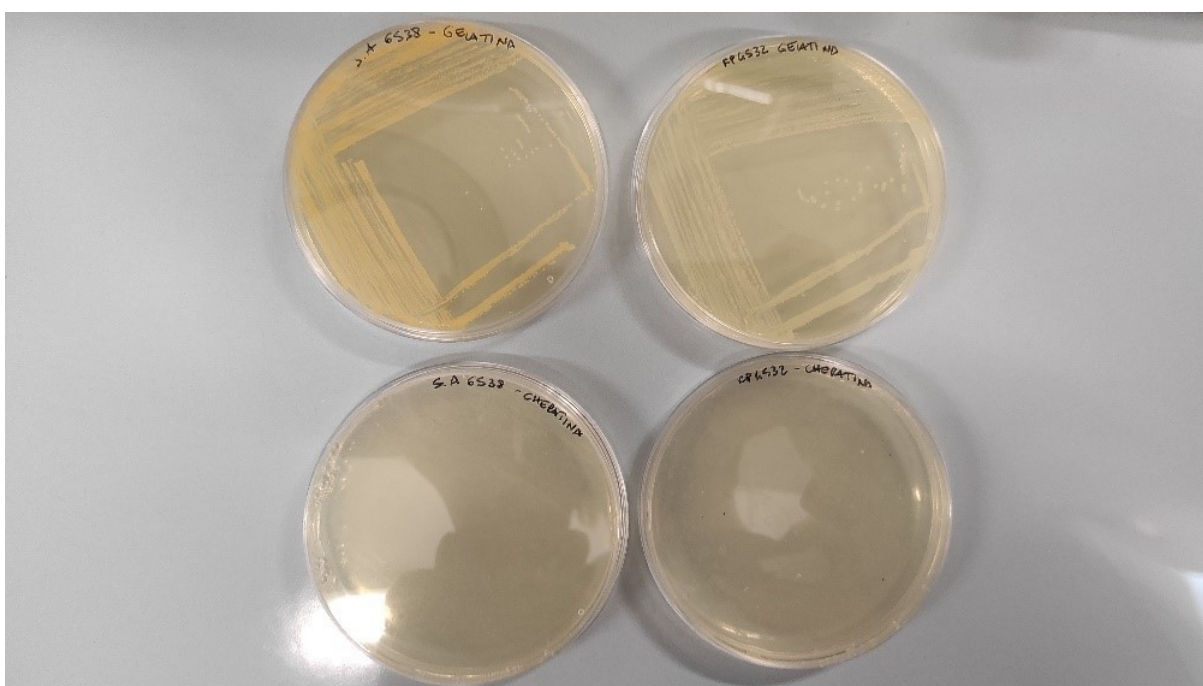


Figura 4.23: Piastre agarizzate di *S. aureus* e *K. pneumoniae* contenenti 4% p/v di gelatina (in alto) e cheratina di piume (in basso).

La cheratina di piume possiede una qualche attività antimicrobica come alcuni studi recenti riportano.¹⁰⁰ Tuttavia, per valutare se la capacità di inibizione della crescita microbica della cheratina in soluzione fosse mantenuta nei biofilm polimerici e se il metodo di estrazione della cheratina influisca su tale attività, sono state effettuate ulteriori analisi.

La soluzione di cheratina è stata inserita all'interno di un pozzetto nell'agar inoculato con i ceppi batterici. La **Tabella 4.6** riporta le medie degli aloni formatisi attorno ai pozzetti. È interessante notare come l'unica preparazione di proteina ad avere attività antimicrobica è la cheratina estratta con metabisolfito. Il campione di PVA è stato analizzato per controllo.

	CEPPO	INOCULO	ALONE
Cheratina metabisolfito	<i>S. aureus</i>	Inclusione	22 (+/-5,37)
	<i>K. pneumoniae</i>	Inclusione	23,5 (+/-12,51)
	<i>S. aureus</i>	Striscio	25 (+/- 2)
	<i>K. pneumoniae</i>	Striscio	28,5 (+/- 1)
	<i>S. aureus</i>	Striscio	36 (+/- 8)
	<i>K. pneumoniae</i>	Striscio	19 (+/- 2)
Cheratina soda	<i>S. aureus</i>	Inclusione	nessun alone
	<i>K. pneumoniae</i>	Inclusione	nessun alone
	<i>S. aureus</i>	Striscio	nessun alone
	<i>K. pneumoniae</i>	Striscio	nessun alone
	<i>S. aureus</i>	Striscio	nessun alone
	<i>K. pneumoniae</i>	Striscio	nessun alone
Cheratina met+ soda	<i>S. aureus</i>	Inclusione	nessun alone
	<i>K. pneumoniae</i>	Inclusione	nessun alone
	<i>S. aureus</i>	Striscio	nessun alone
	<i>K. pneumoniae</i>	Striscio	nessun alone
PVA	<i>S. aureus</i>	Inclusione	nessun alone
	<i>K. pneumoniae</i>	Inclusione	nessun alone
	<i>S. aureus</i>	Striscio	nessun alone
	<i>K. pneumoniae</i>	Striscio	nessun alone

Tabella4.6: Risultati aloni generati dalle soluzioni di cheratina e PVA.

In qualunque condizione la cheratina estratta con metabisolfito ha generato un alone di 20-30 mm, inibendo la crescita microbica sia di *S. aureus* che di *K. pneumoniae*, mentre, la cheratina estratta con la soda e quella estratta prima con soda e poi con metabisolfito non presentano attività antimicrobica (**Figura 4.24**). Si può ipotizzare pensa che tale comportamento sia dovuto alle caratteristiche (peso molecolare estato di aggregazione) dei peptidi liberati durante il processo di digestione da parte del metabisolfito.

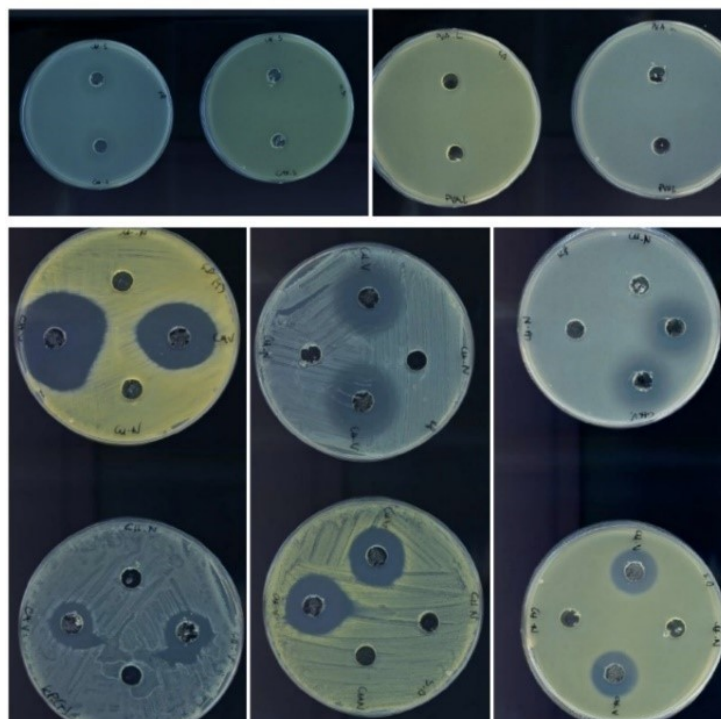


Figura 4.24: Piastre in cui è stata valutata l'attività antimicrobica di: cheratina estratta prima con soda e poi metabisolfito (in alto a sinistra), PVA (in alto a destra), cheratina soda e cheratina metabisolfito in basso (a sinistra e in centro) con agar inoculato con striscio (*S. aureus* e *K. pneumoniae*) e cheratina soda e metabisolfito con agar inoculato per inclusione di *S. aureus* e *K. Pneumoniae*.

Ad oggi sono in progresso degli studi per mappare le varie preparazioni in base ai pesi molecolari e quindi alle frazioni di cheratina presenti dopo i processi di digestione. Successivamente è stata valutata la capacità dei biofilm polimerici di inibire le due specie batteriche. Come atteso, alla luce dei risultati ottenuti con la cheratina in soluzione, anche in questo caso le pellicole che hanno formato un alone di inibizione sono quelle realizzate con la proteina estratta con metabisolfito. (**Tabella 4.7**)

	mg cheratina	CEPPO	TERRENO	INOCULO	ALONE (mm)
FILM Cheratina Soda	150	<i>S. aureus</i>	NB	Inclusione	nessun alone
FILM Cheratina Metabisolfito	150	<i>S. aureus</i>	NB	Inclusione	21
FILM Cheratina Metabisolfito	150	<i>K. pneumoniae</i>	NB	Inclusione	20,5
FILM Cheratina Metabisolfito	600	<i>S. aureus</i>	NB	Inclusione	22
FILM Cheratina Metabisolfito	600	<i>K. pneumoniae</i>	NB	Inclusione	21
FILM PVA		<i>S. aureus</i>	NB	Inclusione	nessun alone
FILM PVA + salvia		<i>S. aureus</i>	NB	Inclusione	nessun alone
FILM PVA		<i>K. pneumoniae</i>	NB	Inclusione	nessun alone
FILM PVA + salvia		<i>K. pneumoniae</i>	NB	Inclusione	nessun alone

Tabella4.7: Aloni di inibizione microbica originati dai biofilm.

Infatti, i film realizzati con cheratina estratta con metabisolfito anche in questo caso hanno evidenziato un'attività antimicrobica sia contro *S. aureus* che *K. pneumoniae*, mentre la cheratina estratta con soda non ha prodotto a formazione di alcun alone di inibizione (**Fig. 4.24**). Inoltre, per entrambi i ceppi la presenza della salvia in un film inerte formato solo da PVA non ha determinato alcuna inibizione. La presenza dell'estratto, quindi, potrebbe fungere solamente da agente antiossidante favorendo l'allungamento della shelf-life ma non incrementa l'attività antibatterica alla proteina.

La concentrazione della cheratina all'interno dei biofilm polimerici non correla con un aumento dell'attività antimicrobica. È interessante però notare come sia i biofilm polimerici che la cheratina abbiano una capacità superiore di inibire lo stafilococco (Gram+) rispetto alla *K. pneumoniae* (Gram-). Probabilmente la differente inibizione dipende dalla conformazione della parete cellulare e che, quindi, quella dei Gram-positivi sia più suscettibile ai peptidi di cheratina rispetto a quella dei Gram-negativi.

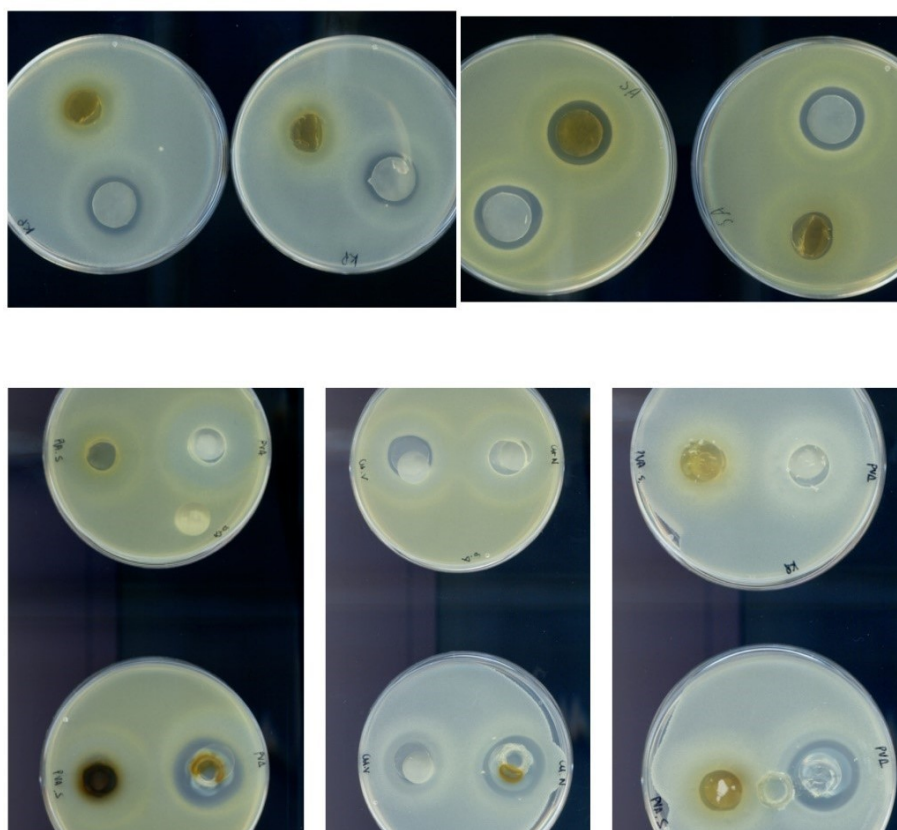


Figura 4.25: Aloni di inibizione da parte di: C4 e 4.1 su *K. pneumoniae* (in alto a sinistra), C4 e 4.1 su *S. aureus* (in alto a destra), film di PVA e PVA+salvia su *S. aureus* (in basso a sinistra), C7 e C8 su *S. aureus* e *K. pneumoniae* (in basso al centro) e PVA e PVA+salvia su *K. pneumoniae* (in basso a destra).

Si può ipotizzare che l'idrolisi basica della cheratina con metabisolfito abbia modificato le cisteine in modo da non vederle più impegnate in ponti disolfuro, lasciando così i peptidi in forma lineare non "cross-linked", i quali sono più efficienti nel disturbare l'equilibrio delle membrane cellulari batteriche. Di contro, l'idrolisi della cheratina con soda manterrebbe inalterata la possibilità di formare ponti disolfuro e, quindi, strutture tali da non preservare la capacità di attaccare la membrana cellulare batterica.

6. CONCLUSIONI

L'obiettivo di questo studio è stato quello di avviare la messa a punto di metodiche innovative per lo sviluppo futuro di materiali per il packaging alimentare utilizzando cheratina da piume di avicoli.

La cheratina estratta da scarti della produzione di carne avicola è risultata una proteina interessante anche se difficile da trattare in quanto piuttosto eterogenea soprattutto in base ai metodi di estrazioni adottati. Infatti, nella realizzazione dei biofilms è stata riscontrata una forte differenza tra la cheratina di piume estratta con metabisolfito e quella estratta con NaOH.

In primo luogo, la cheratina più solubile in acqua e che genera un biofilm omogeneo e trasparente è quella estratta con NaOH, tuttavia non possiede attività antimicrobica contro i ceppi utilizzati in questo studio.

Si suppone che la soda durante la digestione sia in grado di generare dei peptidi con un peso molecolare molto più piccolo rispetto a quelli generati dal metabisolfito e che, per questa ragione, sia molto più solubile in acqua¹⁰².

Inoltre, è possibile pensare che i peptidi generati dalla soda siano processati in modo tale che i gruppi -SH della cisteina siano ancora coinvolti nei ponti disolfuro e quindi non più disponibili per un'interazione con i batteri. La soluzione di cheratina digerita con metabisolfito, invece, dovrebbe risultare molto più ricca di catene singole o con minor ramificazione proprio a causa dell'inferiore presenza di interazione tra i gruppi -SH

Il nostro lavoro ha infatti appurato, che la cheratina estratta con metabisolfito ha una capacità antibatterica al contrario della mancata attività riscontrata per la cheratina estratta con NaOH. Come riportato, la presenza dei gruppo -SO₃ attivi presenti sulla cheratina sono in grado, probabilmente, di interagire con la parete cellulare dei patogeni condizionando la loro crescita. Attualmente il meccanismo di reazione è oggetto di approfondito studio.

Diversi studi hanno suggerito la capacità della cheratina di piume di inibire *S. aureus* in base al suo peso molecolare, il nostro lavoro ha anche verificato che oltre allo stafilococco (GRAM-positivo) la proteina riesce a disequilibrare anche la membrana dei GRAM-negativi, in particolare la *K. pneumoniae*. È necessario, però, confermare che questa proprietà sia generalizzata e non ceppo specifica per questo motivo si suggerisce di ampliare la ricerca, verificando che questa proteina sia in grado di inibire la crescita di altri patogeni alimentari.

Per rendere attivo il film, come esempio di realizzazione di “packaging attivo”, alle pellicole ottenute con cheratina sono state aggiunte diverse concentrazioni di estratto di salvia per conferirgli, attraverso l’azione delle sostanze fenoliche, la capacità di rallentare l’ossidazione dell’alimento e allungarne così la shelf-life. La maggior parte di packaging contenenti oli essenziali inseriti all’interno di pellicole attive hanno la proprietà di esercitare la loro azione attraverso il rilascio di componenti attivi non nocivi se messi a contatto con l’alimento. A questo scopo abbiamo analizzato il rilascio di componenti dell’estratto dalle varie pellicole realizzate in funzione del tempo di contatto.

I risultati del rilascio di antiossidante nel tempo da parte dei campioni testati sono molto interessanti, infatti, è stato riscontrato che la cheratina interagisce con l’estratto formando dei legami che ne permettono comunque il rilascio più lento e graduale rispetto ad un biofilm senza la proteina.

Inoltre, anche in questo caso la differente estrazione della cheratina ha provocato dei comportamenti diversi: dai risultati ottenuti (**Figura 4.21**) si può dedurre che la velocità di rilascio dell’antiossidante del biofilm realizzato con cheratina estratta con NaOH sia maggiore rispetto quello liberato dal biofilm di cheratina con metabisolfito, pur contenendone una concentrazione all’interno minore. Questo potrebbe essere dovuto fatto che l’interazione tra l’antiossidante e cheratina estratta con NaOH pare più debole rispetto a quella tra la salvia e la cheratina estratta con metabisolfito.

In questo studio, quindi, risulta che la presenza e il tipo di cheratina utilizzata rallenti, in maniera selettiva, il rilascio della sostanza antiossidante, dovuto alle interazioni che si formano durante la produzione del biofilm.

Si può confermare, inoltre, che il materiale realizzato in questo lavoro sia un materiale ulteriormente attivo, perché oltre ad esercitare un’attività antiossidante dovuta all’azione dei componenti dell’estratto di *S. libanotica* sia in grado anche di inibire la crescita microbica attraverso l’azione della cheratina.

Come detto inizialmente l’obiettivo non era solo di creare un materiale attivo, ma anche di creare un packaging che potesse sostituire la plastica e che fosse ecosostenibile e non inquinasse l’ambiente.

Allo scopo di ottenere un imballaggio alternativo alla plastica è stato aggiunto il PVA, come sostituto all’iniziale utilizzo della gelatina bovina troppo suscettibile alle variazioni di temperatura, umidità relativa e fonte di crescita microbica. Il polimero a base di PVA ha permesso ai biofilm di sopportare la variazione della temperatura senza provocare una

variazione della struttura fisica dei film e di avere delle caratteristiche molto più plastiche. Si tratta di un polimero biodegradabile parzialmente solubile in acqua che mantiene gran parte delle sue caratteristiche e già utilizzato nell'industria alimentare, grazie anche alla sua capacità di fungere da barriera a sostanze grasse.

I risultati riportati in questo lavoro hanno confermato che l'aggiunta di cheratina e di estratto non provocano variazioni nella stabilità del materiale. Inoltre, i films di PVA ottenuti hanno un'ottima resistenza all'acqua, ne assorbono in quantità pari al loro peso senza deformarsi, saturandosi ed evitando che ulteriore liquido trapassi il materiale. Questi parametri sono fondamentali per la produzione di un packaging biodegradabile, ma che funga anche da barriera all'acqua.

Ritornando ai campioni iniziali contenenti gelatina bovina come sostituto del PVA, i risultati ottenuti riguardo l'alto grado di igroscopicità nei confronti dell'acqua si dimostrano interessanti per un'ulteriore applicazione del biofilm realizzato. Sciogliendosi completamente in un piccolo volume d'acqua formano una "crema" che rilascia contemporaneamente cheratina, la quale come sappiamo è un antimicrobico non tossico per l'uomo, e l'estratto. Si potrebbe pensare di utilizzare questi biofilms sostituendo l'antiossidante con un farmaco e quindi ipotizzare un'applicazione farmaceutica, per esempio, alla produzione di un cerotto che sia in grado di proteggere la ferita dai batteri e che rilasci il farmaco con una velocità che varia man mano che il gel ingloba il siero prodotto dal processo di rigenerazione della ferita, processo che viene accelerato dalla presenza e ulteriore rilascio di cheratina. La cicatrizzazione della ferita può durare per un periodo di tempo abbastanza lungo da assicurare una continua disseminazione del farmaco, l'accelerazione della crescita delle cellule epiteliali e una continua attività antibatterica garantita dalla presenza della cheratina

Per realizzare una valida alternativa alla plastica la gelatina è stata sostituita con il PVA che è molto resistente e per questo motivo può essere soggetto ad estrusione. I risultati relativi alla resistenza dei biofilms alla trazione sono interessanti; infatti, tutti i campioni a cui è stata applicata la forza di trazione secondo le linee guida della norma UNI ISO 527, hanno subito una deformazione senza mai arrivare al punto di rottura. Questa resistenza è fondamentale perché garantisce la capacità di resistere ad un'eventuale estrusione industriale.

Anche se il materiale in questione non è stato ancora testato (per motivi di tempo) per valutare l'effettivo incremento della shelf-life di prodotto, le proprietà antibatteriche e antiossidanti

valutate nelle analisi di questo studio e quanto visto dalle analisi chimico-fisiche suggeriscono diverse applicazioni.

Il biofilm potrebbe essere utilizzato, per esempio, per la produzione di un packaging contenente prodotti vegetali e frutticoli, la sua capacità antiossidante; infatti, rallenterebbe la senescenza dei prodotti freschi e di quarta gamma, allungandone la shelf-life e quindi l'accettabilità da parte del consumatore. Inoltre, poiché questo tipo di prodotti viene consumato principalmente fresco senza alcun trattamento termico che vada ad abbattere una possibile contaminazione microbica, i film realizzati con cheratina estratta con metabisolfito potrebbero non solo allungare la vita nello scaffale del prodotto vegetale, ma anche evitare la proliferazione di questi batteri in caso di contaminazione, in particolar modo lo *S. aureus* da noi testato.

Un altro utilizzo di questo materiale potrebbe essere nella produzione di pellicole per il rivestimento di prodotti carni crudi che spesso si trovano negli scaffali. Questo perché durante la conservazione la carne rossa potrebbe essere soggetta ad ossidazione che provocherebbe un cambiamento sulla colorazione e di conseguenza allontanerebbe il consumatore dall'acquisto, un packaging ecosostenibile con attività antiossidante aiuterebbe a prevenire questo danneggiamento.

Inoltre, le analisi di questo studio hanno dimostrato la capacità del biofilm di assorbire piccole quantità di acqua o liquido, proprietà interessante per un packaging in quanto potrebbe trattenere i liquidi che fuoriescono dalla carne durante la sua conservazione e migliorare l'accettabilità del prodotto.

Questo studio pone le basi per ulteriori ricerche, infatti estendendo le analisi microbiche a più patogeni alimentari potrebbero essere realizzati packaging utili per aumentare la sicurezza alimentare di una gamma maggiore di prodotti.

Basti pensare che una pellicola antiossidante e antibatterica potrebbe essere utilizzata anche nelle case dei consumatori sostituendo le pellicole plastiche tipicamente usate per coprire gli alimenti.

Le proprietà del materiale potrebbero limitare l'insorgenza di crescita microbica dovuta alla contaminazione e alla manipolazione che avviene spesso nelle cucine dei consumatori.

I risultati ottenuti da questo lavoro hanno dimostrato come sia possibile dare una nuova vita ad uno scarto dell'industria avicola, generalmente incenerito, utilizzandolo per la creazione di biofilms attivi.

La presenza della cheratina di piume, infatti risulta aggiungere delle caratteristiche fisiche e antibatteriche che potrebbero essere utili per allungare la shelf-life ed aumentare la sicurezza igienico-sanitaria dell'alimento confezionato con questo materiale innovativo. Questo biofilm

è un esempio di economia circolare, infatti da uno scarto solitamente inutilizzato è stato prodotto un materiale applicabile, funzionale ed ecologico, che in un futuro, attraverso la ricerca potrebbe essere un valido sostituto di molti packaging plastici.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Il packaging come strumento per la valorizzazione dei prodotti alimentari: Luigi Di Paolo; 2019/2020 - <https://webthesis.biblio.polito.it/13577/1/tesi.pdf>
2. Risch S. J. (2009). Food packaging history and innovations. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(18), 8089–8092. <https://doi.org/10.1021/jf900040r>
3. Verma, M. K., Shakya, S., Kumar, P., Madhavi, J., Murugaiyan, J., & Rao, M. (2021). Trends in packaging material for food products: historical background, current scenario, and future prospects. *Journal of food science and technology*, 58(11), 4069–4082. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-04964-2> - <https://canal-mag.com/chi-ha-inventato-il-cibo-in-scatola/>).
4. Istituto Italiano Imballaggio, Il packaging allunga la vita. Il ruolo degli imballaggi nella minimizzazione degli sprechi alimentari e delle perdite di alimenti, ottobre 2016 – Ministero dello Sviluppo Economico – 2016.
5. REGOLAMENTO (CE) N. 1935/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 27 ottobre 2004 riguardante i materiali e gli oggetti destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari e che abroga le direttive 80/590/CEE e 89/109/CEE.
6. DECRETO LEGISLATIVO 3 aprile 2006, n. 152 – “Norme in materia ambientale” (ex. D.Lgs. 22/97) – Art. 218
7. DECRETO LEGISLATIVO 5 FEBBRAIO 1997, n. 22 "Attuazione delle direttive 91/156/CEE sui rifiuti, 91/689/CEE sui rifiuti pericolosi e 94/62/CE sugli imballaggi e sui rifiuti di imballaggio" pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* n. 38 del 15 febbraio 1997 - Supplemento Ordinario n. 33 - Art. 35, lett. b, D. Lgs. n. 22/97.
8. Rhodes C. J. (2018). Plastic pollution and potential solutions. *Science progress*, 101(3), 207–260 - <https://doi.org/10.3184/003685018X15294876706211>.

9. Shin, Joongmin; Selke, Susan EM. (2014) 11-food packaging. *Food processing: principles and applications, 2nd edn. Wiley, Hoboken, 249-273.*
10. L. Piergiovanni, S. Limbo, (2010) Food packaging. Materiali, tecnologie e qualità degli alimenti, Springer-Verlag Italia,).
11. Bandara, B. E. S., et al. (2016) Impact of food labeling information on consumer purchasing decision: with special reference to faculty of Agricultural Sciences. *Procedia Food Science*, , 6: 309-313.
12. Gracia, Azucena; De-Magistris, Tiziana. (2016) Consumer preferences for food labeling: what ranks first?. *Food control*, , 61: 39-46.
13. REGOLAMENTO (CE) N. 2023/2006 DELLA COMMISSIONE del 22 dicembre 2006 sulle buone pratiche di fabbricazione dei materiali e degli oggetti destinati a venire a contatto con prodotti alimentari.
14. Battisti, Rodrigo, et al. (2017) Gelatin-coated paper with antimicrobial and antioxidant effect for beef packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 11: 115-124.)
15. Packaging Strategies-Active and intelligent packaging is a top priority in fight to save food waste | 2014-07-28 | Food and Beverage Packaging - [ackagingstrategies.com/gdpr-policy?url=https%3A%2F%2Fwww.packagingstrategies.com%2Farticles%2F87233-active-and-intelligent-packaging-is-a-top-priority-in-fight-to-save-food-waste](https://www.packagingstrategies.com/gdpr-policy?url=https%3A%2F%2Fwww.packagingstrategies.com%2Farticles%2F87233-active-and-intelligent-packaging-is-a-top-priority-in-fight-to-save-food-waste))
16. Nasir, Nur Nadia; Othman, Siti Amira. (2020) Application of Bioplastic Packaging in Industry. *Journal of Advanced Research in Materials Science*, 74.1: 19-28.
17. Wyrwa, Joanna; Barska, Anetta. (2017) Innovations in the food packaging market: Active packaging. *European Food Research and Technology*, 243.10: 1681-1692.
18. C. P. Vidal, C. Muñoz-Shugulí, M. P. Vidal, M. J. Galotto, and C. L. de Dicastillo, (2020) "Active Electrospun Mats: A Promising Material for Active Food Packaging", in *Electrospinning - Material Technology of the Future [Working Title]*. London, United

Kingdom: IntechOpen, [Online]. Available: <https://www.intechopen.com/online-first/79949> doi: 10.5772/intechopen.101781

19. Mujtaba, Muhammad, et al. (2019) Current advancements in chitosan-based film production for food technology; A review. *International journal of biological macromolecules*, 121: 889-904.
20. WWF,2021 - Plastics Europe. Plastics - the Facts 2021. An analysis of European plastics production, demand and waste data <https://plasticseurope.org/wp-content/uploads/2021/12/Plastics-the-Facts-2021-web-final.pdf>).
21. Rivista Focus n°322, Settembre 2019
22. Schnurr, Riley EJ, et al. (2018) Reducing marine pollution from single-use plastics (SUPs): A review. *Marine pollution bulletin*, 137: 157-171.
23. Van Rensburg, Melissa L.; S'phumelele, L. Nkomo; Dube, Timothy. (2020) The 'plastic waste era'; social perceptions towards single-use plastic consumption and impacts on the marine environment in Durban, South Africa. *Applied Geography*, 114: 102132.
24. Plastic Europe, 2019. *An analysis of European plastics production, demand and waste data*. - <https://plasticseurope.org/wp-content/uploads/2021/10/2019-Plastics-the-facts.pdf>
25. CONAI - “Programma generale di prevenzione e di gestione degli imballaggi e dei rifiuti di imballaggio – Relazione generale consuntiva 2020”
26. ENEA.it - <https://www.enea.it/it/Stampa/news/ambiente-un-mare-di-plastica-enea-annuncia-i-risultati-degli-studi>),
27. Direttiva 94/62/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 20 dicembre 1994, sugli imballaggi ei rifiuti di imballaggio;

28. DIRETTIVA (UE) 2018/852 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 30 maggio 2018 che modifica la direttiva 94/62/CE sugli imballaggi e i rifiuti di imballaggio (Testo rilevante ai fini del SEE)
29. DIRETTIVA (UE) 2019/904 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 5 giugno 2019 sulla riduzione dell'incidenza di determinati prodotti di plastica sull'ambiente (Testo rilevante ai fini del SEE)
30. Walker, Thomas; Gramlich, Dieter; Dumont-Bergeron, Adele. (2020) The case for a plastic tax: a review of its benefits and disadvantages within a circular economy. *Sustainability*,.
31. UNI EN ISO 9000-2005;
32. REGOLAMENTO (CE) N. 178/2002 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 28 gennaio 2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare (GU L 31 del 1.2.2002, pag. 1)
33. Carli, Paola, et al. (2011) Dissection of genetic and environmental factors involved in tomato organoleptic quality. *BMC plant biology*, 11.1: 1-10.
34. UNI 10534-2005
35. Nicoli, Maria Cristina. (2012) An introduction to food shelf life: Definitions, basic concepts, and regulatory aspects. *Shelf life assessment of food*, 1-16.
36. Rahman, Mohammad Shafiur; Labuza, Theodore P. (2007) Water activity and food preservation. In: *Handbook of food preservation*. CRC Press. p. 465-494.
37. Quarantelli, A., et al. (2003) Oxidative processes in vegetal feeds. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria-Università di Parma (Italy)*.

38. Bonilla, J., et al. (2012) Edible films and coatings to prevent the detrimental effect of oxygen on food quality: Possibilities and limitations. *Journal of Food Engineering*, 2012, 110.2: 208-213.
39. Petrozziello, Maurizio, et al. (2018) Impact of increasing levels of oxygen consumption on the evolution of color, phenolic, and volatile compounds of Nebbiolo wines. *Frontiers in chemistry*, 6: 137.
40. Martinez, M. Victoria; Whitaker, John R. (1995) The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science & Technology*, 6.6: 195-200.
41. Rivista Food in, n.2; 2011.
42. Julian Kirchherr, Denise Reike, Marko Hekkert, (2017) *Conceptualizing the circular economy: An analysis of 114 definitions*, in “Resources, Conservation and Recycling”, Volume 127, Dicembre 2017, pp. 221-232.
43. Green Deal Europe – The European Commission’s priorities <https://ec.europa.eu/info/strategy/priorities-2019-2024>
44. Dipartimento Sostenibilità dei sistemi Produttivi e Territoriali (SSPT)- ENEA - <https://sostenibilita.enea.it/economicircolare>
45. Cfr. Commissione Europea, *Verso un'economia circolare. Closing the loop of the products lifecycle*, Ec.europa.eu. Disponibile all'indirizzo: https://ec.europa.eu/commission/priorities/jobs-growth-and-investment/towards-circular-economy_it,
46. European Green Deal: Commission proposes transformation of EU economy and society to meet climate ambitions Brussels, 14 July 2021 - https://ec.europa.eu/info/strategy/priorities-2019-2024/european-green-deal_it

47. The Just Transition Mechanism: making sure no one is left behind - https://ec.europa.eu/info/strategy/priorities-2019-2024/european-green-deal/actions-being-taken-eu/just-transition-mechanism_en.)
48. How the EU wants to achieve a circular economy by 2050 (2022)- <https://www.europarl.europa.eu/news/en/headlines/society/20210128STO96607/how-the-eu-wants-to-achieve-a-circular-economy-by-2050>.
49. Communication from the commission to the european parliament, the council, the european economic and social committee and the committee of the regions, A new Circular Economy Action Plan, For a cleaner and more competitive Europe - <https://www.europarl.europa.eu/news/en/headlines/society/20210128STO96607/how-the-eu-wants-to-achieve-a-circular-economy-by-2050> (2020)
50. ENEA per la sostenibilità ed economia circolare- <https://sostenibilita.enea.it/economicacircolare> consultato Maggio 2022
51. Innovazione: da ENEA nuovi materiali biodegradabili e “intelligenti” – possibili applicazione per packaging alimentare, arredi e mezzi di trasporto (20/2/2020)- <https://www.enea.it/it/Stampa/comunicati/innovazione-da-enea-nuovi-materiali-biodegradabili-e-201cintelligenti201d>
52. Ben-Othman, Sana; Jöudu, Ivi; Bhat, Rajeev. (2020) Bioactives from agri-food wastes: Present insights and future challenges. *Molecules*, 25.3: 510.
53. Gerassimidou, Spyridoula, et al. (2022) Unpacking the complexity of the UK plastic packaging value chain: A stakeholder perspective. *Sustainable Production and Consumption*, 30: 657-673.
54. Manthey, John A.; Grohmann, Karel. (2021) Phenols in citrus peel byproducts. Concentrations of hydroxycinnamates and polymethoxylated flavones in citrus peel molasses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49.7: 3268-3273.

55. Pattnaik, Monalisha, et al. (2021) Innovative technologies for extraction and microencapsulation of bioactives from plant-based food waste and their applications in functional food development. *Foods*, 10.2: 279.
56. Hadj Saadoun, Jasmine, et al. (2021) Fermentation of agri-food waste: A promising route for the production of aroma compounds. *Foods*, 10.4: 707.
57. Progetto Europeo BIOCOSì per il packaging intelligente – consultato Maggio 2022 <https://www.biocosi.org/il-progetto/#1558371882658-4b06960e-b729>
58. Bastioli, Catia. Bioplastics: an Italian case study of bioeconomy in Italy. (2013) In: *An Occasion to Discuss About What Model of Bioeconomy we Want in EU, Bioplastics: a Case Study of Bioeconomy in Italy in the Light of Horizon 2020, Conference Brussels, European Parliament, March the.* p. 2013.
59. Zhou, Xinxin, et al. (2017) Progress in bio-inspired sacrificial bonds in artificial polymeric materials. *Chemical Society Reviews*, 46.20: 6301-6329.
60. COMMUNICATION FROM THE COMMISSION TO THE EUROPEAN PARLIAMENT, THE COUNCIL, THE EUROPEAN ECONOMIC AND SOCIAL COMMITTEE AND THE COMMITTEE OF THE REGIONS- A new Circular Economy Action Plan- For a cleaner and more competitive Europe (Brussels, 11.3.2020)
61. UNI EN 13432:2002 “Requisiti per imballaggi recuperabili mediante compostaggio e biodegradazione”- <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=celex%3A32001D0524>
62. UNI EN 14995: 2006 Evaluation of compostability - Test scheme and specification pubblicata in data 13/12/2006 ovvero la norma UNI EN14995: 2007 Materie plastiche - Valutazione della compostabilità - Schema di prova e specificazioni.-<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/?uri=celex%3A32001D0524>

63. Vartiainen, Jari; Vähä-Nissi, Mika; Harlin, Ali. (2014) Biopolymer films and coatings in packaging applications—a review of recent developments. *Materials Sciences and applications*.
64. Agarwal, Shilpi. (2021) Major factors affecting the characteristics of starch based biopolymer films. *European Polymer Journal*, 160: 110788.
65. CHITHARANJAN, Aditi Parmar. (2021) Microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) from sewage sludge fermentation liquids".
66. Favaro, L., Basaglia, M., & Casella, S. (2019). Improving polyhydroxyalkanoate production from inexpensive carbon sources by genetic approaches: a review. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 13(1), 208-227.
67. Koller, Daphne; Friedman, (2019) Nir. *Probabilistic graphical models: principles and techniques*. MIT press.
68. Bonilla, J., et al. (2014) Physical, structural and antimicrobial properties of poly vinyl alcohol–chitosan biodegradable films. *Food Hydrocolloids*, 35: 463-470
69. Ge, Changfeng; Lansing, Baxter; Lewis, Christopher L. (2021) Thermoplastic starch and poly (vinyl alcohol) blends centered barrier film for food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*, 27: 100610.
70. Gupta, Arun, et al. (2012) Extraction of keratin protein from chicken feather. *Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 6.8: 732.
71. Jillian G. Rouse and Mark E. Van Dyke, (2010) A Review of Keratin-Based Biomaterials for Biomedical Applications, 3 February 2010)
72. Wang, Bin, et al. (2016) Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration. *Progress in Materials Science*, 76: 229-318.

73. Feroz, Sandleen, et al. (2020) Keratin-Based materials for biomedical applications. *Bioactive materials*, 5.3: 496-509.)
74. Kumawat, Tarun Kumar, et al. (2018) Keratin waste: the biodegradable polymers. In: *Keratin*. IntechOpen,
75. Zoccola, Marina; Aluigi, Annalisa; Tonin, Claudio. (2009) Characterisation of keratin biomass from butchery and wool industry wastes. *Journal of Molecular Structure*, , 938.1-3: 35-40.
76. Tesfaye, Tamrat, et al. (2017) Valorisation of chicken feathers: Characterisation of chemical properties. *Waste Management*, 68: 626-635.
77. REGOLAMENTO (CE) N. 1774/2002 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 3 ottobre 2002 recante norme sanitarie relative ai sottoprodotti di origine animale non destinati al consumo umano
78. Kornilłowicz-Kowalska, Teresa; Bohacz, Justyna. (2011) Biodegradation of keratin waste: theory and practical aspects. *Waste management*, 31.8: 1689-1701
79. Burnett, C. L., Bergfeld, W. F., Belsito, D. V., Hill, R. A., Klaassen, C. D., Liebler, D. C., Marks, J. G., Jr, Shank, R. C., Slaga, T. J., Snyder, P. W., Gill, L. J., & Heldreth, B. (2021). Safety Assessment of Keratin and Keratin-Derived Ingredients as Used in Cosmetics. *International journal of toxicology*, 40(2_suppl), 36S–51S. <https://doi.org/10.1177/10915818211013019>
80. Donato, Ricardo K.; MIJA, Alice. (2019) Keratin associations with synthetic, biosynthetic and natural polymers: An extensive review. *Polymers*, 12.1: 32.
81. Kumawat, Tarun Kumar, et al. (2019) Keratin waste: the biodegradable polymers. In: *Keratin*. IntechOpen,

82. Ramakrishnan, Navina, et al. (2018) Keratin based bioplastic film from chicken feathers and its characterization. *International journal of biological macromolecules*, 111: 352-358
83. Martinez-Hernandez, Ana L., et al. (2005) Microstructural characterisation of keratin fibres from chicken feathers. *International journal of environment and pollution*, 23.2: 162-178.
84. Tran, Chieu D., et al. (2016) Synthesis, structure and antimicrobial property of green composites from cellulose, wool, hair and chicken feather. *Carbohydrate polymers*, , 151: 1269-1276
85. Shahidi, Fereidoon; Ambigaipalan, Priyatharini. (2015) Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of functional foods*, 18: 820-897.
86. Yang, Cheng, et al. (2015) Rapid and efficient conversion of all-E-astaxanthin to 9 Z- and 13 Z-isomers and assessment of their stability and antioxidant activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65.4: 818-826.
87. Reg. CE n. 1333/2008 e direttive 2008/84 CE, 2008/60/CE e 2008/128/ce.
88. Vuolo, Milena Morandi; LIMA, Verena Silva; Junior, Mário Roberto Maróstica. (2019) Phenolic compounds: Structure, classification, and antioxidant power. In: *Bioactive compounds*. Woodhead Publishing,. p. 33-50.
89. Scalbert A, Williamson G. (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr*;130:2073S-85S
90. Rice-Evans, Catherine. (2001) Flavonoid antioxidants. *Current medicinal chemistry*, 8.7: 797-807.

91. Gali-Muhtasib, Hala; Hilan, Christo; Khater, Carla. (2001) Traditional uses of *Salvia libanotica* (East Mediterranean sage) and the effects of its essential oils. *Journal of Ethnopharmacology*, 71.3: 513-520.
92. Farhat, G. N.; Affara, N. I.; Gali-Muhtasib, H. U. (2001) Seasonal changes in the composition of the essential oil extract of East Mediterranean sage (*Salvia libanotica*) and its toxicity in mice. *Toxicol*, 39.10: 1601-1605.
93. FU, Zhiming, et al. (2013) The pharmacological properties of *Salvia* essential oils. *Journal of applied pharmaceutical science*, 3.7: 122.
94. Morteza Yousefzadi, Ali Sonboli, Samad Nejad Ebrahimi and SeidHasan Hashemi. (2007) Antimicrobial Activity of Essential Oil and Major Constituents of *Salvia chloroleuca*. *Z. Naturforsch.*; 63c:337–340. N. S. L. Perry, P. J. Houghton, P. Jenner, A. Keith and E. K. Perry. *Salvia lavandulaefolia* essential oil inhibits cholinesterase in vivo. *Phytomedicine*. 2002; 9: 48–51
95. Kalemba D and kunicka a (2003). antibacterial and antifungal properties of essential oils. *curr med chem*. 10(10): 813-29
96. Shavandi A., Bekhit AE-DA., Carne A., Bekhit A., (2017) Evaluation of keratin extraction from wool by chemical methods for bio-polymer application, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 32 163–177. doi:10.1177/0883911516662069.
97. Michelina, Catauro, et al. (2019) FT-IR and GC-MS analyses of an antioxidant leaf essential oil from sage plants cultivated as an alternative to tobacco production. *Journal of Essential Oil Research*, 31.2: 138-144.
98. Terzioğlu, Pınar, et al. (2021) Biowaste orange peel incorporated chitosan/polyvinyl alcohol composite films for food packaging applications. *Food Packaging and Shelf Life*, 30: 100742.
99. Dickerson, Matthew B., et al. (2013) Keratin-based antimicrobial textiles, films, and nanofibers. *Journal of Materials Chemistry B*, 1.40: 5505-5514.

100. Alahyaribeik, Samira; Ullah, Aman. (2020) Metodi di estrazione della cheratina dalle piume di pollame e loro effetti sull'attività antiossidante della cheratina estratta. *Rivista internazionale di macromolecole biologiche*, 148: 449-456.
101. Sinkiewicz, Izabela, et al. (2017) Alternative methods of preparation of soluble keratin from chicken feathers. *Waste and biomass valorization*, 8.4: 1043-1048.
102. Qin, Xiaojie, et al. (2022) A sustainable and efficient recycling strategy of feather waste into keratin peptides with antimicrobial activity. *Waste Management*, 144: 421-430.