UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

FACOLTA' DI AGRARIA

Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie ed Alimentari
Sezione di Scienze Agroalimentari e Ambientali

Dottorato di Ricerca in
"Chimica Agraria ed Ecocompatibilità"
XXIV ciclo

dott. FABIO LICCIARDELLO

Nuove prospettive di impiego di oli essenziali per la salvaguardia di prodotti alimentari confezionati

Dissertazione finale

Coordinatore	*Tutor*
Chiar.ma Prof.$_{ssa}$ Mara Gennari	Chiar.ma Prof.$_{ssa}$ Adalgisa Belligno

---

Triennio 2008 - 2011

INDICE

PREMESSA	1
1. INTRODUZIONE	3
1.1. Oli essenziali: aspetti compositivi e attività biologiche	3
1.2. Attività antiossidante	14
1.3. Attività antimicrobica	16
1.4. Gli oli essenziali nella salvaguardia dei prodotti alimentari confezionati	18
1.5. Attività repellente di oli essenziali verso insetti infestanti	20
1.6. Protezione degli alimenti confezionati dagli insetti delle derrate: il packaging come ultima frontiera	22
2. VALUTAZIONE DELLA REPELLENZA DI OLI ESSENZIALI VERSO INSETTI DELLE DERRATE	26
2.1. Scopo del Lavoro	26
2.2. Materiali e Metodi	26
2.3. Risultati	29
3. STUDIO DELL'EFFICIACIA DI UN INNOVATIVO SISTEMA DI ACTIVE PACKAGING CON FUNZIONE REPELLENTE VERSO INSETTI DELLE DERRATE	37
3.1. Scopo del Lavoro	37

3.2. Materiali e Metodi	37
3.3. Risultati	38
4. STUDIO DELLE PROPRIETÀ DIFFUSIONALI DI OLI ESSENZIALI IN MATERIALI PLASTICI	40
4.1. Scopo del Lavoro	
4.2. Materiali e metodi	41
4.2.1. Preparazione dei film attivi	41
4.2.2. Prove di diffusione	41
4.2.3. Analisi MHS-SPME-GC dei componenti degli oli essenziali	43
4.2.4. Modello matematico per il calcolo dei coefficienti di diffusione e di ripartizione dai dati sperimentali	45
4.3. Risultati	48
4.3.1. Ottimizzazione dei parametri MHS-SPME	48
4.3.2. Composizione degli oli essenziali	52
4.3.3. Diffusione dei componenti degli oli essenziali in polipropilene	57
4.3.4. Ripartizione dei componenti degli oli essenziali tra PP rivestito e PP vergine	61
5. CONCLUSIONI	68
6. APPENDICE	70
7. BIBLIOGRAFIA	75

PREMESSA

Il presente lavoro di tesi di Dottorato rappresenta un approccio integrato all'innovazione in materia di salvaguardia dei prodotti alimentari confezionati. La problematica della progettazione di sistemi d'imballaggio fa riferimento a un settore, il Food Packaging, di carattere multidisciplinare e che attinge, fra le altre, a competenze di chimica analitica, scienze e tecnologie alimentari, chimica fisica, scienze dei materiali, microbiologia. I recenti sviluppi nel settore, e la tendenza verso il ricorso a soluzioni tecnologiche di derivazione naturale e a basso impatto per l'ambiente e per la salute umana, chiama in causa anche le scienze agrarie, nella ricerca costante di specie vegetali, piante ed essenze, dotate di metaboliti secondari potenzialmente utili per l'applicazione nel settore alimentare. Su questo molto è già stato fatto, ma tantissimo resta ancora da fare, e la nuova sensibilità che costituisce il presupposto di questa "rivoluzione verde" ha sicuramente dato un forte stimolo per l'ulteriore approfondimento della ricerca in merito.

La tesi si presenta intenzionalmente come documento ad alta densità di informazioni. Non essendo avvezzo alle lungaggini retoriche e all'utilizzo barocco della comunicazione, ho voluto inserire in questa pubblicazione esclusivamente informazioni utili alla comprensione degli obiettivi, delle modalità operative e dei risultati del lavoro di ricerca, tralasciando di approfondire nozioni di carattere generale, certamente scontate per il lettore.

L'introduzione passa in rassegna le proprietà chimiche e biologiche degli oli essenziali di origine vegetale, con riferimento anche alle recenti applicazioni nel campo della salvaguardia degli alimenti.

La parte sperimentale si presenta suddivisa in tre sezioni fondamentali, riconducibili alle tre fasi principali del lavoro di ricerca condotto. In primo luogo viene presentato lo studio sulla repellenza di quattro oli essenziali, basilico,

citronella, origano e rosmarino, verso una specie di insetti infestanti delle derrate, *Tribolium castaneum*.

In secondo luogo vengono presentati alcuni risultati relativi all'efficacia di un *active packaging* con funzione repellente verso insetti infestanti, con potenziali applicazioni commerciali.

Infine si discute lo studio delle proprietà diffusionali di oli essenziali in polipropilene; questo lavoro è stato condotto in parte presso il Departamento de Quimica Analitica de la Universidad de Zaragoza (Spagna) e ha prodotto un elaborato scientifico che risulta già sottomesso per la pubblicazione su riviste scientifiche internazionali al momento della stesura di questa tesi.

1. INTRODUZIONE

1.1. Oli essenziali: aspetti compositivi e attività biologiche

Gli oli essenziali sono miscele naturali di componenti organici volatili sintetizzati dalle piante come metaboliti secondari, spesso responsabili dell'odore distintivo delle piante. Sono liquidi limpidi, spesso incolori, solubili nei grassi e in solventi organici (hanno generalmente alti coefficienti di ripartizione ottanolo/acqua) aventi comunemente densità inferiore all'acqua. Essi possono essere sintetizzati da tutti gli organi delle piante, fiori, foglie, frutti, gemme, semi, radici, legno e corteccia, dove vengono conservati in cellule secretorie, cavità, canali, cellule epidermiche o tricomi ghiandolari.

In natura gli oli essenziali giocano un ruolo importante nella protezione delle piante in virtù della loro azione antibatterica, antivirale, antifungina e insetticida e taluni svolgono funzione di attrazione verso insetti pronubi favorendo la dispersione di semi e pollini.

Essi sono costituiti da idrocarburi (terpeni e sesquiterpeni) e da composti ossigenati (alcoli, esteri, eteri, aldeidi, chetoni, lattoni, fenoli) (Guenther, 1972). Si conoscono circa 3000 oli essenziali, di cui solo il 10% ha importanza commerciale in campo cosmetico, alimentare e farmaceutico (FAO, 1995; Van de Braak e Leijten, 1999). Questi sono riconosciuti come sicuri (GRAS, generally recognized as safe) dalla Food and Drug Administration statunitense (FDA) (Trongtokit et al., 2005), e la loro composizione varia sensibilmente in funzione della specie, della varietà e dell'origine geografica (Zygadlo e Juliani, 2003).

Sin da tempi antichi gli oli essenziali sono stati impiegati come agenti terapeutici. Per esempio, quelli di lavanda e camomilla sono usati per curare l'insonnia, olio di menta, rosmarino e coriandolo per trattare problemi digestivi. Vari studi, inoltre, ne hanno dimostrato scientificamente le attività

antinfiammatoria (Penna et al., 2003), antivirale (Garcia et al., 2003), antitumorale (Katiyar et al., 1996), etc.

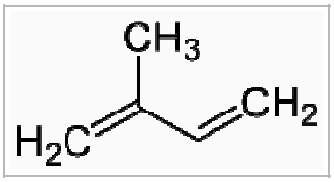
Vari studi negli ultimi decenni sono stati condotti sulla determinazione dei profili compositivi di oli essenziali estratti da diverse essenze vegetali. In linea di massima, la presenza dominante di terpenoidi e di sostanze fenoliche nella loro composizione sembra essere responsabile dell'attività biologica, sebbene esistano evidenze che anche le componenti minoritarie giochino un ruolo importante, prevalentemente attraverso effetti sinergici (Helander et al., 1998, Paster et al., 1995).

Gli oli essenziali sono miscele complesse che possono contenere 20-60 componenti a concentrazioni piuttosto differenti. Normalmente, due o tre sono i componenti maggioritari presenti a concentrazioni relativamente alte (20-70%). Ad esempio, carvacrolo (30%) e timolo (27%) sono i principali componenti dell'olio essenziale di *Origanum vulgare*, il linalolo (68%) dell'olio essenziale di *Coriandrum sativum*, 1-8 cineolo (50%) dell'olio di *Cinnamomum camphora*, carvone (58%) e limonene (37%) dell'olio essenziale di semi di *Anethum graveolensis*, infine mentolo (59%) e mentone (19%) sono i principali componenti dell'olio essenziale di *Mentha piperita*.

I componenti includono due gruppi di diversa origine biosintetica (Bowles, 2003; Pichersky et al., 2006). Il primo è composto da **terpeni e terpenoidi** e l'altro da **costituenti aromatici e alifatici**, tutti caratterizzati da basso peso molecolare.

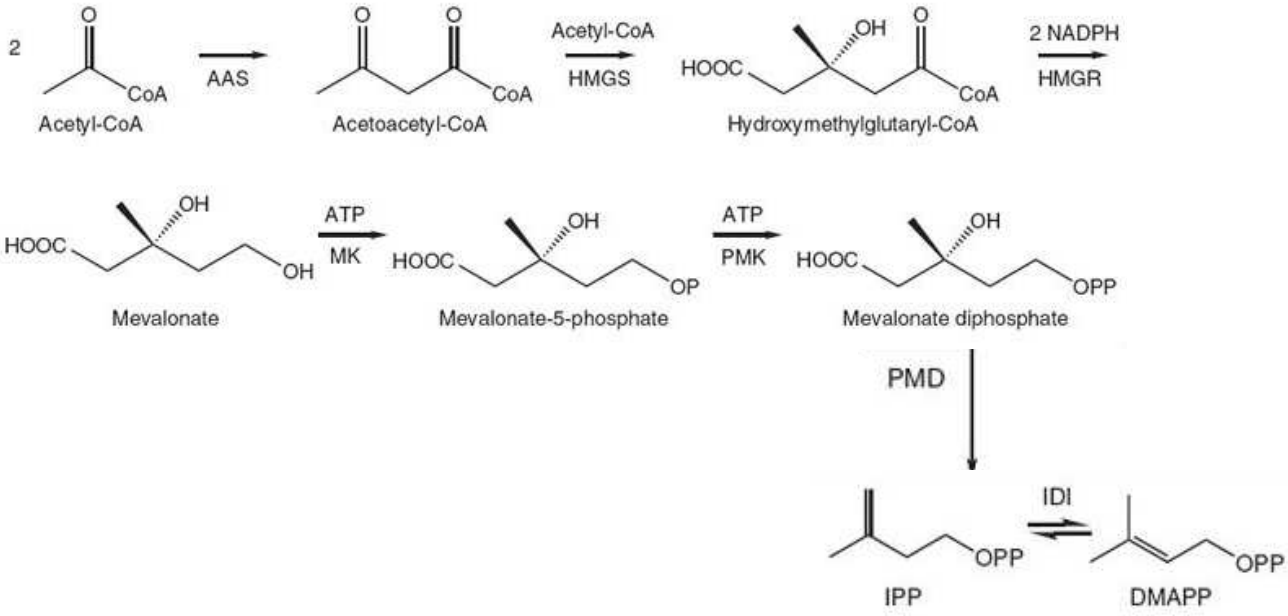
Terpeni

I terpeni formano classi differenti dal punto di vista strutturale e funzionale. Ciò che accomuna questo gruppo eterogeneo è l'unità fondamentale a 5 atomi di carbonio detta *isoprene*.



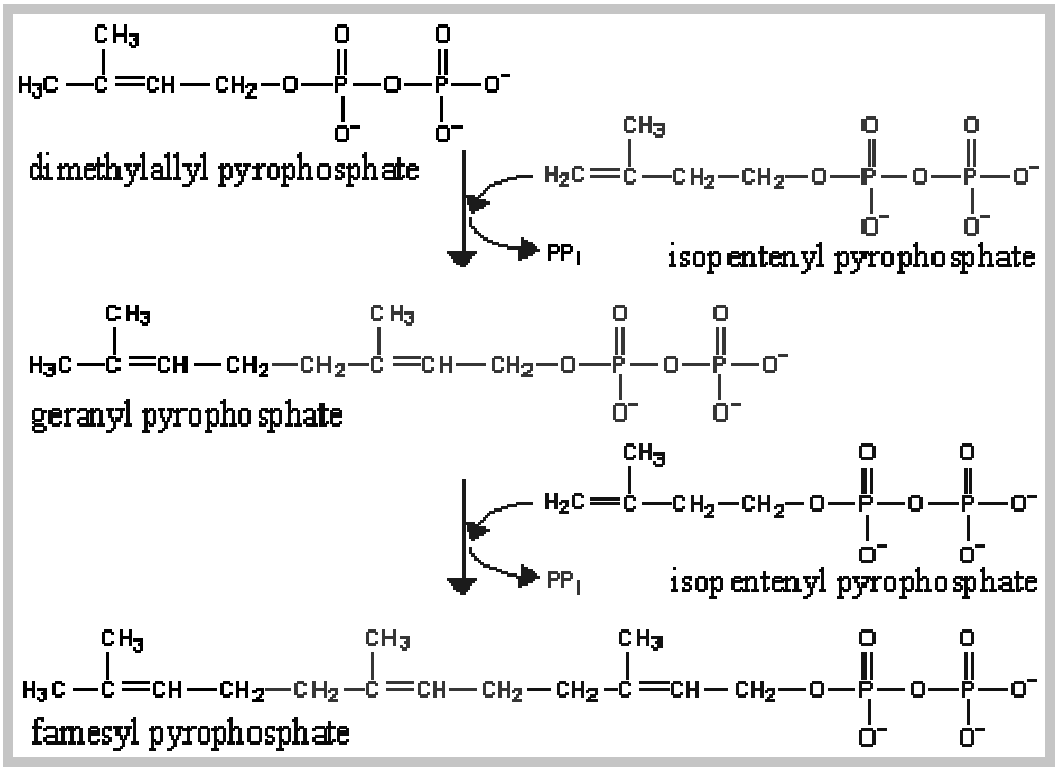
isoprene

In realtà i terpeni non derivano in natura dall'isoprene, che non è mai stato isolato come prodotto naturale delle piante, mentre il vero precursore universale di tutti i terpeni è l'acido mevalonico. Quest'ultimo deriva dall'acetil-CoA e viene attivato per fosforilazione seguita da eliminazione decarbossilativa per dare isopentenil-pirofosfato (IPP), che a sua volta isomerizza a dimetilallil-pirofosfato (DMAPP), secondo lo schema qui di seguito presentato:



DMAPP e IPP rappresentano gli equivalenti biologici delle unità isopreniche.

Una reazione catalizzata da enzima tra DMAPP e IPP forma il composto a 10 atomi di carbonio geranil pirofosfato, che può facilmente idrolizzarsi a geraniolo, mentre l'ulteriore addizione di una molecola di isopentenil pirofosfato genera il farnesil pirofosfato, precursore dei sesquiterpeni (C15).



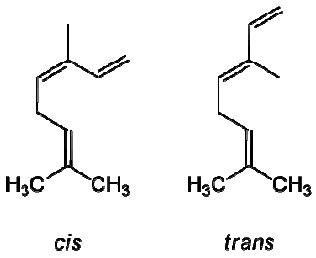
Infine, attraverso modificazioni enzimatiche secondarie (reazioni redox) dello scheletro del terpene, vengono attribuite proprietà funzionali ai diversi terpeni.

I **monoterpeni** sono costituiti da due unità isopreniche; queste sono le molecole più importanti, rappresentando il 90% degli oli essenziali. Si distinguono diverse funzioni:

Terpeni aciclici

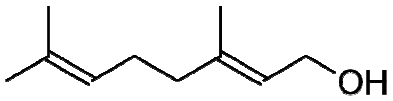
Idrocarburi:

Farnesene

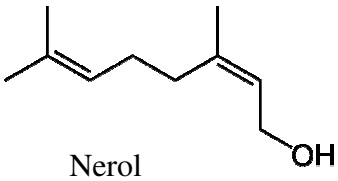


Ocimene

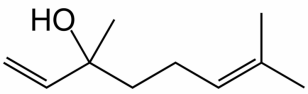
Alcoli:



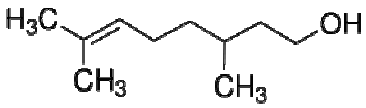
Geraniol



Nerol



Linalool

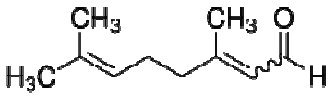


Citronellol

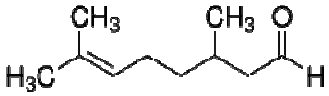
Gli alcoli terpenici aciclici geraniolo, linalolo e citronellolo sono i più importanti alcoli terpenici utilizzati come aromi e fragranze. Geraniolo e nerolo, inoltre, sono anche substrati primari nella biosintesi dei terpeni. Il geraniolo è presente in quasi tutti gli oli essenziali, frequentemente in forma di estere. Si ritrova in grandi concentrazioni nell'olio di palmarosa, di geranio, di citronella e di rosa, quasi sempre accompagnato da minori quantità dell'isomero nerolo. Il linaiolo è presente in grandi concentrazioni in oli di canfora, palissandro e coriandolo. In presenza di acidi isomerizza velocemente a geraniolo, nerolo e α-

terpineolo. Il citronellolo si ritrova in molti prodotti naturali come miscela dei suoi due enantiomeri, le forme (+) e (-), quest'ultima predominante negli oli di geranio e di rosa. E' relativamente più stabile del geraniolo, in quanto contiene un doppio legame in meno.

Aldeidi:

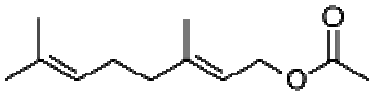


Geranial

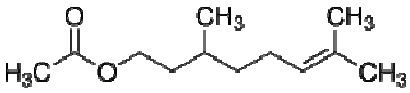


Citronellal

Esteri:



Geranyl acetate

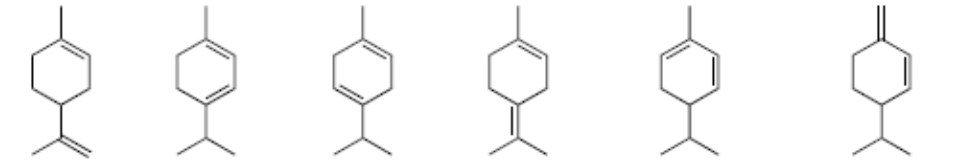


Citronellyl acetate

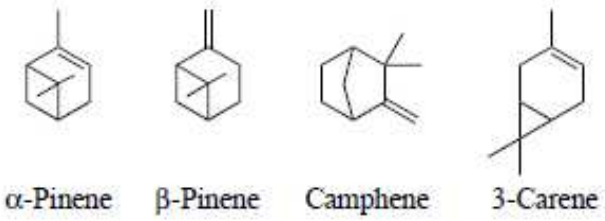
Terpeni ciclici

Idrocarburi:

monociclici:

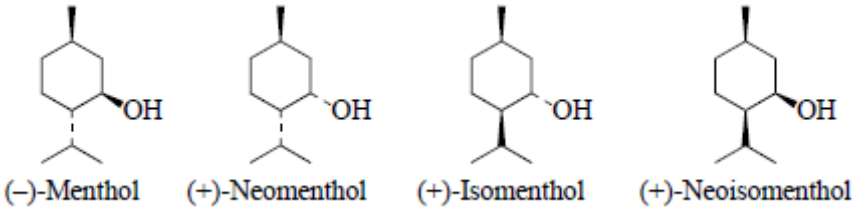


biciclici:

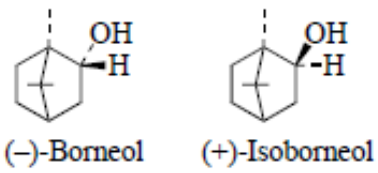


Alcoli:

monociclici:

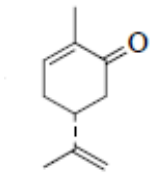


biciclici:



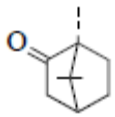
Chetoni:

monociclici:



(–)-Carvone

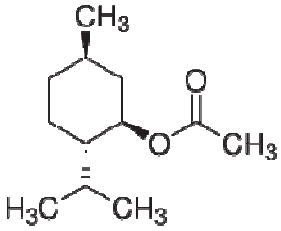
biciclici:



(+)-Camphor

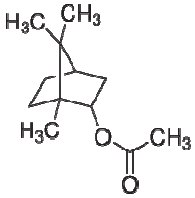
Esteri:

monociclici: mentil o a-terpinil acetato, etc.



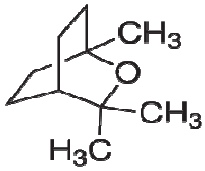
Menthyl acetate

biciclici: isobornil acetato, etc.



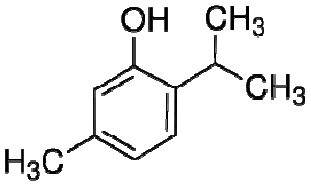
Bornyl acetate

Eteri:

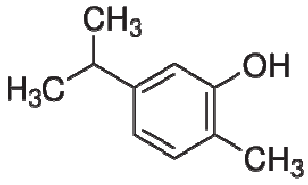


1,8-cineole (eucalyptol)

Fenoli:



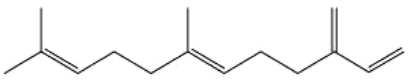
thymol



carvacrol

I **sesquiterpeni** hanno origine dall'unione di tre unità isopreniche (C15). Struttura e funzione dei sesquiterpeni sono simili a quelle dei monoterpeni:

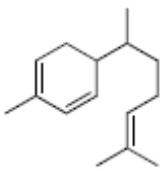
<u>Sesquiterpeni aciclici</u>



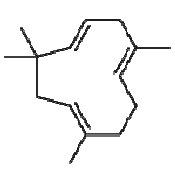
Farnesene

<u>Sesquiterpeni ciclici</u>

Monociclici:

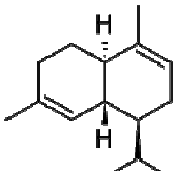


Zingiberene

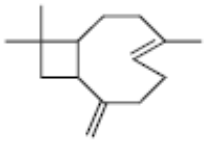


α-humulene

Biciclici:

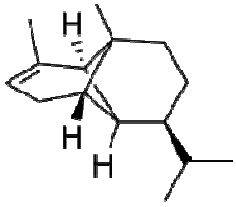


α-cadinene



Caryophyllene

Triciclici: copaene



α-copaene

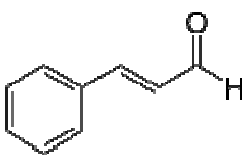
Esempi di piante contenenti questi composti sono: angelica, bergamotto, sedano, citronella, coriandolo, eucalipto, geranio, ginepro, lavanda, limone, mandarino, menta, arancia, menta piperita, pino, rosmarino, salvia, timo.

Composti aromatici

Derivati dal fenilpropano, essi si ritrovano meno frequentemente che i terpeni. Le vie biosintetiche relative a terpeni e derivati del fenilpropano sono in genere distinte nelle piante, ma possono coesistere in alcune, con prevalenza di una via principale (per esempio, l'olio di cannella, con cinnamaldeide come costituente principale ed eugenolo come minoritario, oppure l'olio di chiodo di garofano, di finocchio, etc.).

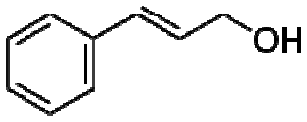
I composti aromatici comprendono:

Aldeidi:



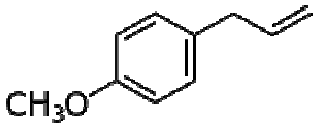
Cinnamaldehyde

Alcoli:

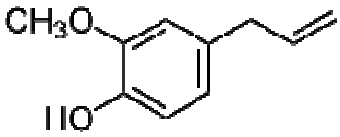


Cinnamic alcohol

Fenoli:



Methylchavicol
(Estragole)



Eugenol

Metossi derivati: anetolo, elemicina, estrapolo, metileugenolo

Le principali fonti vegetali di questi composti sono anice, cannella, chiodo di garofano, finocchio, noce moscata, prezzemolo, sassofrasso, anice stellato, e alcune famiglie botaniche (Apiaceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Rutaceae).

Infine, componenti azotati o solforati come i derivati dei glucosinolati o degli isotiocianati (oli di aglio e mostarda) sono anche metaboliti secondari caratteristici di alcune piante.

1.2. Attività antiossidante

Gli antiossidanti sono composti in grado di ritardare o inibire l'ossidazione di lipidi o altre molecole, bloccando l'iniziazione o la propagazione delle reazioni a catena. I principali saggi per la determinazione della capacità antiossidante possono essere suddivisi in due categorie:

- saggi basati sul trasferimento di un singolo elettrone
- saggi basati sul trasferimento di un atomo di idrogeno.

I primi misurano la capacità di un antiossidante di ridurre un ossidante il quale, in seguito alla reazione, subisce un cambiamento di colore. Tra questi vi sono, ad esempio, il metodo TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) ed il metodo FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). I metodi basati sul trasferimento di un atomo di idrogeno, invece, solitamente sfruttano un generatore sintetico di radicali liberi, una sonda molecolare ossidabile, ed un antiossidante. Tra questi vi sono, ad esempio, il metodo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) ed il metodo TRAP (total radical-trapping antioxidant parameters). In ogni caso tutte le metodologie misurano la capacità di scavenger degli antiossidanti nei confronti dei radicali e non la loro azione preventiva volta ad impedirne la formazione.

I risultati vengono normalmente espressi come IC_{50}, cioè concentrazione di antiossidante che determina l'inibizione del 50% della formazione dei prodotti delle reazioni di ossidazione.

L'attività antiossidante di oli essenziali è stata oggetto di numerosissimi studi: Exarchou et al. (2002), Şahin et al. (2004), Dambolena et al. (2010), Viuda-Martoz et al. (2010a) e molti altri autori hanno valutato le proprietà antiossidanti di olio essenziale di origano. Tra tutti gli oli essenziali, quello di origano sembra essere il più studiato per le proprietà antiossidanti, riconducibili all'effetto di timolo e carvacrolo, che ne sono i principali costituenti.

Madsen et al. (1996), Javanmardi et al. (2003), Lee e Shibamoto (2002), Dambolena et al., (2010a) hanno valutato l'attività antiossidante di olio essenziale di basilico (*Ocimum basilicum*) e altre specie del genere *Ociumum.* In particolare, Lee et al. (2005) hanno caratterizzato la composizione di oli essenziali di basilico e timo e l'attività antiossidante di alcuni dei componenti volatili principali: i risultati hanno dimostrato che eugenolo, timolo e carvacrolo sono tra i componenti a maggiore attività, e che il loro effetto antiossidante è paragonabile a quello di noti antiossidanti come butilidrossitoluene (BHT) e α-tocoferolo.

Ancora, altri studi hanno verificato il potere antiossidante di rosmarino (Wang et al. 2008, Viuda-Martoz et al., 2010a,b), timo (Lee e Shibamoto, 2002; Viuda-Martoz et al., 2010a,b), chiodi di garofano (Misharina e Samusenko, 2008; Viuda-Martoz et al., 2010b) e moltissime altre spezie.

Più recentemente sono stati pubblicati alcuni studi applicativi di oli essenziali in alimenti allo scopo di ridurre l'irrancidimento ossidativo di oli e grassi (Asensio et al., 2011; Çalikoğlu et al., 2009; Özcan e Arslan, 2011; Trojakova et al., 2001), prodotti carnei (Botsoglou et al., 2002; Estévez e Cava, 2006; Fasseas et al., 2007) e semi oleaginosi (Olmedo et al., 2008).

1.3. Attività antimicrobica

I testi per l'attività antimicrobica possono essere distinti in prove per diffusione e per diluizione. Appartengono alla prima categoria i saggi di diffusione su disco, in cui dischetti di carta impregnati della sostanza antimicrobica vengono posti sulla superficie di piastre di agar inoculate. Anche i saggi in pozzetti (agar well tests) appartengono alla categoria dei saggi diffusivi, qui la sostanza antimicrobica viene posta in pozzetti ricavati in un supporto di agar inoculato.

I metodi per diluizione (sostanza antimicrobica diluita in agar o in brodo) permettono di quantificare l'efficacia dell'antimicrobico; la diluizione in brodo anziché in agar permette l'automatizzazione dei sistemi e screening più veloci, con possibilità di determinare valori soglia di densità ottica.

Una interessante review (Burt, 2004) sulle proprietà antimicrobiche degli oli essenziali e sulle loro potenziali applicazioni alimentari mette in evidenza, come risulta dai numerosi studi in letteratura, che le specie gram-negative sono meno sensibili all'azione inibente di questi composti naturali. Alcuni componenti degli oli essenziali sono stati individuati come efficaci agenti antibatterici, tra questi carvacrolo, timolo, eugenolo, perillaldeide, cinnamaldeide e acido cinnamico, i quali possiedono, in vitro, concentrazioni minime inibenti (MIC) comprese tra 0.05 e 5 μL/mL, mentre gli stessi effetti negli alimenti possono essere raggiunti con concentrazioni più elevate.

Tra gli oli essenziali di spezie, quelli di origano, rosmarino, menta, chiodi di garofano e cannella sono tra i più studiati e la loro efficacia è stata comprovata su un ampio range di specie batteriche e fungine.

Dušan et al. (2006), Paster et al. (1995), Şahin et al. (2004) e Soylu et al. (2006) hanno valutato le proprietà antimicrobiche di olio essenziale di origano, evidenziandone grandi potenziali verso molte specie di batteri di funghi e lieviti.

Fu et al. (2007), Goñi et al. (2009), Lopez et al. (2005), Soylu et al. (2006) hanno studiato l'efficacia antimicrobica di oli essenziali di chiodi di garofano, cannella e rosmarino, Runyoro et al. (2010) hanno approfondito il potenziale antimicrobico di quattro specie del genere *Ocimum*. Anwar et al. (2009) hanno dimostrato un considerevole effetto antimicrobico di olio essenziali di finocchio, registrando una sensibilità maggiore per specie gram-positive e MIC pari a 62.6 e 80.6 mg/mL per *Bacillus subtilis* e *Aspergillus niger*, mentre estratti alcolici degli stessi semi non hanno prodotto alcun effetto batteriostatico, a riprova del fatto che tale effetto biologico è da imputare ai costituenti volatili dell'olio essenziale. Hussain et al. (2010) hanno studiato l'efficacia antimicrobica di estratti di specie appartenenti al genere *Mentha*, rivelando come tale effetto sia funzione della stagione di produzione e sia variabile a seconda del target microbico: tutti gli estratti si sono mostrati fortemente inibenti verso le specie gram positive testate (*Staphylococcus aureus e Bacillus subtilis),* mentre solo alcune delle specie fungine patogene (*Rhizopus solani, Aspergillus niger* e *Alternaria alternata)* hanno evidenziato sensibilità.

La maggior parte dei lavori in letteratura determina l'efficacia inibitoria di oli essenziali verso microorganismi in test che prevedono il contatto tra sostanza attiva e agente target, mentre gli effetti inibitori sembrano cambiare notevolmente nei test in fase vapore. Per questo alcuni studi (Goñi et al., 2009, Lopez et al., 2005, 2007a) hanno preso in esame l'attività antimicrobica di oli essenziali in fase vapore.

In virtù delle dimostrate capacità antimicrobiche, oli essenziali di diverse essenze sono stati utilizzati per migliorare l'aspetto igienico di diversi prodotti e ridurre la proliferazione microbica durante la conservazione, in particolare in: carne (Ouattara et al., 1997; Solomakos et al., 2008; Mastromatteo et al., 2009**);** prodotti ittici (Mejlholm e Dalgaard, 2002); in vegetali (nelle acque di lavaggio) (Sing et al., 2002; Wan et al., 1998) e prodotti caseari (Gammariello et al., 2008; Vrida Menon e Garg, 2001).

1.4. Gli oli essenziali nella salvaguardia dei prodotti alimentari confezionati

Gli oli essenziali si caratterizzano per avere coefficienti di ripartizione ottanolo/acqua piuttosto elevati, questa caratteristica permette loro di solubilizzare, diffondere e permeare all'interno dei più comuni materiali plastici, tra i quali le poliolefine. L'affinità per i materiali plastici e le loro proprietà biologiche sono caratteristiche che sono state recentemente sfruttate nella progettazione di imballaggi alimentari attivi (Regolamenti 2004/1935/CE e 450/2009/CE), attraverso l'incorporazione degli stessi oli in film o per immobilizzazione su sistemi di rilascio opportunamente studiati (Becerril et al., 2007; Hosseini et al., 2009; Montero-Prado et al., 2011; Rodriguez et al., 2007). In virtù delle loro proprietà, gli oli essenziali possono essere impiegati per la progettazione di imballaggi attivi con funzione antiossidante e/o antimicrobica.

Esistono già diverse applicazioni di questa tecnologia:

Rodríguez et al. (2007) hanno valutato l'efficacia di un imballaggio in carta contenente oli essenziali immobilizzati su paraffina, contro muffe alteranti di prodotti ortofrutticoli, osservando una protezione completa verso fragole frigoconservate e la persistenza dell'efficacia durante un periodo di 71 giorni.

Lopez et al. (2007a,b) hanno messo a punto film antimicrobici di polipropilene (PP) e di un copolimero polietilene/etilene vinil alcol (PE/EVOH) che incorporavano oli essenziali di cannella, origano e chiodi di garofano contenuti in una resina di rivestimento applicata ai film stessi. I risultati hanno dimostrato che l'efficacia dei film attivi è maggiore contro specie di muffe mentre, in ordine, specie gram-positive e gram-negative richiedono concentrazioni più alte di sostanza attiva.

Montero-Prado et al. (2011) hanno valutato l'efficacia di un imballaggio attivo basato su etichette adesive contenenti olio essenziali di cannella, applicate alle confezioni, sul mantenimento della qualità di pesche tardive. I risultati hanno

dimostrato una notevole riduzione dell'incidenza di frutti alterati rispetto a quelli non esposti alla sostanza attiva, permettendo il mantenimento per 12 giorni di parametri sensoriali su valori simili a quelli del prodotto appena confezionato.

Alcuni lavori hanno riguardato l'incorporazione di oli essenziali il cui effetto antimicrobico è ampiamente dimostrato, in matrici proteiche e polisaccaridiche come caseinato di sodio, latte scremato in polvere, concentrato di proteine del siero, alginati e chitosano. Tali matrici sono state sviluppate per l'impiego come rivestimenti edibili (*edible coatings*) per alimenti (Atarés et al., 2010; Baranauskiené et al., 2006; Hosseini et al., 2009; Salmieri e Lacroix, 2006; Wang et al., 2011).

1.5. Attività repellente di oli essenziali verso insetti infestanti

La salvaguardia delle derrate alimentari per lungo tempo è stata basata sull'utilizzo di molecole di sintesi ad attività insetticida come bromuro di metile e fosfina come fumiganti ma il cui impiego è stato recentemente ristretto per via degli effetti nocivi sull'ambiente (es. impoverimento dello strato d'ozono cagionato dal bromuro di metile) e dell'insorgenza dei fenomeni di resistenza in alcune specie di insetti (Shaaya et al., 1997). L'accresciuta sensibilità verso tematiche quali salute ed ecologia ha aumentato l'interesse per l'effetto biologico di prodotti naturali, come oli essenziali ed estratti di piante (Copping e Menn, 2000; Ogendo et al., 2008, Rozman et al., 2007; Tunç et al., 2000). Tali proprietà sono già conosciute da lungo tempo e non a caso alcune piante aromatiche (*Eucalyptus* e *Ocimum* spp.) vengono utilizzate tradizionalmente in paesi in via di sviluppo per la conservazione di derrate cerealicole (Obeng-Ofori et al, 1998; Santos, 2006).

Numerosi studi hanno riguardato la valutazione dell'effetto tossico e repellente di vari oli essenziali nei confronti di insetti delle derrate; due interessanti pubblicazioni (Nerio et al., 2010; Rajendran e Sriranjini, 2008) passano in rassegna le fonti vegetali, gli insetti target, le modalità d'azione di vari composti, sulla base di un'ampia letteratura dedicata. Tra gli oli essenziali, i seguenti sono stati studiati per il loro effetto tossico come fumiganti contro insetti delle derrate: origano (*Origanum* spp.), rosmarino (*Rosmarinus officinalis* L.), anice (*Pimpinella anisum* L.), cumino (*Cuminum cyminum* L.), eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis* Dehn), citronella (*Cymbopogon citrates*), lavanda (*Lavandula angustifolia*), timo (*Thymus vulgaris*), salvia (*Salvia officinalis*), menta (*Mentha piperita* L.), bergamotto (*Citrus bergamia*), finocchio (*Foeniculum vulgare*) e alloro (*Laurus nobilis*). Shaaya et al. (1997) hanno studiato gli effetti di fumigazioni effettuate con estratti di menta, salvia, origano, basilico, alloro, rosmarino, lavanda e anice contro *Oryzaephilus surinamensis*, *Rhizopertha dominica*, *Sitophilus oryzae* e *Tribolium castaneum*, riportando

come le ultime due specie si siano mostrate le più tolleranti all'esposizione ai vapori. Oli essenziali di origano, rosmarino, anice, cumino e eucalipto sono risultati efficaci contro *T. confusum* ed *Ephestia kuehniella* (Tunç et al., 2000) se utilizzati come fumiganti. Anche gli oli essenziali estratti da piante appartenenti al genere *Ocimum* (*O. basilicum* L., *O. gratissimum* L.) hanno dimostrato buoni livelli di efficacia nel controllo delle infestazioni di *S. oryzae* (L.), *T. castaneum* (Herbst), *O. surinamensis* (L.) e *R. dominica* (F.) (López et al., 2008; Ogendo et al., 2008). Sette piante aromatiche, incluse rosmarino, citronella ed eucalipto, sono risultate efficaci contro *S. zeamais* (Nerio et al., 2009); lavanda, rosmarino, timo e alloro hanno evidenziato tossicità nei confronti di *S. oryzae*, *R. dominica* e *T. castaneum*. Uno studio recente, inoltre, ha indagato l'effetto repellente di oli essenziali di piante mediterranee (alloro, bergamotto, finocchio, lavanda) contro adulti di *S. zeamais* e *Cryptolestes ferrugineus* e larve di *Tenebrio molitor* (Cosimi et al., 2009).

In Appendice viene presentata una raccolta bibliografica delle ricerche relative alle proprietà repellenti e/o tossiche di vari oli essenziali verso alcune specie di insetti ritenute più frequentemente responsabili di infestazione di prodotti alimentari.

1.6. Protezione degli alimenti confezionati dagli insetti delle derrate: il packaging come ultima frontiera

Gli insetti infestanti sono stati per lungo tempo considerati tra le cause più frequenti di perdita di prodotti alimentari. Il problema del sostentamento della popolazione mondiale è generalmente considerato in termini di necessità di aumentare le produzioni alimentari, mentre un'opportuna conservazione e salvaguardia delle derrate dalla contaminazione di insetti potrebbe di per sé rappresentare una misura per aumentare la disponibilità di alimenti.

Gli insetti possono colonizzare gli ambienti di stoccaggio in funzione delle condizioni climatiche e delle pratiche igieniche e di produzione. L'infestazione di alimenti confezionati può verificarsi a causa di processi di produzione inadeguati, non in grado di distruggere le uova degli infestanti, o per penetrazione degli insetti attraverso il materiale d'imballaggio.

I principali prodotti alimentari soggetti a infestazioni da parte di insetti sono i cereali e i loro derivati (farine, semole, paste, biscotti e snack), i legumi, prodotti caseari in polvere, frutta secca e in guscio e prodotti dolciari, tra cui la cioccolata. La presenza di insetti e dei prodotti del loro metabolismo nelle confezioni causa importanti perdite economiche, così come la riduzione delle proprietà nutrizionali, la produzione di off-flavours e l'accelerazione dei processi di decadimento qualitativo dovuta all'aumento della temperatura e dell'umidità.

Gli insetti che attaccano i prodotti confezionati possono essere classificati come "penetratori" o "invasori" (Highland, 1984): i primi, in grado di forare i materiali di imballaggio, includono *Sitophilus* spp., *Rhyzopertha dominica*, *Plodia interpunctella*, *Lasioderma serricorne* e *Stegobium paniceum*; la tignola fasciata, *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera Pyralidae), è considerata responsabile del 98% delle infestazione alimentari nel mondo (Süss and Locatelli, 2001). Dall'altro lato, gli invasori sono insetti che possono penetrare nelle confezioni solo attraverso fori già esistenti: questo è il caso di *Tribolium*

spp., *Cryptolestes ferrugineus* and *Oryzaephilus* spp. (Highland, 1991). Tale suddivisione, tuttavia, non è rigorosa, dato che in alcune condizioni gli invasori possono comportarsi da penetratori e viceversa (Bowditch, 1997; Cline, 1978a; Cline e Press, 1990).

Gli insetti infestanti possono penetrare nei prodotti confezionati durante il trasporto, lo stoccaggio in magazzini o in punti di vendita al dettaglio. Ad ogni modo, i consumatori che si imbattono in confezioni contaminate ritengono il produttore responsabile dell'inconveniente, con serie conseguenze per l'immagine dell'azienda, anche se la responsabilità è da attribuire a terzi (Hou et al., 2004).

Quasi tutti i materiali d'imballaggio possono essere perforati da insetti e il tempo di penetrazione dipende dalla specie e dallo stadio di vita, dal tipo di prodotto confezionato e da natura e spessore del materiale (Cline, 1978a; Cline, 1978b; Bowditch, 1997; Riudavets et al., 2007). E' evidente come la progettazione di imballaggi adeguati per ciascun tipo di prodotto rappresenti uno step cruciale nel mantenimento della qualità e nel prolungamento della shelf-life dei prodotti. Comunemente le infestazioni durante lo stoccaggio sono facilitate da abrasioni e/o rotture del materiale della confezione, da imperfezioni nella saldatura o da fori appositamente praticati sulle confezioni, come negli imballaggi della pasta, caratterizzati dalla presenza di numerosi piccoli fori che vengono prodotti meccanicamente per evitarne il rigonfiamento dopo la saldatura. Tali discontinuità vengono spesso sfruttate dalle specie infestanti come vie preferenziali d'ingresso alle confezioni, facilmente individuabili dai parassiti in virtù dell'attrazione esercitata dagli aromi che fuoriescono dalle confezioni.

Diversi sono stati gli studi volti alla valutazione della capacità di penetrazione degli insetti nelle confezioni alimentari (Batth, 1970; Cline, 1978a; Essig *et al*., 1943; Gerhardt e Lindgren, 1954, 1955) e della resistenza dei diversi materiali utilizzati per gli imballaggi (Sreenathan *et al*., 1960; Domenichini e Forti, 1975; Srinivasa Gopal et al., 1998). Tra questi ultimi si riporta anche uno studio

recentemente condotto presso la Facoltà di Agraria di Catania (Licciardello et al., 2010).

Anche confezioni perfettamente sigillate possono essere attaccate da insetti, a seguito dell'attrazione che le sostanze volatili, permeate attraverso il materiale d'imballaggio, esercitano verso questi organismi. L'uso di materiali ad alta barriera agli aromi è, pertanto, uno dei punti chiave nella prevenzione delle infestazioni da insetti; tuttavia, i dati relativi alla permeabilità dei materiali agli aromi sono scarsi e la scelta di materiali idonei può essere soltanto coadiuvata dalle informazioni relative alla permeabilità a gas quali ossigeno e anidride carbonica e al vapore acqueo, reperibili tra le caratteristiche tecniche dei materiali. L'utilizzo di materiali ad alta barriera, inoltre, rappresenta un costo aggiuntivo per i produttori alimentari ed è spesso collegato all'impiego di film più spessi, con un aumento conseguente delle quantità di plastiche utilizzate, aspetto che contrasta fortemente con le attuali tendenze alla riduzione dei volumi di imballaggi impiegati dal settore alimentare.

Le misure in grado di contrastare la penetrazione di specie infestanti nelle confezioni alimentari sono essenzialmente riconducibili all'adozione di materiali e spessori adeguati e all'uso di sostanze insetticide e/o repellenti contenute negli adesivi utilizzati per la laminazione di film multistrato o nella matrice plastica stessa.

Il packaging, pertanto, rappresenta un elemento cruciale per il mantenimento della qualità dei prodotti confezionati e l'ultima barriera difensiva a disposizione dei produttori contro gli insetti infestanti: questa considerazione, sebbene sia stata avanzata già molto tempo fa (Mullen, 1995), non ha ricevuto, ad oggi, il dovuto interesse da parte dei settori dell'industria e della ricerca alimentare. Molto limitata è la letteratura in tema di progettazione di sistemi di imballaggio a prova di insetto contenenti sostanze repellenti per la protezione delle confezioni dall'attacco di insetti; tra questi alcuni hanno riguardato l'impiego di insetticidi di sintesi come DEET e Neem, mentre solamente un lavoro ha considerato sostanze di origine naturale come estratto di piselli e acido propionico (Hou et

al., 2004; Germinara et al., 2010). Una ricerca bibliografica approfondita sullo sviluppo di packaging a prova di insetto ha restituito solamente i due articoli appena menzionati, un capitolo di un libro dedicato all'imballaggio attivo (Navarro et al., 2007) e un brevetto americano (Radwan and Allin, 1997) che riguarda l'utilizzo di metilsalicilato in imballaggi alimentari per controllare gli insetti infestanti.

2. VALUTAZIONE DELLA REPELLENZA DI OLI ESSENZIALI VERSO INSETTI DELLE DERRATE

2.1. SCOPO DEL LAVORO

L'attenzione crescente rivolta dall'opinione pubblica e dalle istituzioni verso la salute e il rischio chimico in generale sta portando la ricerca ad approfondire sempre più l'utilizzo di sostanze alternative a quelle di sintesi per la protezione degli alimenti. Sono diversi gli studi disponibili in letteratura che hanno valutato l'effetto tossico di sostanze di origine naturale verso insetti infestanti. Il sistema più diffuso per queste indagini consiste in prove di preferenza in cui un numero determinato di insetti viene collocato in un sistema contenente della carta da filtro impregnata della sostanza in esame e della carta non trattata utilizzata come controllo. Questo sistema semplificato intende valutare esclusivamente il comportamento di insetti in un sistema non reale, pertanto può rappresentare uno screening preliminare per valutare l'efficacia repellente di sostanze il cui effetto verso le specie target non è ancora noto.

2.2. MATERIALI E METODI

Un saggio di preferenza (Ogendo et al., 2003; Nerio et al., 2009) è stato impiegato per valutare l'effetto repellente di quattro oli essenziali, basilico, citronella, origano e rosmarino, verso *Tribolium castaneum*, una delle specie infestanti più diffuse su prodotti cerealicoli trasformati. Huang et al., (1997, 2000) e Rozman et al. (2007) hanno dimostrato che questa specie è meno sensibile ad alcuni oli essenziali rispetto a *Sitophilus* spp. Dischetti di carta da filtro del diametro di 11 cm sono stati divisi a metà, una parte è stata trattata con 0.5 mL di opportune diluizioni in acetone degli oli essenziali mentre le altre metà

sono state trattate con 0.5 mL di solo acetone (controllo) (**figura 1**). I dischi, dopo aver lasciato evaporare il solvente per 5 minuti sotto cappa, sono stati ricostituiti affiancando una metà trattata e una di controllo e sono stati posti in piastre Petri di vetro (diametro 11 cm). Dieci individui adulti di *T. castaneum*, senza distinzione di età o sesso, sono stati posti al centro di ciascuna piastra (**figura 2**). Sono stati condotti due test di repellenza (di seguito denominati test#1 e test#2), per ciascuno dei quali sono state saggiate 2-3 concentrazioni di OE. Nel test#1 si è operato con le concentrazioni di 1000 e 100 μL/L, corrispondenti a 0.01 e 0.001 μL/cm^2 di carta da filtro, mentre nel test#2 le concentrazioni impiegate sono state 2000, 1000 e 500 μL/L, pari a 0.02, 0.01 e 0.005 μL/cm^2, rispettivamente. Per ciascuna prova sono state condotte 4 repliche, i risultati mostrati per ciascun test coincidono, pertanto, con le medie di 4 conte. Ogni 15 minuti sono state effettuate le conte del numero di individui presenti sulle due parti delle piastre e i risultati sono stati espressi come percentuale di repellenza:

$$\mathbf{R\ \% = (C-T)/C+T)\times 100}$$

Dove:

C= numero di insetti sull'area non trattata (controllo);

T= numero di insetti sull'area trattata.

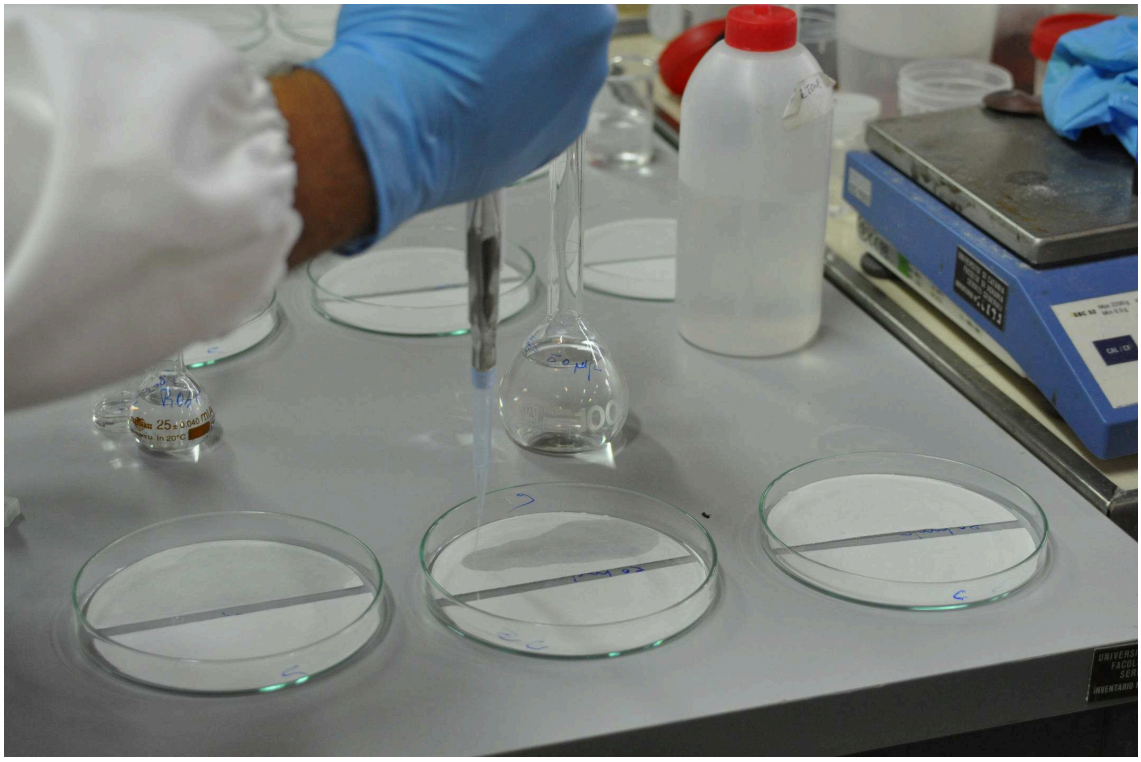


Figura 1. Preparazione delle piastre per i saggi di preferenza.

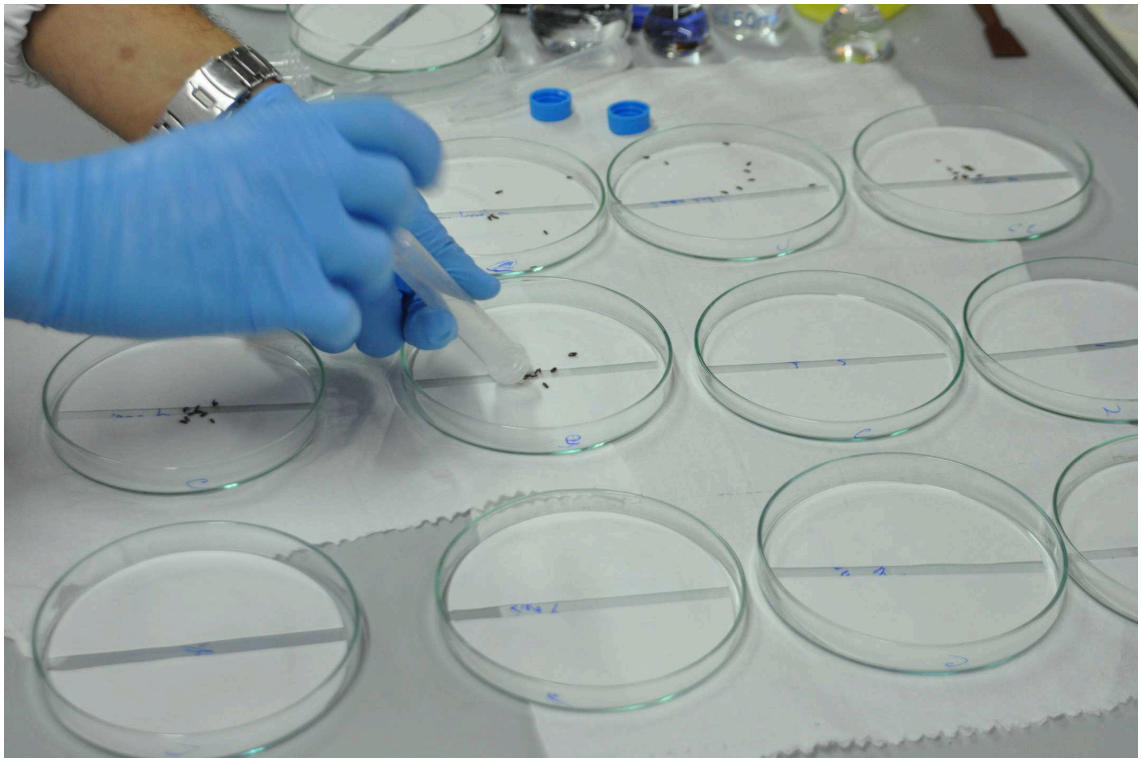


Figura 2. Disposizione degli insetti sulle piastre ricoperte con la carta da filtro trattata per metà con soluzioni di olio essenziale, per metà con acetone (controllo).

2.3. RISULTATI

Un primo test (test#1) (**figure 5a-5d**) condotto utilizzando due concentrazioni di oli essenziali, 0.01 e 0.001 μL/cm^2, ha evidenziato un chiaro effetto della concentrazione sulla risposta degli insetti, in particolare per basilico e citronella. Per questi due oli essenziali i valori di repellenza % raggiungono il 90 e 100% dopo 30 min-1 h dall'inizio della prova condotta con la concentrazione 0.01 μL/cm^2, mentre non superano il 50% nella prova alla concentrazione di 0.001 μL/cm^2. Da notare, inoltre, come la % di Repellenza si abbassi sensibilmente dopo 3 h dall'inizio dei saggi: tale risultato, probabilmente imputabile alla perdita per evaporazione dell'olio essenziale dalla carta da filtro, è più marcato per l'olio essenziale di citronella a entrambe le concentrazioni, mentre per il basilico si registrano valori costanti durante la prova a 0.01 μL/cm^2, e valori altalenanti e di difficile interpretazione alla concentrazione più bassa. La repellenza % per l'olio essenziale di origano è solo leggermente inferiore nel test a 0.001 μL/cm^2, mentre l'effetto di concentrazione è confermato per l'olio essenziale di rosmarino, per il quale è interessante notare come alla concentrazione inferiore gli insetti sembrino addirittura attratti dall'olio essenziale. Con il passare del tempo della prova e con l'evaporazione dell'olio essenziale, infatti, la % di insetti attratti dall'olio aumenta, e questo sembra avvalorare l'ipotesi che l'effetto attrattivo sia più spinto alle basse concentrazioni.

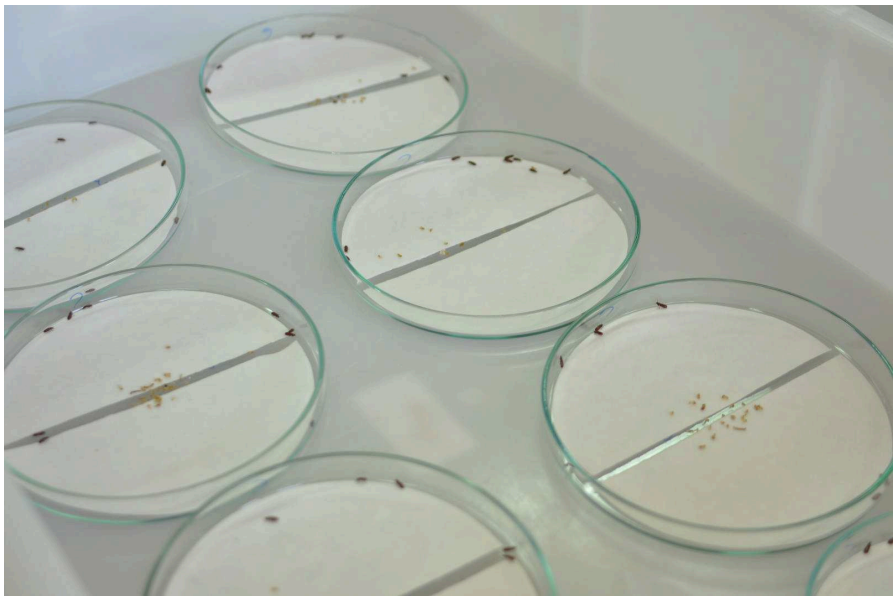


Figura 3. Prove di repellenza in corso.

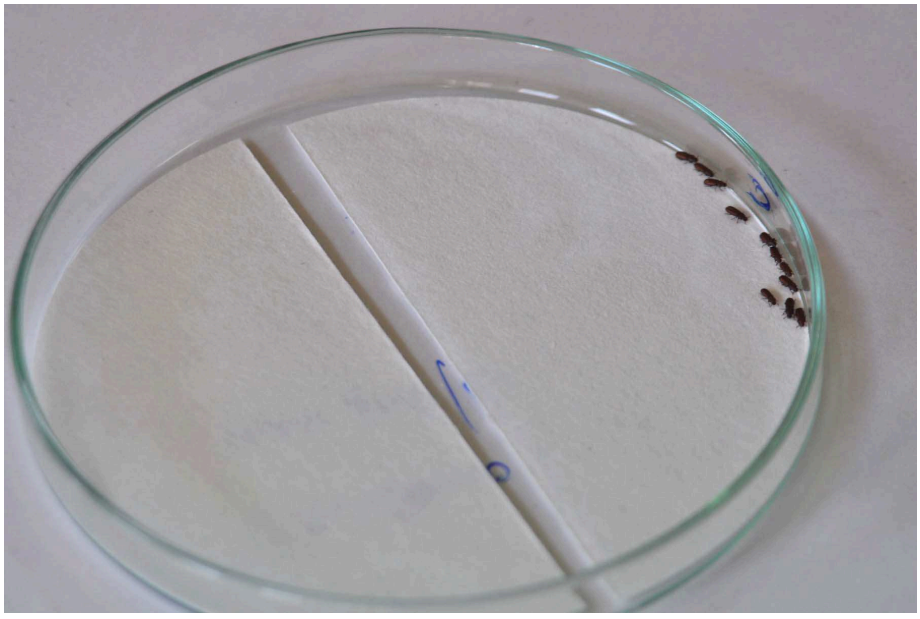


Figura 4. Dettaglio di una piastra durante la prova di valutazione di repellenza. Notare come in questo caso tutti e 10 gli insetti si dispongano sulla metà di disco corrispondente al controllo non trattato con olio essenziale.

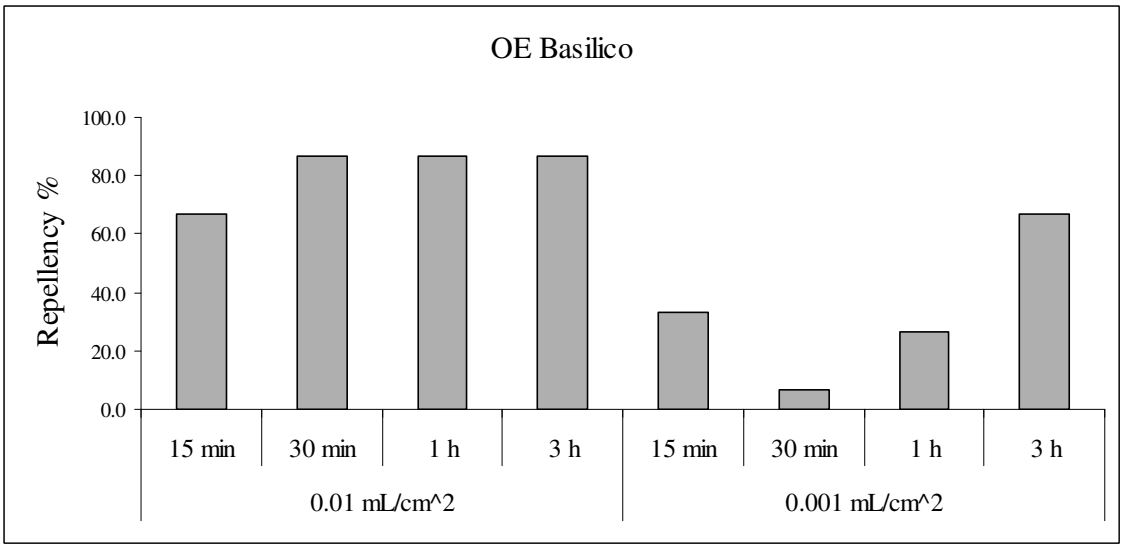


Figura 5a. Effetto repellente, rappresentato come repellenza %, dell'olio essenziale di basilico, test#1.

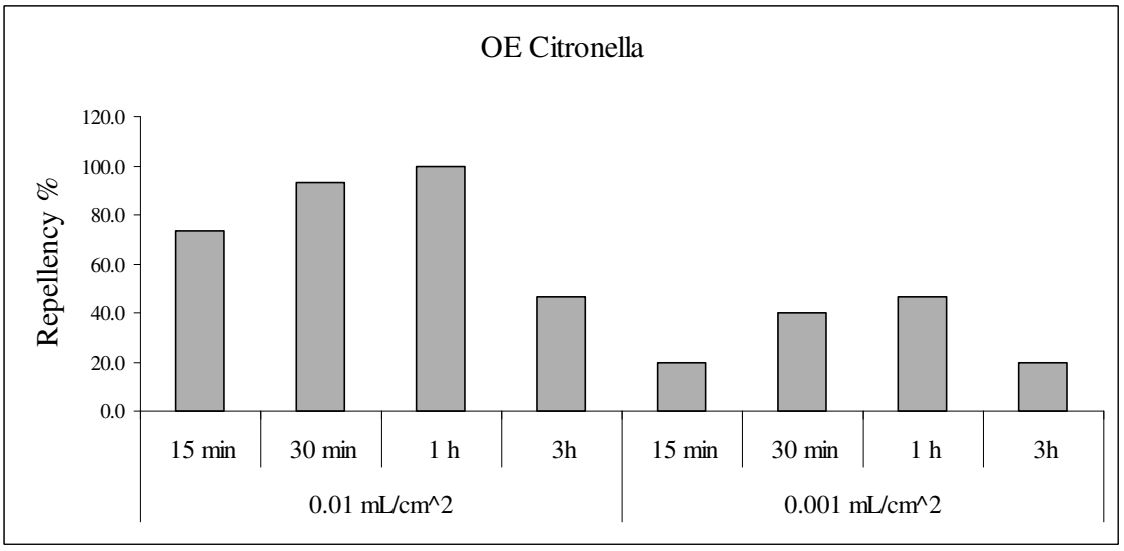


Figura 5b. Effetto repellente, rappresentato come repellenza %, dell'olio essenziale di citronella, test#1.

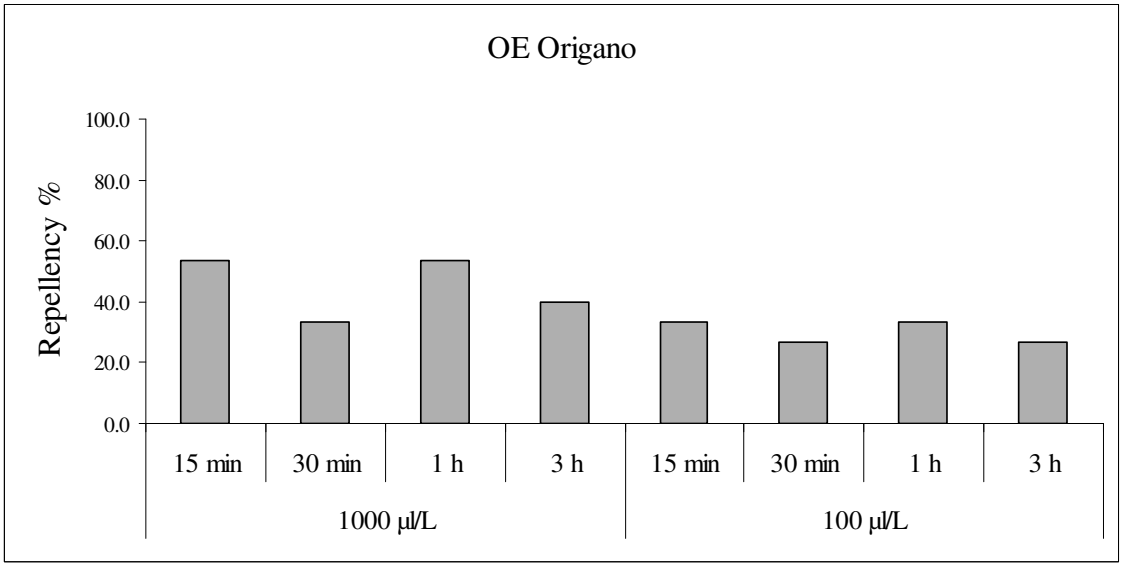


Figura 5c. Effetto repellente, rappresentato come repellenza %, dell'olio essenziale di origano, test#1.

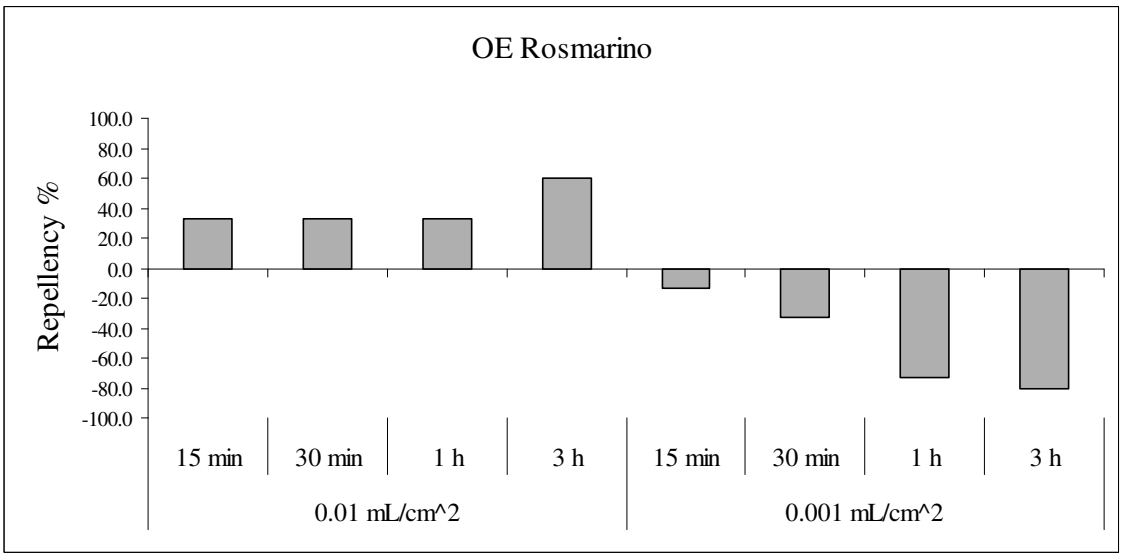


Figura 5d. Effetto repellente, rappresentato come repellenza %, dell'olio essenziale di rosmarino, test#1.

Nel secondo set di prove (test#2) (**figure 6a-6d**) sono state saggiate tre concentrazioni: 2000, 1000 e 500 μL/L, pari a 0.02, 0.01 e 0.005 μL/cm^2; si è scelto di escludere la concentrazione 100 μL/L in quanto i risultati precedenti non erano soddisfacenti, e di inserire una concentrazione maggiore per verificare l'effetto della concentrazione sulla repellenza.

Per l'olio essenziale di citronella non è stato possibile osservare un effetto della concentrazione al disopra di 0.01 μL/cm^2. Un chiaro effetto di concentrazione è osservabile per gli oli essenziali di basilico e rosmarino; per il primo la % di repellenza cresce fino a 1 h, per poi diminuire fino alle 3 ore del saggio, probabilmente per via dell'evaporazione dei componenti dalla carta da filtro. Stessa considerazione vale anche per l'olio di rosmarino, per cui si registra una repellenza fino al 100% alla concentrazione di 0.02 μL/cm^2 dopo 1 h, e valori progressivamente più bassi alle altre concentrazioni. I profili di repellenza per basilico e rosmarino alle concentrazioni più elevate sono risultati simili, con un aumento del valore di repellenza durante le prime osservazioni, e un crollo di tale valore dopo le 3 h della prova. Per l'olio essenziale di origano, infine, si sono osservati alti valori di repellenza solamente alla più alta concentrazione ed entro la prima ora del saggio di preferenza.

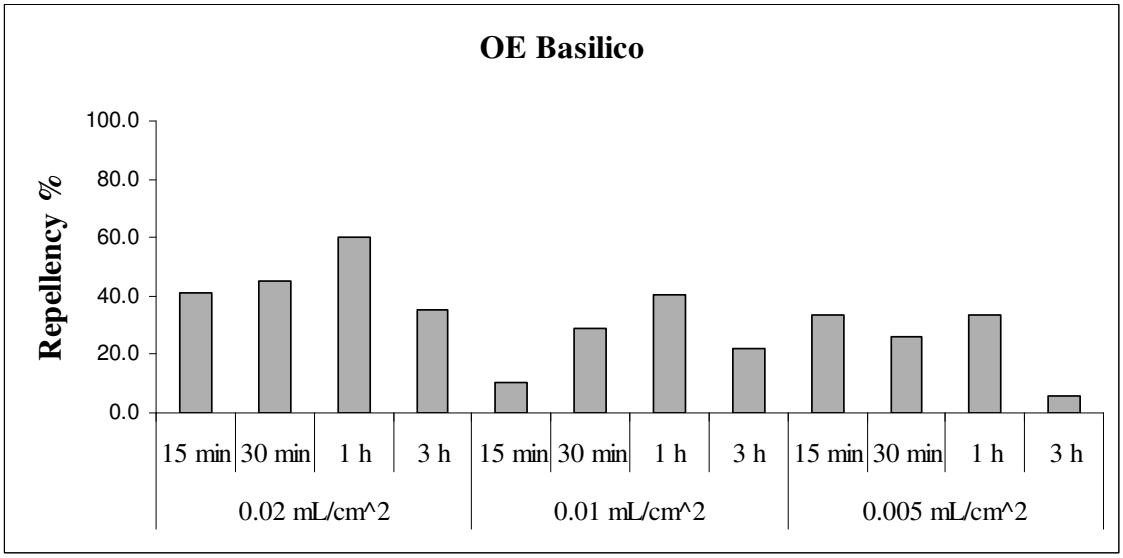


Figura 6a. Effetto repellente, rappresentato come repellenza %, dell'olio essenziale di basilico, test#2.

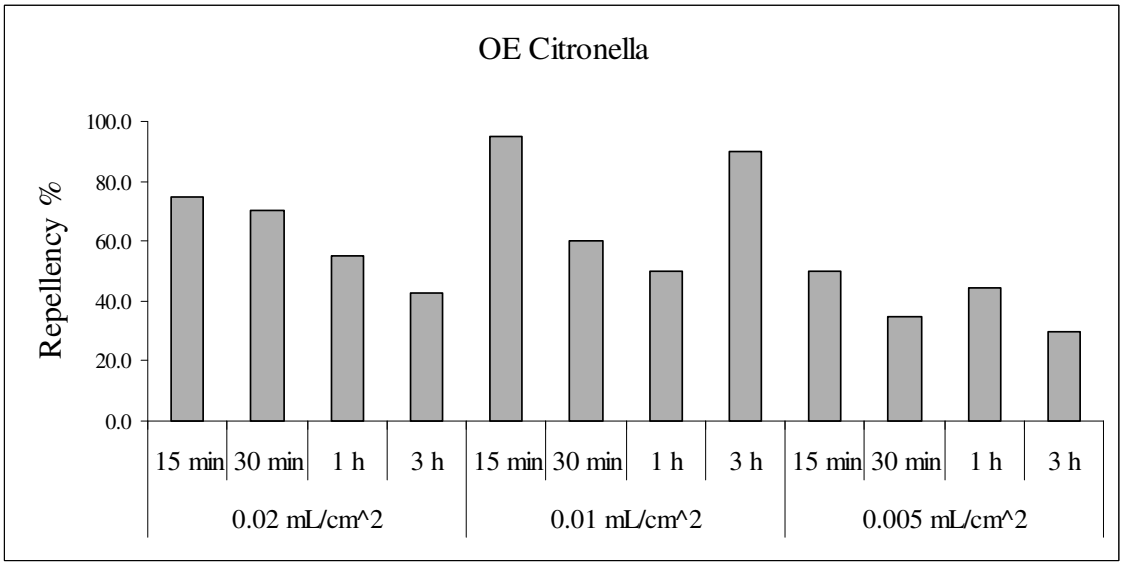


Figura 6b. Effetto repellente, rappresentato come repellenza %, dell'olio essenziale di citronella, test#2.

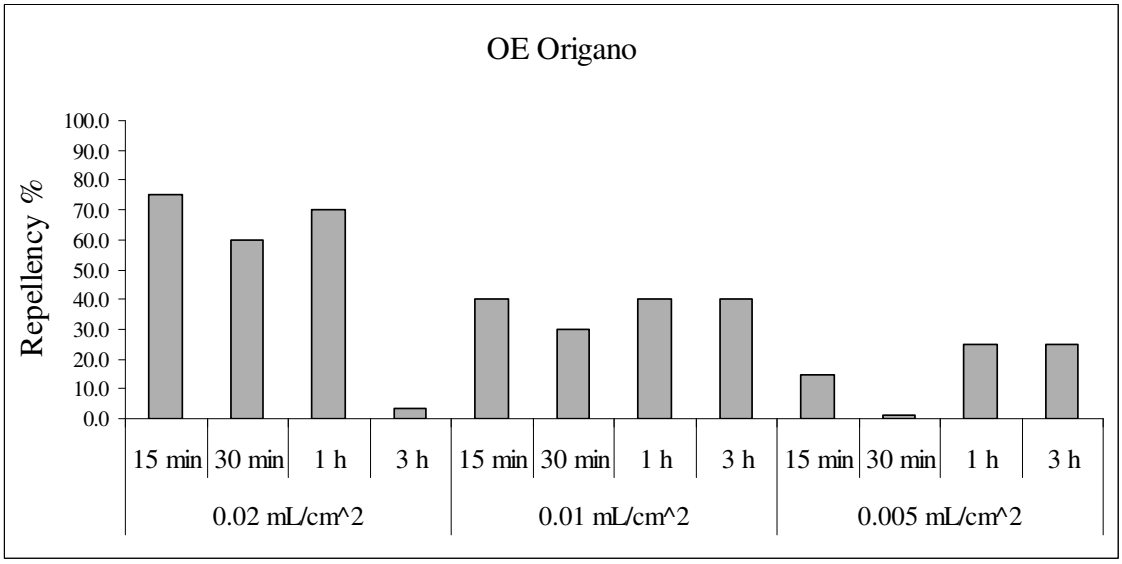


Figura 6c. Effetto repellente, rappresentato come repellenza %, dell'olio essenziale di origano, test#2.

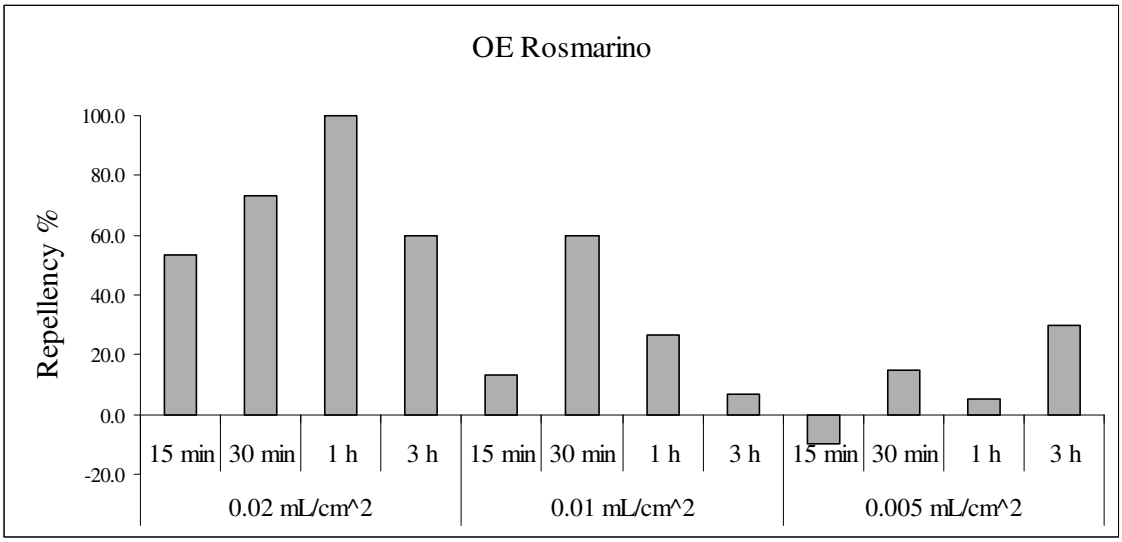


Figura 6d. Effetto repellente, rappresentato come repellenza %, dell'olio essenziale di rosmarino, test#2.

I risultati relativi alle due prove in piastra suggeriscono una discreta efficacia repellente di tutti a quattro gli oli essenziali testati alle concentrazioni di 2000 e 1000 μL/L entro la prima ora della durata dei test. Dopo 1 h si verifica una perdita di efficacia repellente, che può essere imputata all'evaporazione degli oli essenziali, da una parte, e/o all'adattamento da parte degli insetti. Concentrazioni di 500 μL/L non forniscono risultati di repellenza altrettanto significativi, mentre concentrazioni ancora più basse (100 μL/L) si rivelano perlopiù inefficaci se non addirittura attrattive (è il caso dell'olio di rosmarino) verso *Tribolium castaneum*.

E' anche da osservare, purtroppo, come le prove siano poco ripetibili e non ci sia buona corrispondenza tra test#1 e test#2. Nonostante si sia cercato di ottimizzare i saggi al fine di ridurre le fonti di variabilità legate al sistema di screening, sembra esistere una variabilità intrinseca legata probabilmente al comportamento degli insetti, che non è stato possibile escludere e che, pertanto, pregiudica l'attendibilità dei risultati mostrati. Altri lavori relativi allo studio dell'efficacia repellente di oli essenziali che utilizzano lo stesso metodo di screening non valutano la ripetibilità del metodo in prove condotte in momenti diversi. Islam et al. (2009) hanno ottenuto valori di repellenza % compresi tra 74 e 100 per l'olio essenziale di coriandolo verso *T. castaneum*, con valori di errore standard molto bassi (2.00-2.75). Zapata e Smagghe (2010) hanno osservato valori di repellenza % da parte di oli essenziali di *Laurelia sempervirens* (0.001–0.032 μL/cm^2) e *Drymis winteri* (0.02–0.20 μl/cm^2) verso *T. castaneum* comprese tra 36% e 100% in funzione alla concentrazione e al tempo di osservazione, evidenziando valori superiori dopo 4 h rispetto a 2 h, e deviazioni standard dalle medie non superiori al 24%.

Dai risultati mostrati e dalle osservazioni condotte durante i saggi è possibile concludere che il metodo di screening dell'attività repellente utilizzato non fornisce risultati attendibili e di facile interpretazione per via di fenomeni che non siamo stati in grado di spiegare, ma solamente di ipotizzare. I risultati ottenuti, comunque, forniscono delle indicazioni qualitative inequivocabili circa l'effetto repellente degli oli essenziali studiati.

3. STUDIO DELL'EFFICIACIA DI UN INNOVATIVO SISTEMA DI ACTIVE PACKAGING CON FUNZIONE REPELLENTE VERSO INSETTI DELLE DERRATE

3.1. SCOPO DEL LAVORO

Non sempre i test in vitro, o condotti utilizzando sistemi modello e semplificati, forniscono risposte e indicazioni trasferibili a sistemi reali, pertanto la loro efficacia dovrebbe essere testata a confronto con sistemi quanto più reali possibile. I saggi di repellenza in piastra, molto diffusi per la valutazione dell'efficacia repellente e/o tossica di sostanze naturali verso insetti infestanti, condotti durante la prima fase del lavoro di tesi hanno prodotto risultati positivi, seppur caratterizzati da scarsa riproducibilità e da elevata variabilità. Si è, pertanto, voluto saggiare l'efficacia repellente di confezioni realizzate con prototipi di materiale plastico rivestito con una resina contenente gli oli essenziali oggetto di studio, al fine di ottenere delle indicazioni più attendibili e facilmente trasferibili.

3.2. MATERIALI E METODI

Fogli di polipropilene (PP), rivestito con una lacca organica tal quale (*controllo*) e con la lacca contenente oli essenziali (*test*) di citronella, origano e rosmarino (4% w/w) sono stati forniti dalla ditta ARTIBAL (Sabiñanigo, Spagna), titolare di un brevetto europeo (European Patent EP1657181). Sacchetti delle dimensioni 52.5 x 74.25 cm sono stati ottenuti con tre saldature, una delle quali è stata realizzata dopo riempimento con 25 g di semola di grano duro.

Per i test di preferenza, un sacchetto realizzato di materiale *controllo* e uno di materiale *test* sono stati posti in scatole rettangolari in polietilene (20 × 10 × 7

cm), ciascuno a una estremità, e 20 adulti di *Tribolium castaneum*, tenuti in affamamento per 24 ore, sono stati collocati al centro della scatola, che è stata quindi chiusa con coperchio. Parallelamente è stata condotta anche una prova di controllo, ponendo nelle scatole due sacchetti contenenti semola realizzati con PP *controllo*. Ciascun test è stato condotto in triplo.

Le osservazioni sono state effettuate dopo 2, 24 e 48 ore, rilevando il numero di insetti presenti sul controllo e sul test, e calcolando la percentuale di repellenza come fatto per le prove in piastra.

3.3. RISULTATI

Già dopo 2 ore dall'inizio delle prove, gli insetti vengono ritrovati raggruppati vicino ai sacchetti realizzati con il film controllo, con l'eccezione di pochi esemplari. La **figura 7** mostra le percentuali di repellenza, dopo 2, 24 e 48 ore, di confezioni di semola realizzate con i materiali contenenti gli oli essenziali. I valori non variano sensibilmente durante la prova per origano e citronella, mentre per rosmarino risultano leggermente superiori dopo 24 e 48 ore. Si è osservato che gli insetti si dispongono preferibilmente al disotto dei sacchetti e in corrispondenza delle zone di saldatura, ma non si sono osservati, durante il monitoraggio, tentativi di penetrazione nelle confezioni. *T. castaneum* è considerato un invasore più che un penetratore, tuttavia è possibile che aumentando il periodo di affamamento si sarebbe potuto osservare anche qualche tentativo di perforazione dell'imballaggio. I dati di repellenza relativi alla prova controllo, come atteso, sono prossimi allo zero, in quanto gli insetti tendono a disporsi in maniera casuale verso una piuttosto che l'altra confezione di semola contenuta nella scatola. Il fatto che gli istogrammi relativi al controllo siano rivolti tutti verso il basso è da considerarsi puramente casuale, in quanto nelle prove di controllo i lati *test* e *controllo* sono stati scelti arbitrariamente, essendo esattamente uguali.

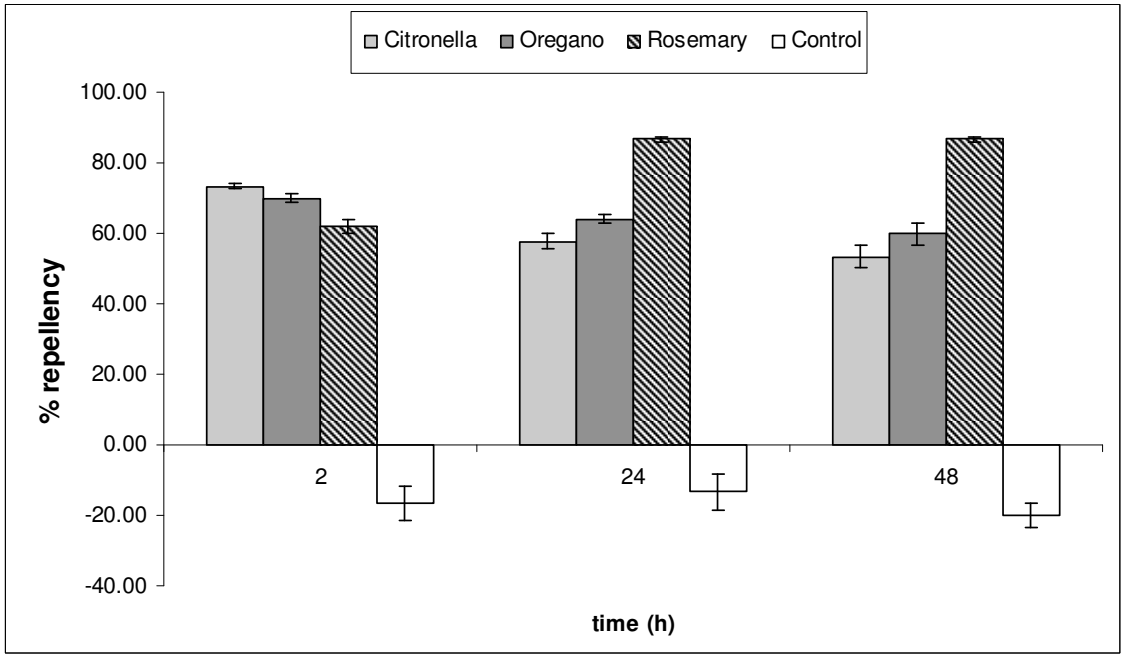


Figura 7. Repellenza di confezioni di semola realizzate con PP trattato con oli essenziali verso *Tribolium castaneum*, in un test di preferenza condotto utilizzando 20 insetti adulti.

Risulta interessante il confronto con le prove di repellenza in piastra, che avevano fornito risultati positivi ma contrassegnati da alta variabilità e da scarsa riproducibilità. L'utilizzo di sacchetti in materiale trattato piuttosto che le prove su carta da filtro, risulta più idoneo per la valutazione dell'efficacia di materiali d'imballaggio repellenti, fornendo risultati più solidi e ripetibili, come dimostrato anche dalle basse deviazioni standard. Percentuali di repellenza comprese tra il 53 e l'87% sono da ritenersi un risultato molto promettente, che apre lo scenario verso l'impiego di questi sistemi d'imballaggio per la riduzione dell'incidenza di attacchi da parte di insetti infestanti gli alimenti confezionati, e verso la valutazione di altri oli essenziali come potenziali agenti repellenti da impiegarsi negli imballaggi.

4. STUDIO DELLE PROPRIETÀ DIFFUSIONALI DI OLI ESSENZIALI IN MATERIALI PLASTICI

4.1. SCOPO DEL LAVORO

Pochissimi studi hanno riguardato la diffusione dei componenti di oli essenziali in film plastici. La carenza di dati di diffusione è un forte limite per la progettazione e ottimizzazione di *active packaging*, mentre nuove informazioni e in particolare la stima dei coefficienti di diffusione gioverebbe nella predizione delle quantità di sostanze volatili diffuse verso entrambi i lati delle confezioni, ossia di quelle frazioni migrate verso l'interno delle confezioni e di quelle perse nell'ambiente circostante. Dalla diffusione dipendono, dunque, l'interazione con l'alimento confezionato e la shelf life dello stesso film attivo.

I coefficienti di diffusione (Dp) e di ripartizione (P) di diversi composti chimici sono richiesti per implementare modelli matematici utilizzati per la previsione della migrazione. Vari studi sono stati condotti su questo argomento, ma la maggior parte di questi calcolano i valori di Dp e P di componenti degli adesivi in polietilene a bassa densità (Canellas et al., 2010; Aznar et al., 2011; Vera et al 2011). Negli ultimi dieci anni sono stati pubblicati vari articoli scientifici relativi all'incorporazione di oli essenziali o di alcuni loro componenti in materiali plastici per la produzione di *active packaging*. L'obiettivo principale di questi materiali attivi è quello di proteggere gli alimenti dai processi di ossidazione o da contaminazioni microbiche, in virtù delle proprietà antiossidanti e/o antimicrobiche degli oli essenziali e dei loro singoli componenti. Anche se le cinetiche di rilascio di tali sostanze agli alimenti confezionati sono state studiate in alcuni casi, non esistono dati sulla diffusione attraverso diversi materiali d'imballaggio. Come precedentemente accennato, la conoscenza dei comportamenti diffusivi è un passo fondamentale verso la comprensione delle performance e la corretta progettazione dei nuovi sistemi di imballaggio attivo.

4.2. MATERIALI E METODI

4.2.1. Preparazione dei film attivi

Una lacca a base organica contenente oli essenziali di basilico, citronella, origano e rosmarino (SAS Matières Premières Essentielles, Grasse Cedex, France) a una concentrazione del 4% (w/w), prodotto secondo un brevetto europeo (European Patent EP1657181) dalla ditta Artibal (Sabiñánigo, Spagna) è stata uniformemente distribuita su un film di polipropilene (PP) con trattamento corona, per mezzo di una macchina K101 Control Coater (RK Print-Coat Instruments Ltd., Litlington, UK). I film sono stati essiccati con aria forzata a 50°C. La quantità media di lacca applicata è stata di 0.182 mg/cm^2.

4.2.2. Prove di diffusione

Dieci centimetri quadri di film sono stati ritagliati dal centro di un foglio A4 di PP rivestito con la lacca contenente ciascun olio essenziale, e sono stati posti in contatto con una pila di 9 quadrati di PP vergine (Moisan test). Il lato rivestito è stato opposto alla pila di PP vergine. I film sono stati racchiusi tra due piastre di acciaio sotto pressione di 6 Nm, e lasciati in contatto per 6 giorni a 40°C (**Figura 8**).

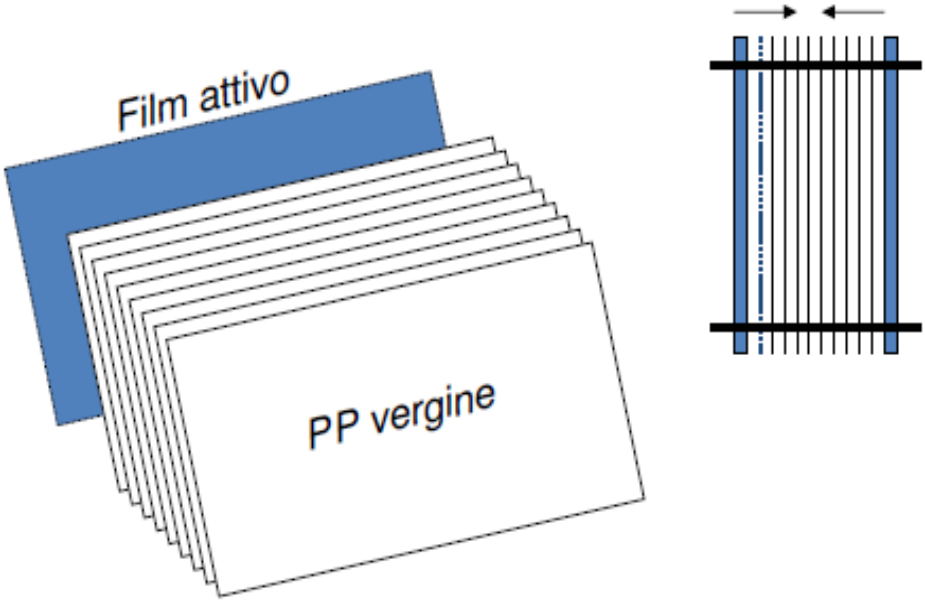


Figura 8. Rappresentazione schematica del sistema utilizzato per la valutazione della diffusione degli oli essenziali in polipropilene (PP).

Quindi i film sono stati rimossi e campioni di 6.25 o 12.5 cm^2, per il foglio rivestito e per quelli vergini, rispettivamente, sono stati ritagliati dal centro di ciascuna pellicola e utilizzati per l'analisi SPME-GC. Questa procedura è stata utilizzata in uno studio precedente sulla diffusione di componenti di adesivi attraverso differenti materiali (Canellas et al., 2010).

4.2.3. Analisi MHS-SPME-GC *dei componenti degli oli essenziali*

L'analisi SPME è stata condotta mediante una fibra PDMS (polidimetilsilossano) (100 μm), che in un precedente lavoro (López et al., 2006) si è mostrata in grado di fornire i profili più completi per gli oli essenziali di basilico, rosmarino e citronella. I campioni di film sono stati posti in incubazione in vials per SPME da 20 mL per 30 minuti a 80°C e sono stati estratti per 30 minuti a 80°C. I tempi e le temperature di preincubazione e di estrazione sono risultati da esperimenti preliminari che hanno considerato temperature di estrazione e incubazione comprese tra 60 e 80°C, e tempi di estrazione compresi tra 15 e 35 minuti.

Studi pregressi sull'analisi di composti volatili in film plastici indicano che la volatilizzazione di molecole intrappolate nella matrice polimerica richiede temperature più alte di quelle normalmente impiegate nell'analisi SPME di campioni liquidi (Ezquerro et al., 2003; Licciardello et al., 2009).

La tecnica MHS-SPME implica un certo numero di estrazioni dallo stesso campione. La concentrazione dell'analita decresce esponenzialmente con il numero di estrazioni, e l'area totale del picco può essere calcolata come la somma delle aree relative a ciascuna singola estrazione. In sintesi, l'area totale può essere calcolata dall' equazione di Ezquerro et al. (2003):

$$A_T = \sum_{i-1}^{N} A_i = \frac{A_1}{1-\beta} \quad \text{[Eq. 1]}$$

In cui:

A_T è l'area totale del picco relativa alle estrazioni multiple;

A_i è l'area del picco cromatografico relativo alla i-esima estrazione;

A_1 è l'area del picco relativo alla prima estrazione;

β è una costante ed N è il numero totale di estrazioni.

La costante β può essere calcolata dalla pendenza della retta ottenuta mettendo in grafico ln A*i* contro (*i*-1) a partire da 3-4 determinazioni HS-SPME-GC.

Si ottiene la seguente equazione di una retta:

$$\ln A_i = (i-1)\ln\beta + \ln A_1 \quad \text{[Eq. 2]}$$

La separazione cromatografica è stata condotta secondo il metodo messo a punto da Rodriguez et al. (2007). Le analisi GC-MS sono state condotte utilizzato un GC Agilent 6890N fornito di rivelatore di massa 5975B e di una colonna capillare HP-5 MS (30m×0.25 mm, 0.25 μm film thickness) 5% phenyl-methylsiloxane.

Il programma di temperature è stato il seguente: temperatura iniziale 40°C per 2 min, innalzata di 10°C/min fino a 300°C, quindi stop a 300°C per 2 min.

Il desorbimento della fibra è stato realizzato nell'iniettore del GC settato a 270°C in modalità splitless, con temperatura di transfer line di 280°C. Il gas di trasporto è stato elio al 99.999% di purezza, fornito da Carburos Metalicos (Barcellona, Spagna). I campioni sono stati analizzati per mezzo di un autocampionatore Combi-Pal, in grado di garantire riproducibilità e precisione.

La quantificazione dei componenti degli oli essenziali è stata realizzata per calibrazione esterna con opportune diluizioni di standard commerciali puri nella stessa lacca utilizzata per includere gli oli essenziali, e "dopando" dei campioni di PP vergine con opportune quantità (nell'ordine dei microlitri) delle soluzioni. I film dopati, delle stesse dimensioni di campioni sottoposti ad analisi, sono stati analizzati come precedentemente descritto.

4.2.4. Modello matematico per il calcolo dei coefficienti di diffusione e ripartizione dei componenti degli oli essenziali in matrice plastica

Il trasporto di massa (diffusione) determinato dall'esistenza di un gradiente di concentrazione (potenziale chimico) nel sistema di fogli descritto precedentemente può essere quantificato risolvendo la 2ª equazione di Fick. Assumendo che la diffusione dei componenti degli oli essenziali dal film "attivo" nella pila di film vergini sia un processo uni-dimensionale, è possibile scrivere:

$$\frac{\partial C_k}{\partial t} = D_k \frac{\partial^2 C_k}{\partial x^2} \quad \text{[Eq. 3]}$$

in cui:

k= numero dello strato, *k=1, 10*

C_k = concentrazione di migrante nello strato *k* (µg/cm³ o µg/g)

D_k - coefficiente di diffusione del migrante nello strato *k* (cm²/s)

t=- momento del processo di diffusione (s)

x=- distanza dalla fonte del migrante (cm)

Nelle prove di diffusione condotte in questa ricerca, lo strato *k=1* corrisponde al film di PP laccato, mentre gli strati *k=2,10* sono i nove film di PP vergine. La risoluzione dell'equazione 3 è stata effettuata secondo la procedura descritta da Tosa et al. (2008). Tale elaborazione è stata utilizzata per processare i dati sperimentali relativi alle concentrazioni dei componenti degli oli essenziali, ottenuti per mezzo dei saggi di diffusione e dell'analisi MHS-SPME-GC. Alcuni aspetti peculiari della procedura sperimentale sono stati tenuti in considerazione nella risoluzione dell'equazione 3.

Innanzitutto, è stato ipotizzato che durante le prove di diffusione una piccola quantità di olio essenziale venga persa per evaporazione nell'ambiente dal sistema di 10 fogli di PP. Questo implica che alla fine dei saggi di diffusione la massa totale dei composti aromatici nel sistema sia inferiore a quella misurata nel film rivestito prima del contatto con il PP vergine. Questo processo è stato considerato nella risoluzione dell'equazione 3.

In secondo luogo, è stata considerata la particolare ripartizione degli oli essenziali all'interfaccia tra gli strati di PP. Il metodo di risoluzione dell'equazione 3 messo a punto da Tosa et al. (2008) su sistemi multistrato costituiti da materiali differenti considera che la velocità del processo di diffusione all'interfaccia tra due diversi strati possa essere influenzato da un effetto di ripartizione. In questi test di diffusione tutti e 10 i film sono dello stesso tipo di materiale (PP), il che normalmente implicherebbe una ripartizione pari a 1 per tutte le interfacce. Tuttavia, le concentrazioni di sostanze diffondenti relativamente alte nel foglio laccato determinano una certa influenza sulle proprietà dello stesso strato, come già osservato in un altro recente studio (Sailard e Mercea, 2010). Pertanto, all'interfaccia tra il film attivo e quello vergine il coefficiente di ripartizione è diverso da 1. I profili di concentrazione calcolati nel sistema di film vergini (k= 2,10) mostra, pertanto, un "salto" in corrispondenza dell'interfaccia con il film rivestito. Senza considerare questi effetti nella risoluzione dell'equazione 3, il *fit* tra dati sperimentali e calcolati non sarebbe possibile.

Per ottenere il *fit* viene prima condotta una stima dei profili di concentrazione utilizzando un set di valori iniziali per la quantità m_e corrispondente alla massa di componenti persi nell'ambiente, per i coefficienti D*p e Dp e Kp*p, rispettivamente, coefficienti di diffusione nel PP laccato e nel PP vergine, e coefficiente di ripartizione tra PP laccato e PP vergine. Il valore di m_e viene calcolato dalla differenza tra la massa totale di olio essenziali nel film di PP laccato prima dell'inizio della prova di diffusione, e la somma delle concentrazioni nei 10 film alla fine del test. Successivamente viene calcolato il

valore approssimativo di Kp*p dal rapporto tra la concentrazione di olio essenziale nei film 1 e 2 alla fine della prova di diffusione. Infine vengono stimati i coefficienti di diffusione D*p e Dp sulla base di dati pubblicati da Mercea (2000). In una seconda fase questi valori iniziali vengono ottimizzati fino a ottenere il *best fit* (minima deviazione della curva dai dati sperimentali) tra i dati calcolati e i valori sperimentali.

4.3. RISULTATI

4.3.1. Ottimizzazione dei parametri MHS-SPME

Le temperature e i tempi di incubazione ed estrazione dei campioni sono stati selezionati da un range limitato, sulla base di un lavoro precedente sullo studio delle cinetiche di assorbimento di componenti volatili del vino da parte di materiali plastici (Licciardello et al., 2009). Sono state scelte le seguenti condizioni analitiche che hanno permesso il maggior arricchimento della fibra PDMS.

Incubazione del campione: 30 minuti a 80°C;

Estrazione del campione: 30 minuti a 80°C.

In una seconda fase è stata ottimizzata la quantità di film plastico da analizzare. Questo step è fondamentale per il successo della tecnica di estrazione multipla, dato che una quantità eccessiva di campione (e dunque di analita), così come una quantità troppo bassa, risulterebbe in un andamento non esponenziale della diminuzione dell'area dei picchi con il numero di estrazione, condizione, questa, essenziale per l'applicazione della teoria MHS-SPME (Ezquerro et al,. 2003). La dimensione ottimale di campione è stata scelta, pertanto, sulla base della linearità dei grafici ln Ai contro (i-1) e dei rispettivi coefficienti di correlazione.

Le Figure 9a e 9b mostrano due esempi di cromatogrammi sovrapposti, corrispondenti a serie sequenziali di analisi dello spazio di testa dello stesso campione: come è possibile osservare, la quantità dell'analita diminuisce in maniera esponenziale nelle estrazioni successive. La **figura 10** mostra un esempio della relazione ottenuta tra ln Ai e (i-1). Una volta verificata la linearità di questa relazione, la tecnica MHS-SPME permette di calcolare la costante β dalla pendenza della retta ottenuta e quindi di stimare accuratamente l'area totale dei picchi a partire da una singola estrazione del campione, come mostrato dall'Equazione 1. Il valore β è caratteristico per ciascuna combinazione analita-matrice, pertanto sono stati calcolati con questa procedura i valori corrispondenti

a tutti i principali componenti degli oli essenziali. Come suggerito da Tena e Carrillo (2007), β dovrebbe avere valori inferiori a 0.95 per garantire una sufficiente diminuzione dell'analita nelle estrazioni sequenziali. I componenti volatili quantificati con questa tecnica sono, tra tutti i componenti identificati sui cromatogrammi, quelli che rispondono ai requisiti di linearità della relazione tra ln Ai e (i-1) con buoni coefficienti di correlazione, e per i quali il valore di β è risultato inferiore a 0.95.

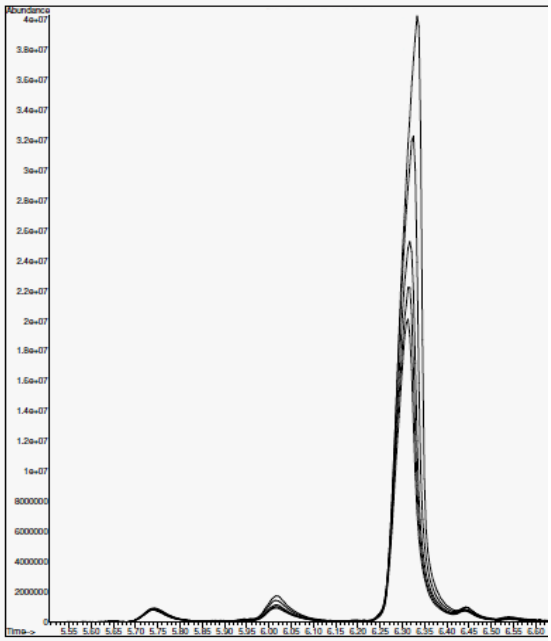


Figura 9a. Cromatogrammi sovrapposti relativi a cinque estrazioni multiple di un campione di polipropilene contenente olio essenziale di basilico. Si noti la diminuzione esponenziale dell'area del picco relative a ciascun analita con estrazioni SPME successive.

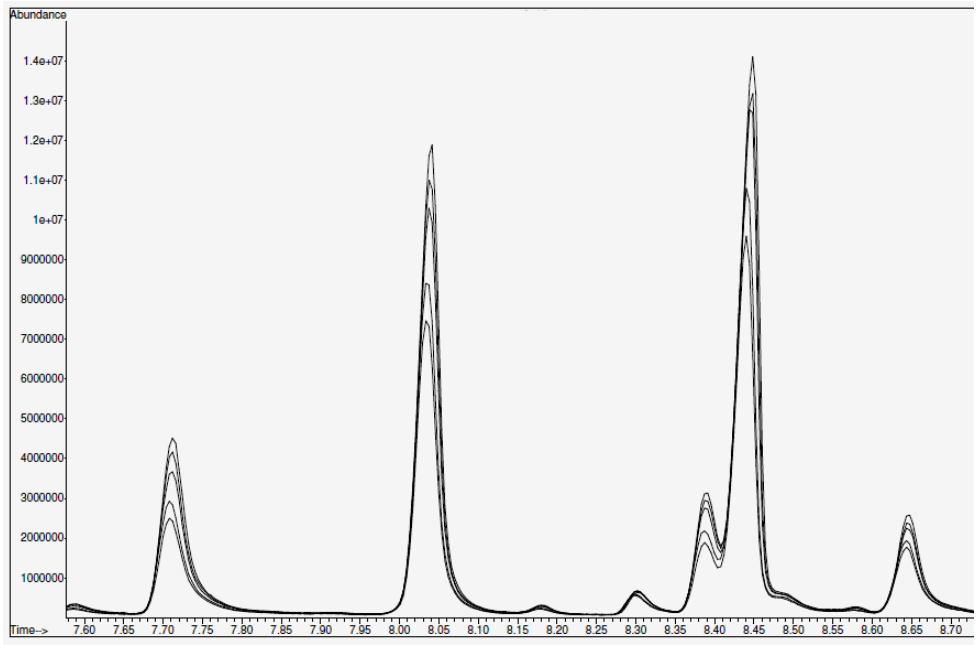


Figura 9b. Cromatogrammi sovrapposti relativi a cinque estrazioni multiple di un campione di polipropilene contenente olio essenziale di citronella. Si noti la diminuzione esponenziale dell'area del picco relative a ciascun analita con estrazioni SPME successive.

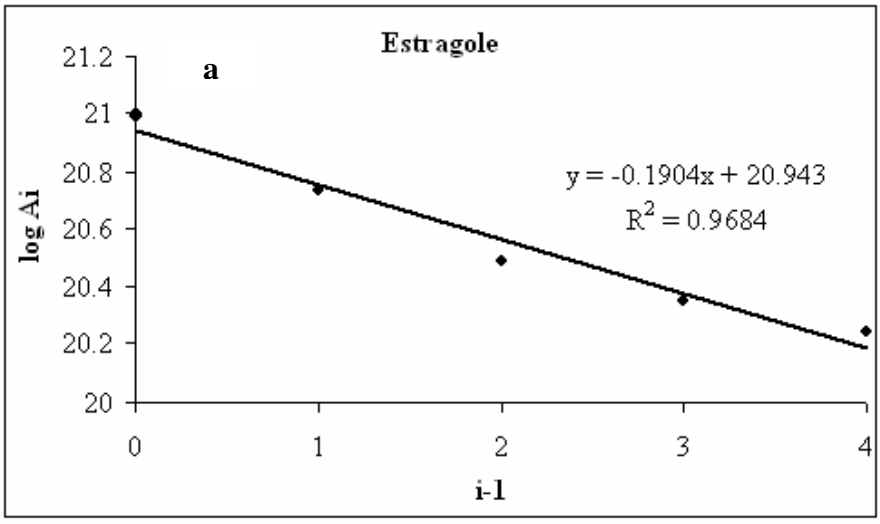


Figura 10a. Esempio di relazione lineare tra ln Ai e (i-1). Dati relativi all'estrazione multipla di un film di PP contenente olio essenziale di basilico, come da **figura 9a**.

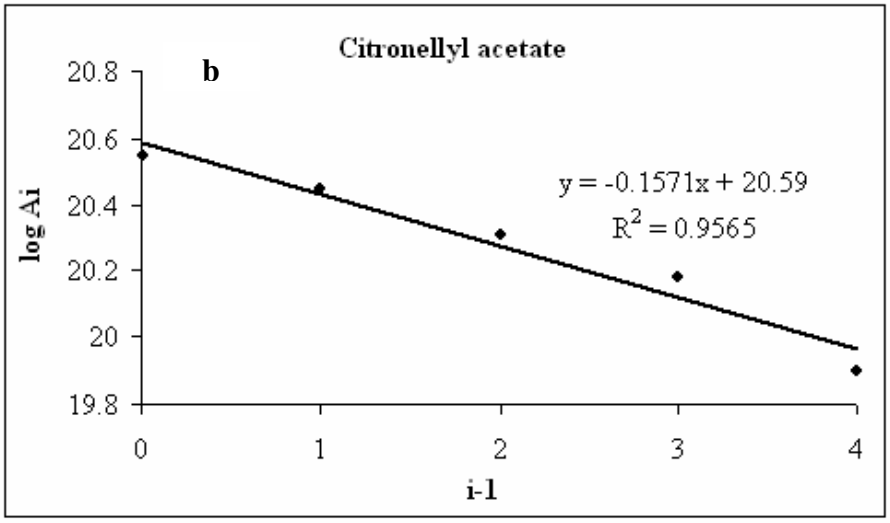


Figura 10. Esempi di relazione lineare tra ln Ai e (i-1). Dati relativi all'estrazione multipla di un film di PP contenente olio essenziale di citronella, come da **figura 9b**.

4.3.2. Composizione degli oli essenziali

Il profilo cromatografico dell'olio essenziale di basilico è caratterizzato dalla presenza di Estragolo che, da solo, rappresenta circa il 25% dell'area cromatografica totale. Assieme all'Estragolo, trans-α-Bergamotene, Methyl-eugenol e Carvacrolo rappresentano circa il 52% del totale della frazione aromatica.

Un cromatogramma tipico dell'olio essenziale di basilico è mostrato in **figura 11a.**

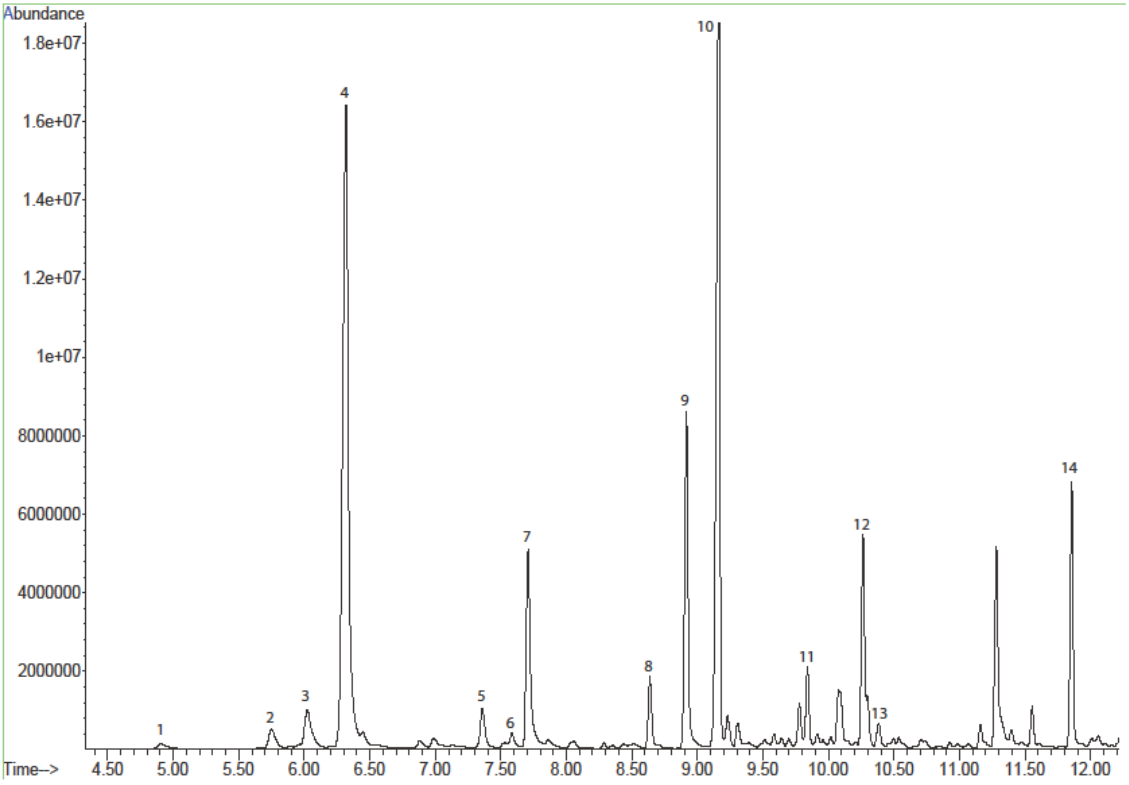


Figura 11a. Profilo cromatografico di film di PP contenenti olio essenziale di basilico. 1) Linalool; 2) Camphor; 3) Menthol; 4) Estragole; 5) Bornyl acetate; 6) Thymol; 7) Carvacrol; 8) β-elemene; 9) Methyl eugenol; 10) Trans-α-bergamotene; 11) Trans-β-farnesene; 12) α-amorphene; 13) 1S,cis-calamenene; 14) α-cadinol.

L'olio essenziale di citronella è, tra tutti quelli studiati, il più complesso, risultando caratterizzato da almeno 10 componenti maggioritari, che assieme assommano a circa il 67% dell'area cromatografica totale. Tra quesi prevalgono il Geraniolo (20,0%), il Citronellolo (12.3%) e i loro acetati (5.9 and 5.3%, respectively), l'Elemolo (11.4%) e il δ-Cadinene (4.9%), seguiti da minori quantità di Mircene, Eugenolo e trans-β-Ocimene.

Un cromatogramma tipico dell'olio essenziale di citronella è mostrato in **figura 11b.**

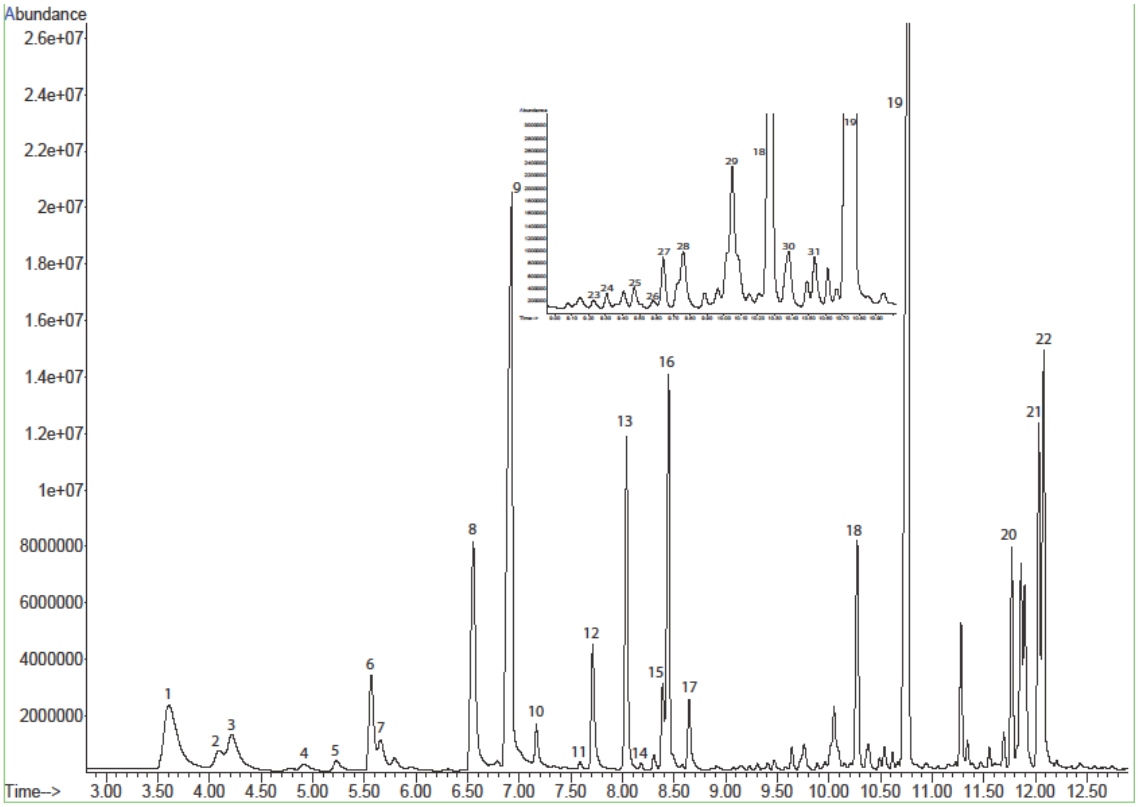


Figura 11b. Profilo cromatografico di film di PP contenenti olio essenziale di citronella. 1) Myrcene; 2) α-pinene; 3) Trans-β-ocimene; 4) Linalool; 5) Allo-ocimene; 6) Citronellal; 7) Isopulegol; 8) Citronellol; 9) Geraniol; 10) Geranial; 11) Thymol; 12) Carvacrol; 13) Citronellyl acetate; 14) Nerol; 15) Eugenol; 16) Geranyl acetate; 17) β-elemene; 18) δ-cadinene; 19) Elemol; 20) γ-eudesmol; 21) T-cadinol; 22) α-eudesmol; 23) Germacrene; 24) Trans-β-farnesene; 25) α-cubebene; 26) Cis-α-bisabolene; 27) β-cubebene; 28) α-amorphene; 29) β-cadinene; 30) 1S,cis-calamenene; 31) α-cadinene.

L’olio essenziale di origano è costituito principalmente da Carvacrolo e Timolo, che assieme assommano a oltre il 57% dell’area cromatografica totale, seguiti da minori livelli di β-Caryophyllene (3.6%), α-Humulene e linaiolo.

Un cromatogramma tipico dell’olio essenziale di origano è presentato in **figura 11c.**

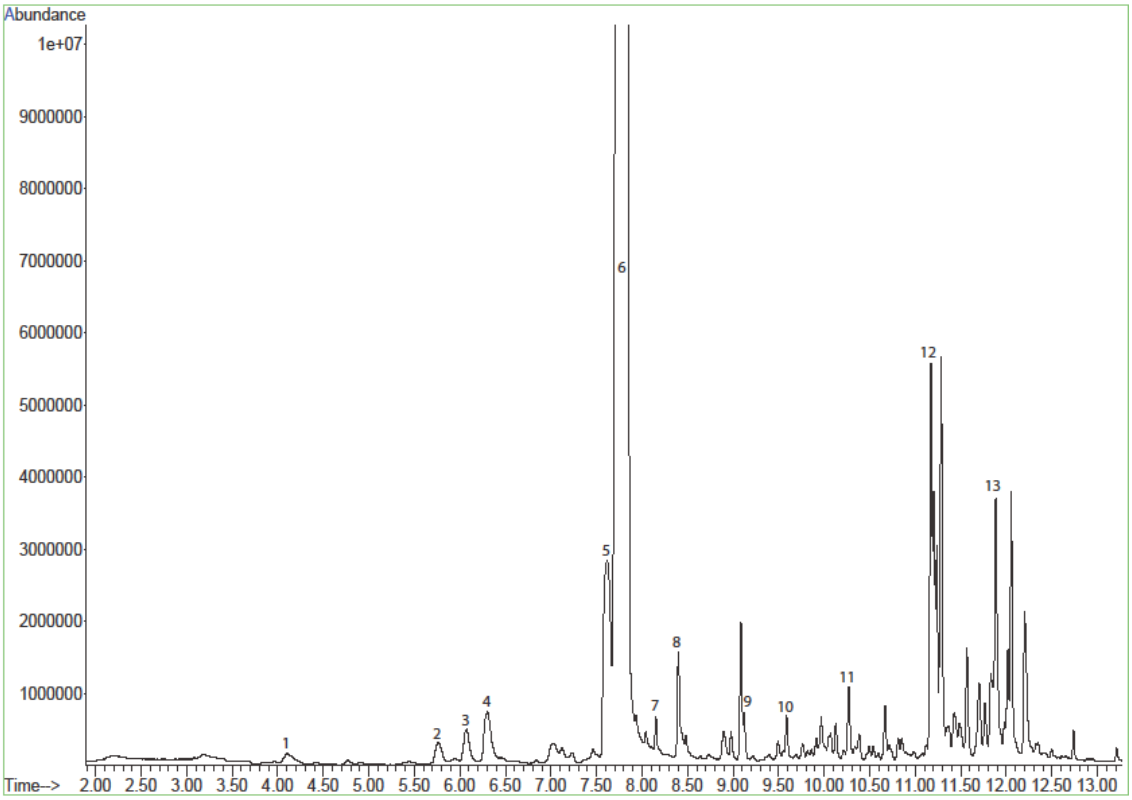


Figura 11c. Profilo cromatografico di film di PP contenenti olio essenziale di origano. 1) Limonene; 2) Camphor; 3) Endo-borneol; 4) α-terpineol; 5) Thymol; 6) Carvacrol; 7) Camphene; 8) Eugenol 9) β-caryophyllene; 10) α-humulene; 11) δ-cadinene; 12) Caryophyllene oxide; 13) T-cadinol.

Canfora, 1,8-Cineole e β-Caryophyllene i principali costituenti dell'olio essenziale di rosmarino, corrispondenti a circa il 17.1, 14.9 e 13.3% dell'area cromatografica totale, rispettivamente. Borneolo, α-Terpineolo, Bornyl acetate, Carvacrolo e α-Humulene rappresentano assieme circa il 25% dell'area cromatografica. Assieme gli 8 componenti citati costituiscono circa il 70% della frazione volatile.

Un cromatogramma tipico dell'olio essenziale di rosmarino è mostrato in **figura 11d.**

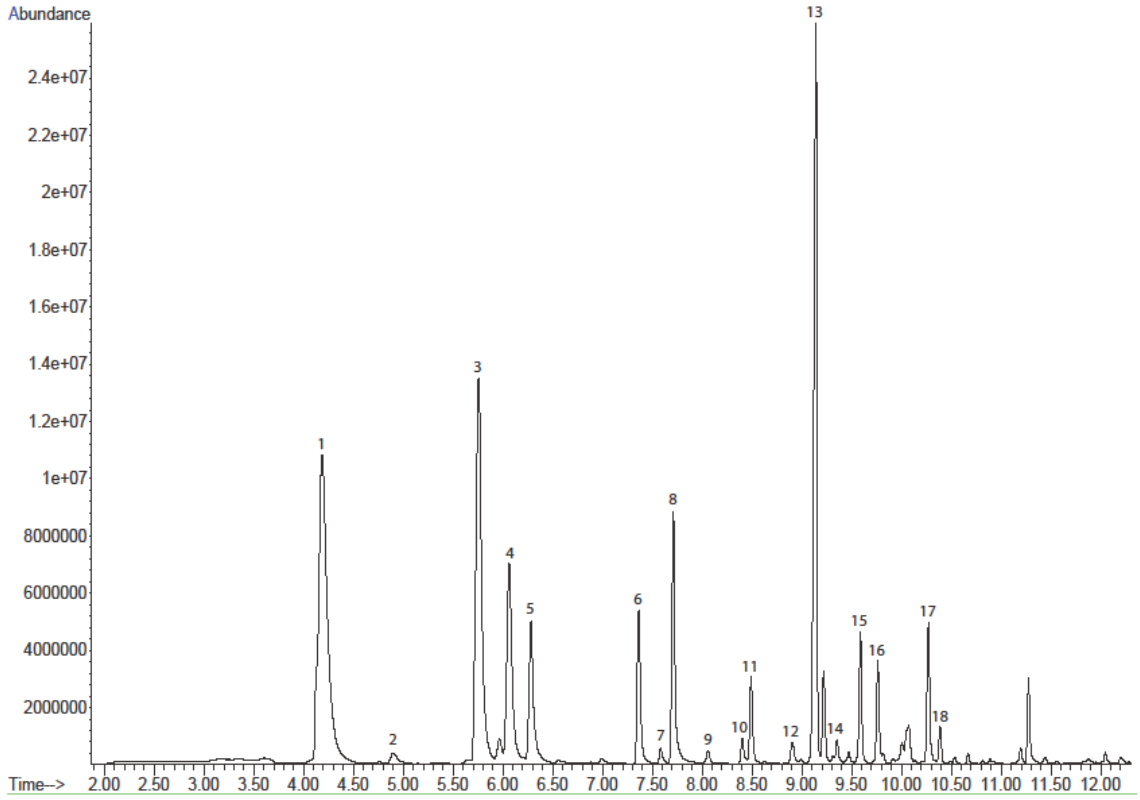


Figura 11d. Profilo cromatografico di film di PP contenenti olio essenziale di rosmarino. 1) 1,8 cineole; 2) Linalool; 3) Camphor; 4) Endo-borneol; 5) α-terpineol; 6) Bornyl acetate; 7) Thymol; 8) Carvacrol; 9) α-cubebene; 10) α-ylangene; 11) α-copaene; 12) Isocaryophyllene; 13) β-caryophyllene; 14) Aromadendrene; 15) α-humulene; 16) α-amorphene; 17) δ-cadinene; 18) 1S,cis-calamenene.

La composizione relativa degli oli essenziali di basilico, citronella e rosmarino è simile a quella osservata da Lopez et al. (2006) utilizzando la stessa fibra SPME impiegata nel presente studio. Dall'altra parte, invece, la composizione da noi osservata differisce leggermente dai dati riportati sulle schede tecniche degli estratti commerciali che, tuttavia, riportano solamente valori approssimativi. Tali differenze possono essere attribuite alla tecnica analitica utilizzata e in particolare al fatto che ciascuna fibra SPME ha una specifica selettività. Per esempio, le schede tecniche riportano un contenuto di Linalolo compreso tra lo 0 e il 10%, mentre nel nostro studio questo componente è stato sempre rivelato in tracce. La fibra PDMS in realtà è composta da una resina non polare, mentre il suddetto componente ha caratteristiche piuttosto polari. Ad ogni modo, la maggior parte dei componenti degli oli essenziali è caratterizzata da polarità piuttosto bassa, giustificando così l'utilizzo di una fibra SPME con tali caratteristiche.

4.3.3. Diffusione dei componenti degli oli essenziali in polipropilene

Sono pochi in letteratura gli studi sistematici sulla diffusione e ripartizione dei componenti di oli essenziali in polipropilene (Becker et al., 1987; Koszinowski e Piringer, 1987). In questi studi il disegno sperimentale ha previsto lo studio della diffusione a 23°C di una miscela di componenti disciolti in un liquido, attraverso sacchetti di PP. In generale, per gli stessi componenti in esame, i coefficienti di diffusione erano di circa mezzo ordine di grandezza più bassi rispetto a quelli determinati nel presente lavoro. Questa differenza potrebbe essere imputabile alle più alte temperature a cui sono state condotte le prove di diffusione in questo studio (40°C). Allo stesso tempo differenze dei coefficienti di diffusione possono risultare da differenze nella matrice di PP utilizzata (maggiore densità o rigidità determinano, in generale, una riduzione dei Dp). Inoltre, il numero e la concentrazione dei componenti degli oli essenziali nelle miscele può aver influenzato i processi diffusivi. Le più alte concentrazionii di componenti impiegate nel presente studio possono aver determinato un certo grado di *swelling*, ovvero di plasticizzazione della matrice, velocizzando i processi diffusivi. Questa ipotesi sembra essere supportata dal fatto che tutti i coefficienti di diffusione per tutti i componenti studiati sono sensibilmente più alti nei film laccati (contenenti l'olio essenziale) rispetto ai film vergini.

La **Tabella 1** mostra un leggero decremento dei valori dei coefficienti di diffusione D*p e Dp con l'aumento del peso molecolare, Mw, dei componenti degli oli essenziali: Mw è infatti correlato negativamente sia con D*p ($R= -0.37$; $p<0.1$) che con Dp ($R= -0.38$; $p<0.1$). Allo stesso modo, i coefficienti di diffusione sono correlati negativamente con il volume molare ($R^2= 0.49$ e 0.43, $p<0.05$, rispettivamente). Questo andamento può considerarsi normale e atteso dato che, come è ampiamente documentato, un aumento del peso e dell'ingombro di una molecola ne diminuisce la mobilità in matrici polimeriche.

Tabella 1. Parametri chimici e coefficienti di diffusione e ripartizione in polipropilene per i componenti degli oli essenziali di basilico, citronella, origano e rosmarino.

	Compound	Mw (g/mol)	Log P_{ow}	Molar volume (cm^3)	D*p (cm^2/s)×10^{-11}	Dp (cm^2/s)×10^{-11}	Kp*p
Basil	Bornyl acetate	196.29	3.60	194.70	0.30	0.03	2.80
	Carvacrol	150.22	3.28	154.20	8.10	4.60	4.00
	Estragole	148.21	3.15	157.80	12.00	6.40	3.50
	Menthol	156.27	3.22	176.00	1.00	0.40	10.80
	Methyleugenol	236.39	2.97	181.80	3.00	1.00	15.00
	Thymol	150.22	3.28	154.20	4.30	1.00	1.60
Citronella	Citronellal	154.25	3.48	184.70	2.90	1.50	4.20
	Citronellol	156.27	3.38	184.90	2.80	1.40	5.30
	Citronellyl acetate	198.30	4.28	223.80	2.00	1.20	2.60
	Eugenol	164.21	2.20	156.20	1.90	1.00	4.80
	Geraniol	154.25	2.94	177.94	3.20	1.70	5.60
	Geranyl acetate	196.29	4.10	216.90	2.30	1.70	2.70
Oregano	β-Caryophyllene	204.36	6.78	228.40	1.10	0.33	11.80
	Carvacrol	150.22	3.28	154.20	4.40	2.30	3.00
	Linalool	154.25	2.80	179.67	2.20	1.00	3.90
	Thymol	150.22	3.28	154.20	3.00	2.10	2.50
Rosemary	Carvacrol	150.22	3.28	154.20	3.70	1.80	8.90
	β-Caryophyllene	204.36	6.78	228.40	0.70	0.40	50.00
	1,8-Cineole	154.22	2.82	167.10	1.50	0.63	9.50
	Linalool	154.22	2.80	179.67	1.30	0.50	5.80
	α-Terpineol	154.22	2.79	164.90	1.70	1.20	8.00

Tuttavia è anche consolidato che la diffusione non dipende soltando da peso molecolare e volume molare della specie chimica, ma anche dalla sua concentrazione nel polimero e dalla sua polarità. L'influenza di questi fattori addizionali sui coefficienti di diffusione può spiegare come mai le correlazioni appena discusse tra i Dp e Mw e volume molare non siano molto alte, seppur statisticamente significative.

L'influenza della concentrazione della specie diffondente può essere analizzata, per esempio, per il Metil eugenolo. Questo componente ha il più alto Mw ma valori di Dp che sono più alti rispetto a quelli di altri componenti con minore Mw. In effetti, la concentrazione di Metil eugenolo nell'olio essenziale di basilico è da 2.5 a 100 volte più alta rispetto a quella di specie più leggere. Un'alta concentrazione di un componente nella miscela sembra, dunque, determinare l'aumento dei coefficienti di diffusione. Lo stesso principio può aiutare a spiegare i valori relativamente alti di Dp per l'Estragolo: questo componente è poco più leggero del Carvacrolo ma il suo coefficiente di diffusione in PP è di circa il 140% più alto. Questa osservazione può essere, almeno in parte, determinata dal fatto che la concentrazione di Estragolo nell'olio essenziale di basilico è di circa 100 volte più alta rispetto a quella del Carvacrolo. L'Estragolo nell'olio essenziale di basilico, infatti, mostra i più elevati coefficienti di diffusione tra tutte le specie degli oli essenziali studiati, per via del più basso Mw e della più elevata concentrazione. Inoltre, Carvacrolo e Timolo sono isomeri, possiedono lo stesso Mw e la stessa polarità, tuttavia il carvacrolo, sia nel caso dell'olio essenziale di basilico che di quello di origano, diffonde più rapidamente, essendo presente a livelli di 4.5-16.4 volte più alti, rispettivamente.

I risultati ottenuti mostrano anche che la concentrazione di un componente dell'olio essenziale non ha sempre un effetto determinante sul proprio coefficiente di diffusione nella matrice polimerica. Nell'olio essenziale di rosmarino, il β-Caryophyllene ammonta a circa il 13% dell'area cromatografica totale, ma possiede il secondo più basso valore di Dp tra tutti i casi studiati. In

questo caso, che sarà discusso più approfonditamente in seguito, la natura chimica, con particolare riguardo per la polarità, della molecola diffondente sembra prevalere nel determinare la grandezza del coefficiente di diffusione. L'influenza della polarità delle molecole sul loro comportamento diffusionale in film di PP può essere esemplificata da Geraniolo e Citronellale (entrambi contenuti nell' olio essenziale di citronella), essi possiedono lo stesso Mw ma diverse polarità. Il Geraniolo, più polare (log P_{ow}= 2.94 *vs* 3.48) ha valori di D*p e Dp più alti del Citronellale, nonostante il primo componente sia presente a più basse concentrazioni. Dall'altra parte, il Citronellolo, con valori di Mw e log P_{ow} simili al Citronellale, ha proprietà diffusionali simili nonostante sia presente a concentrazioni circa 3 volte più alte. Queste osservazioni suggeriscono che l'influenza combinata di fattori quali peso molecolare/volume molare e polarità di una specie diffondente sui parametri diffusionali D*p e Dp, sembra prevalere sull'effetto della concentrazione di questi componenti nei polimeri.

Per il β-Caryophyllene sono stati registrati coefficienti di diffusione molto bassi, sia nell'olio essenziale di origano che in quello di rosmarino. In effetti questo componente è caratterizzata da alto Mw e da bassa polarità (alto valore di log P_{ow}), entrambi fattori, questi, che sembrano avere un effetto sulla riduzione dei movimenti diffusivi nelle matrici polimeriche, più di quanto l'elevata concentrazione di questa specie non acceleri il fenomeno. Infine, prendendo in considerazione il Metil eugenolo dell'olio essenziale di basilico, si nota come questo componente abbia coefficienti di diffusione relativamente elevati, nonostante l'elevato Mw: oltre che alla sua alta concentrazione (già discussa precedentemente), questo comportamento è dovuto a una certa polarità della molecola che sembra favorire la diffusione.

Dai risultati ottenuti può essere generalizzato che la polarità della specie chimica è un fattore determinante nel comportamento diffusivo in polipropilene, in accordo con le relazioni

Elevata polarità= log P_{ow} ↠ diffusione veloce

Bassa polarità= elevato log P_{ow} ↠ diffusione lenta

In linea generale, come mostrato dalla **Tabella 1**, i coefficienti di diffusione nei film di PP rivestiti, D*p, hanno valori circa doppi rispetto ai corrispondenti coefficienti nei film vergini, Dp. I due coefficienti, D*p e Dp sono fortemente correlati ($R=0.97$; $p<0.01$). Tale risultato va a supporto dell'ipotesi formulata in precedenza, secondo la quale l'elevata concentrazione di un componente dell'olio essenziale in PP determina coefficienti di diffusione più alti, come conseguenza di un certo grado di *swelling* determinato a carico del film che include l'olio essenziale.

4.3.4. Ripartizione dei componenti degli oli essenziali tra PP rivestito e PP vergine

L'ipotesi del fenomeno di *swelling* nel film di PP laccato, dovuto alle quantità di olio essenziale relativamente elevate, sembra essere sostenuta anche dall'esistenza di un effetto di ripartizione all'interfaccia tra film trattati e non trattati. In linea di principio, se le proprietà fisiche dei due materiali sono identiche, non si manifesterebbe alcuna discontinuità nei profili di concentrazione all'interfaccia durante i saggi di diffusione. Tuttavia, tale discontinuità è stata osservata per ciascun esperimento e per ciascun olio essenziale (**Figure 12 a-d**).

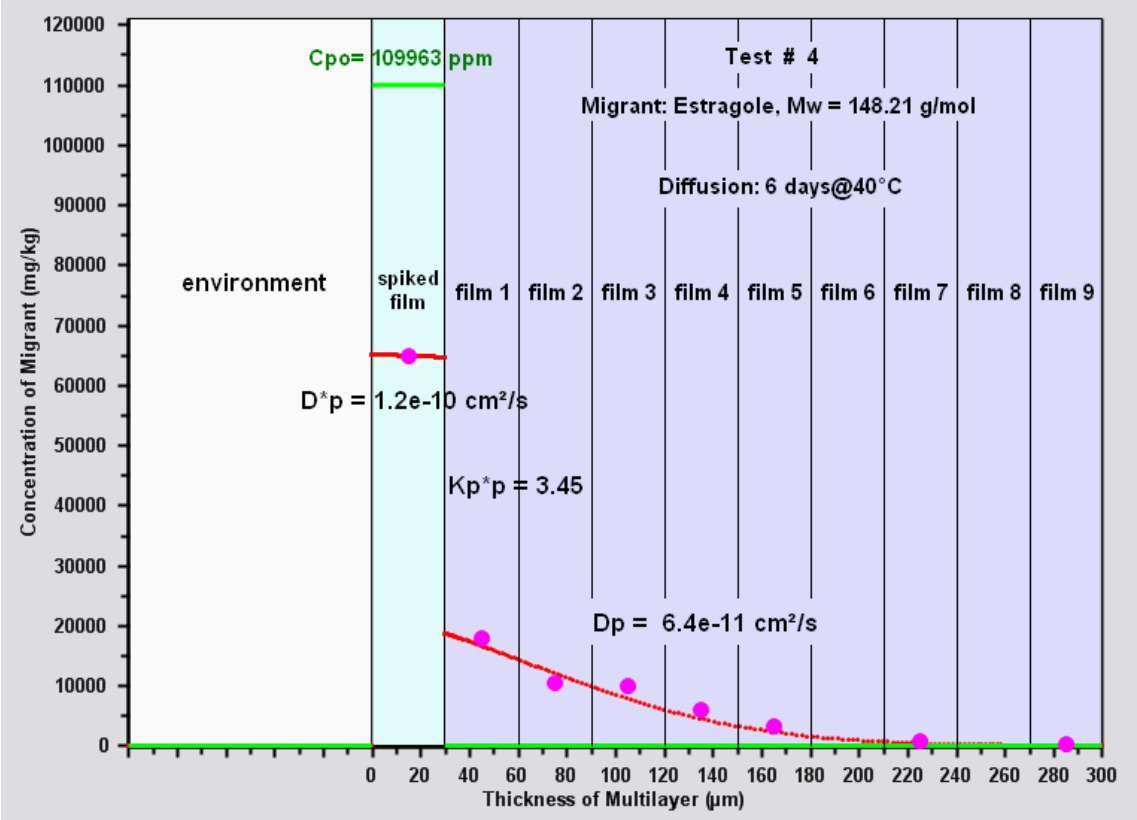


Figura 12a. Dati sperimentali e simulati relative alle concentrazioni di Estragolo dell'olio essenziale di basilico risultanti da prove di diffusione in un sistema di 10 fogli di polipropilene.

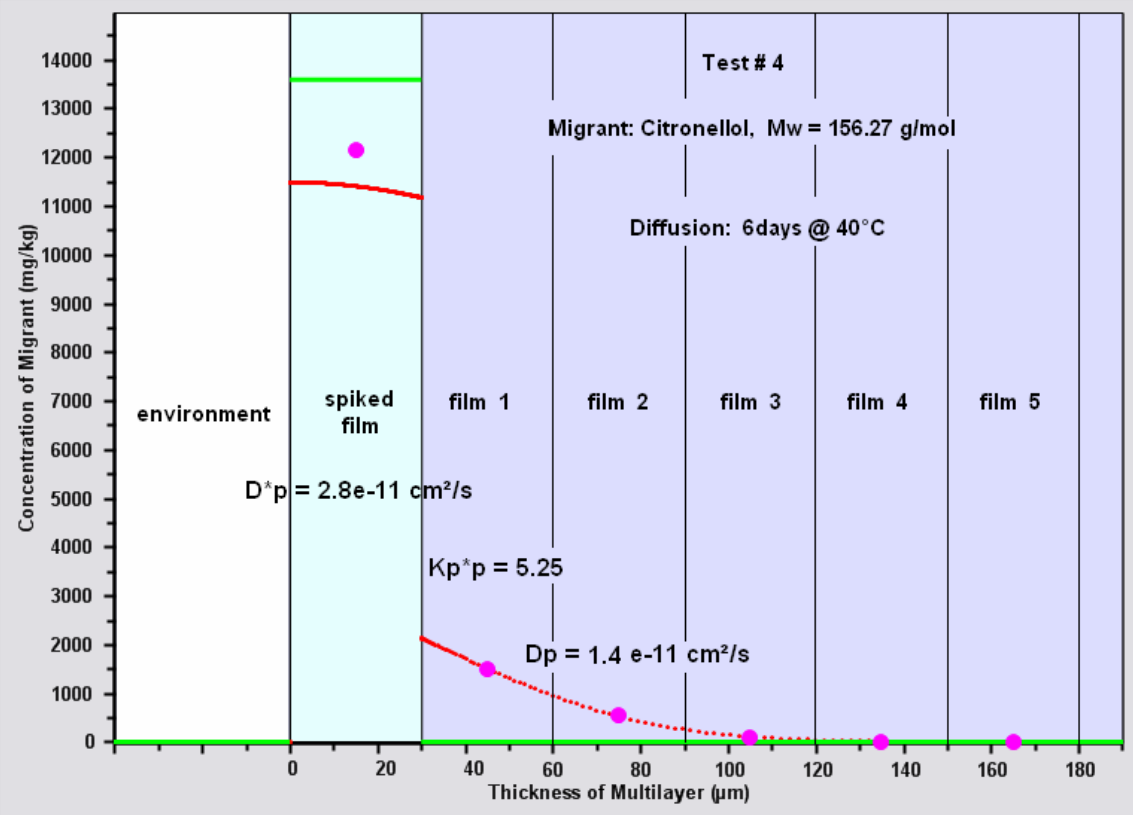


Figura 12b. Dati sperimentali e simulati relative alle concentrazioni di Citronellolo dell'olio essenziale di citronella risultanti da prove di diffusione in un sistema di 10 fogli di polipropilene.

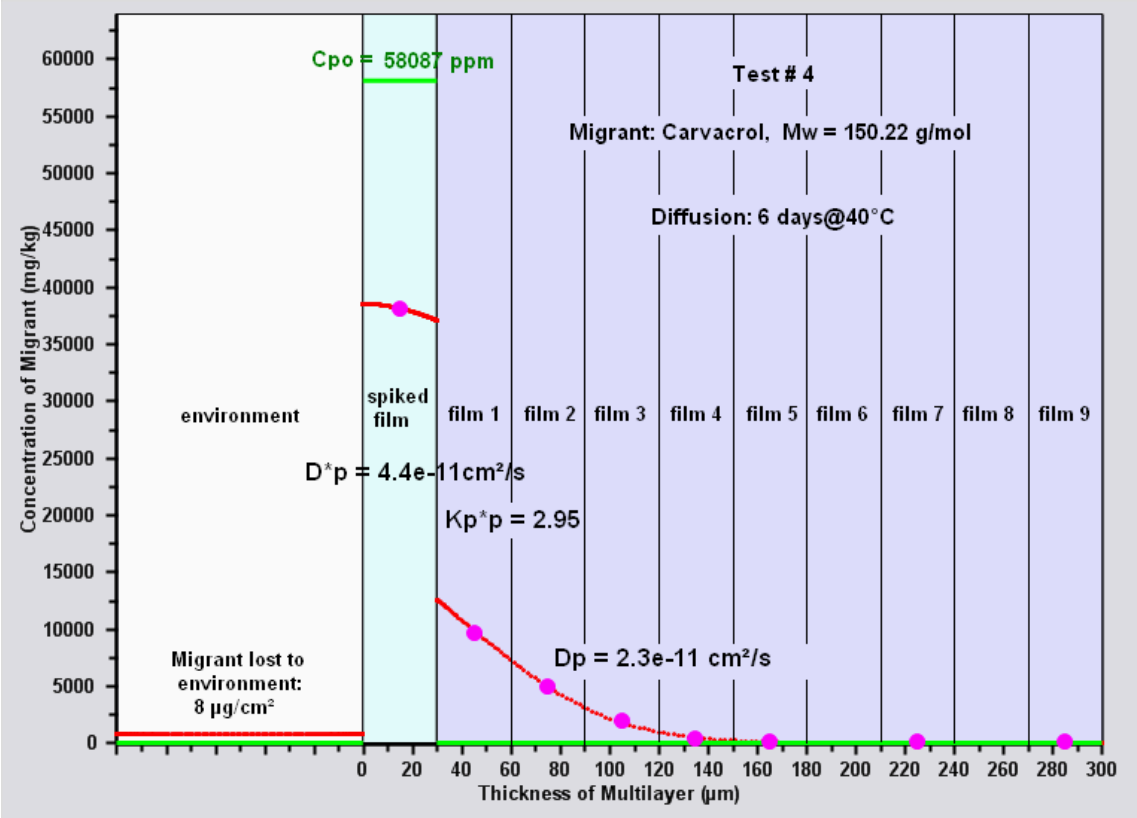


Figura 12c. Dati sperimentali e simulati relative alle concentrazioni di Carvacrolo dell'olio essenziale di origano risultanti da prove di diffusione in un sistema di 10 fogli di polipropilene.

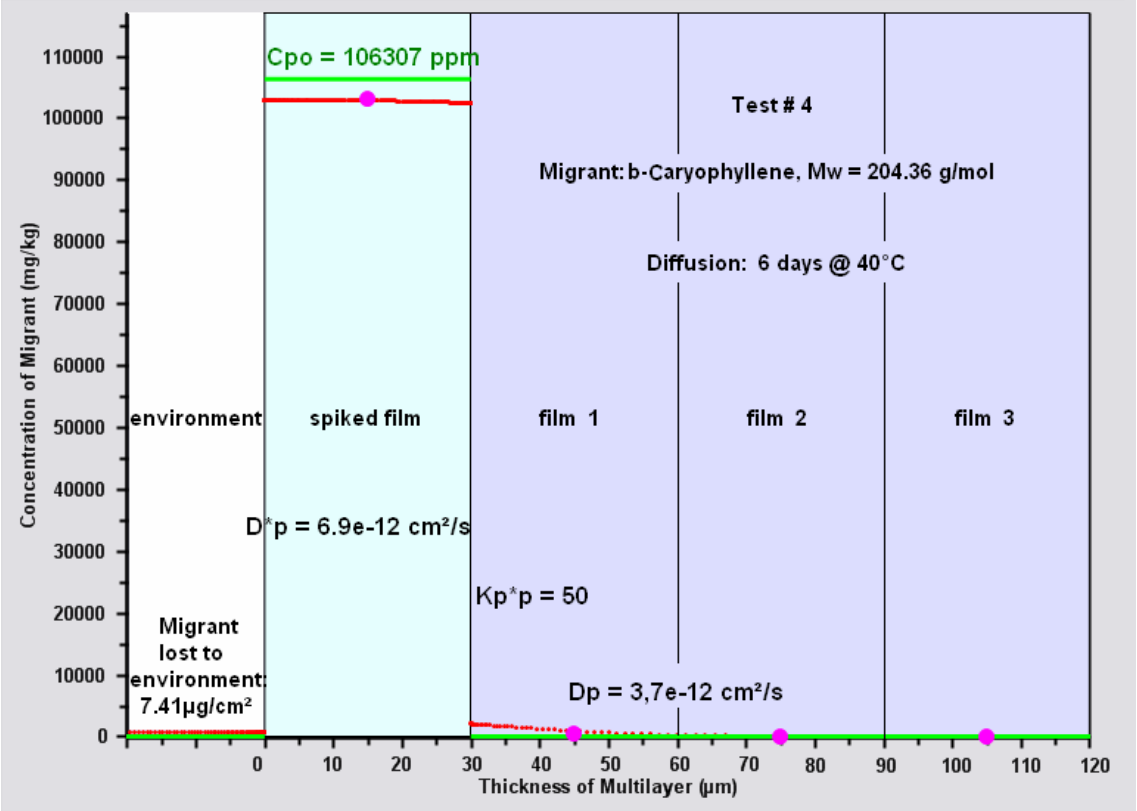


Figura 12d. Dati sperimentali e simulati relative alle concentrazioni di β-Caryophyllene dell'olio essenziale di rosmarino risultanti da prove di diffusione in un sistema di 10 fogli di polipropilene.

Questo può essere, infatti, attribuito alle differenti proprietà dei componenti nel film trattato e vergini, rispettivamente. Per il trasporto di massa dal film trattato a quelli vergini questo fenomeno determina coefficienti di ripartizione $Kp^*p \neq 1$. La **Tabella 1** mostra, ancora, come tutti i valori di Kp*p ottenuti con il fitting del modello ai dati sperimentali siano superiori all'unità. Questo significa che l'equilibrio di solubilità di tutti i componenti aromatici studiati è più alto nei film di PP laccati che non in quelli vergini, in accordo con l'ipotesi illustrata precedentemente. Il valore assoluto di Kp*p sembra dipendere dalla natura della specie chimica, ma anche dalla miscela di cui questa fa parte. I coefficienti Kp*p sono fortemente correlati con il valore di log P_{ow} della specie diffondente ($R=0.64$; $p<0.01$). Questo trend dimostra che con l'aumento della polarità dei componenti degli oli essenziali, il rapporto tra le solubilità all'equilibrio nei film trattati e vergini aumenta. Questo può avere conseguenze pratiche e dovrebbe essere tenuto in considerazione nella scelta di un olio essenziale come agente attivo da impiegare in sistemi di active packaging.

Ad esempio, per il Carvacrolo si ottengono valori di Kp*p compresi tra 3.0 e 8.9, in funzione dell'olio essenziale in cui si trova. Per il β-Caryophyllene si osservano i valori più elevati di Kp*p, pari a 50, come risultato dell'alta polarità e bassa volatilità di questo componente. L'unico caso che non è spiegabile con le relazioni qui esposte per la diffusione e ripartizione sembra essere il Metil eugenolo dell'olio essenziale di basilico. Per questo componente il rapporto tra D*p e Dp è di circa 3, e Kp*p è piuttosto elevato. Tuttavia, nell'olio essenziale di basilico non si ha solo una concentrazione relativamente alta di Metil eugenolo (circa il 6.5%) ma anche di Mentolo ed Estragolo (assieme, cierca il 26.5%). Una complessa sinergia tra gli effetti di concentrazione, polarità e Mw sembra determinare i valori di Dp*p, Dp e Kp*p determinati e gli andamenti sistematicamente osservati negli esperimenti di diffusione e descritti dalla simulazione numerica.

Il caso del Carvacrolo illustra anche come i valori finali dei coefficienti di diffusione e ripartizione dipendano da una serie di fattori, inclusa la natura dell'olio essenziale. Questo componente è presente negli oli essenziali di basilico, origano e rosmarino in concentrazioni piuttosto differenti. I coefficienti Dp*p, Dp e Kp*p per questo componente ricavati nelle prove di diffusione a 40°C dai rispettivi film di PP, sono abbastanza diversi tra loro, e questo è senz'altro il risultato di una serie di interazioni tra i vari componenti dei diversi oli essenziali nei diversi film trattati. Dallo studio svolto non è possibile comprendere più a fondo la natura di queste interazioni, tuttavia è importante sottolineare come uno stesso componente volatile da un tipo di imballaggio trattato può diffondere e solubilizzare a livelli diversi in funzione della composizione complessiva dell'olio essenziale e della concentrazione relativa nell'imballaggio attivo. In questo senso si incoraggiano gli studi sulla diffusione di componenti volatili in matrici plastiche che considerino miscele reali (gli oli essenziali, ad esempio), dato che prove condotte con singoli componenti possono fornire risultati poco trasferibili ai sistemi reali e poco utili da un punto di vista applicativo.

5. CONCLUSIONI

Lo studio oggetto della presente tesi di Dottorato di Ricerca rappresenta un approccio globale verso la progettazione di imballaggi repellenti. Nella fattispecie, le tre fasi in cui è stata scandita la ricerca sono riconducibili a una valutazione dell'efficacia dei principi attivi e dei prototipi di film repellenti e alla stima delle proprietà diffusionali, la cui conoscenza è elemento di base per la previsione del comportamento dei principi attivi e del loro destino durante l'utilizzo dei materiali.

Il metodo di valutazione dell'efficacia degli oli essenziali in piastra, pur avendo fornito utili indicazioni di massima, si è rivelato poco accurato e poco riproducibile. Differentemente, le prove di repellenza effettuate con i prototipi di film plastico trattato con oli essenziali hanno evidenziato risultati più chiari e riproducibili, restituendo valori di repellenza significativamente positivi per tutti gli oli essenziali e in alcuni casi prossimi al 90%. Sulla base di queste osservazioni è possibile concludere che il metodo classico di valutazione della repellenza in piastra non è adatto per lo studio di sostanze attive per l'impiego in packaging repellenti, mentre la valutazione di prototipi può essere considerato il sistema da preferire.

Lo studio delle proprietà di diffusione ha messo in evidenza l'influenza delle proprietà chimiche dei singoli componenti degli oli essenziali, quali il peso molecolare, il volume molare e la polarità. In particolare a un'elevata polarità corrisponde una diffusione più rapida, mentre componenti caratterizzati da più bassa polarità diffondono più lentamente. Inoltre, a polarità più elevate, il rapporto tra le solubilità all'equilibrio nei film trattati e vergini aumenta, i componenti, cioè, vengono maggiormente trattenuti nel coating. Questa osservazione ha importanti implicazioni pratiche nella scelta degli oli essenziali per applicazioni in sistemi d'imballaggio attivi.

Una considerazione finale è relativa alla denomazione "imballaggi attivi", spesso utilizzata in questa tesi. In base al Regolamento (CE) n. 450/2009, gli

imballaggi attivi sono "concepiti in modo da incorporare deliberatamente componenti che rilasciano sostanze nel prodotto alimentare imballato o nel suo ambiente, o le assorbono dagli stessi". A rigore di definizione, pertanto, gli imballaggi repellenti non dovrebbero rientrare nella categoria degli imballaggi attivi, in quanto le sostanze attive incluse, in questo caso, non interagiscono con l'alimento o con lo spazio di testa della confezione, bensì con l'ambiente esterno.

E' chiaro come il numero di oli essenziali studiati sia molto ridotto rispetto a quelli oggi disponibili in commercio e a quelli non ancora oggetto di estrazione industriale, per cui risulterebbe riduttivo fermarsi a questi risultati per il trasferimento della ricerca su scala produttiva. Ben più interessante è considerare lo studio come punto di partenza per l'approfondimento di una tematica che potrebbe risultare di notevole interesse per la salvaguardia delle produzioni alimentari in ogni punto della filiera distributiva, fino alla conservazione domestica, e con particolare riferimento ai paesi in via di sviluppo. Sulla base di questi elementi, credendo molto nell'aspetto innovativo e applicativo dello studio, ho partecipato al bando FIRB 2010–Futuro in Ricerca come coordinatore scientifico (linea 1) del progetto dal titolo "Approccio integrato per la progettazione di imballaggi alimentari a prova di insetto contenenti sostanze di origine naturali ad azione repellente", che purtroppo non ha ottenuto il finanziamento pur essendo stato valutato positivamente. Ulteriori sviluppi della ricerca dovrebbero considerare, oltre alla valutazione di oli essenziali da altre specie vegetali, anche diverse specie di insetti target.

6. APPENDICE

Raccolta bibliografica dei lavori sullo studio dell'efficacia di oli essenziali su specie di insetti comunemente responsabili di infestazioni di prodotti alimentari confezionati

Specie	Olio essenziale	Famiglia botanica	Parte utilizzata	Autori
Rhyzopertha dominica	*Aframomum melegueta*	Zingiberaceae	semi	Ukeh e Umoetok, 2011
Tribolium castaneum	*Aframomum melegueta*	Zingiberaceae	semi	Ukeh e Umoetok, 2011
Sitophilus zeamais	*Allium sativum*	Liliaceae	bulbi	Ho et al., 1996
Tribolium castaneum	*Allium sativum*	Liliaceae	bulbi	Ho et al., 1996
Sitophilus zeamais	*Alpinia conchigera*	Zingiberaceae	rizomi	Suthisut et al., 2011
Tribolium castaneum	*Alpinia conchigera*	Zingiberaceae	rizomi	Suthisut et al., 2011
Tribolium castaneum	*Anethum graveolens*	Umbrelliferae	frutti secchi	Chaubey, 2007
Tribolium castaneum	*Artemisia annua*	Asteraceae	radici	Goel et al., 2007
Sitophilus granarius	*Artemisia spp*	Asteraceae	parti aeree	Kordali et al., 2006
Tribolium castaneum	*Artemisia vulgaris*	Asteraceae	foglie fresche	Wang et al., 2006
Sitophilus oryzae	*Azadirachta indica*	Meliaceae	foglie	Owusu, 2001
Tribolium castaneum	*Azadirachta indica*	Meliaceae	foglie	Owusu, 2001
Tribolium castaneum	*Baccharis salicifolia*	Asteraceae	parti aeree	García et al., 2005
Sitophilus zeamais	*Cananga odorata*	Annonaceae	fiori	Nerio et al., 2009
Cryptolestes pusillus	*Carum carvii*	Umbrelliferae	semi	Lopez et al., 2008
Rhyzopertha dominica	*Carum carvii*	Umbrelliferae	semi	Lopez et al., 2008
Sitophilus oryzae	*Carum carvii*	Umbrelliferae	semi	Lopez et al., 2008
Sitophilus oryzae	*Chromolaena odorata*	Compositae	foglie	Owusu, 2001
Tribolium castaneum	*Chromolaena odorata*	Compositae	foglie	Owusu, 2001
Sitophilus zeamais	*Cinnamomum aromaticum*	Lauraceae	corteccia essiccata	Huang e Ho, 1998
Tribolium castaneum	*Cinnamomum aromaticum*	Lauraceae	corteccia essiccata	Huang e Ho, 1998
Cryptolestes ferrugineus	*Citrus bergamia*	Rutaceae	Prodotto commerciale	Cosimi et al., 2009
Sitophilus zeamais	*Citrus bergamia*	Rutaceae	Prodotto commerciale	Cosimi et al., 2009
Tenebrio molitor	*Citrus bergamia*	Rutaceae	Prodotto commerciale	Cosimi et al., 2009
Sitophilus oryzae	*Citrus limon*	Rutaceae	foglie	Owusu, 2001
Tribolium castaneum	*Citrus limon*	Rutaceae	foglie	Owusu, 2001
Cryptolestes pusillus	*Coriander sativum*	Umbrelliferae	semi	Lopez et al., 2008
Rhyzopertha dominica	*Coriander sativum*	Umbrelliferae	semi	Lopez et al., 2008
Sitophilus oryzae	*Coriander sativum*	Umbrelliferae	semi	Lopez et al., 2008
Tribolium castaneum	*Coriandrum sativum*	Umbrelliferae	foglie, fusti, fiori e frutti acerbi	Islam et al., 2009
Ephestia kuehniella	*Cuminum cyminum*	Umbrelliferae	semi	Tunç et al., 2000

Tribolium confusum	*Cuminum cyminum*	Umbrelliferae	semi	Tunç et al., 2000
Sitophilus zeamais	*Cupressus sempervirens*	Cupressaceae	foglie	Tapondjou et al., 2005
Tribolium confusum	*Cupressus sempervirens*	Cupressaceae	foglie	Tapondjou et al., 2005
Sitophilus zeamais	*Curcuma zedoaria*	Zingiberaceae	rizomi	Suthisut et al., 2011
Tribolium castaneum	*Curcuma zedoaria*	Zingiberaceae	rizomi	Suthisut et al., 2011
Sitophilus oryzae	*Cymbopogon citratus*	Poaceae	foglie	Stefanazzi et al., 2011
Sitophilus zeamais	*Cymbopogon citratus*	Poaceae	piante intere	Nerio et al., 2009
Tribolium castaneum	*Cymbopogon citratus*	Poaceae	piante intere	Olivero-Verbel et al., 2010
Tribolium castaneum	*Cymbopogon citratus*	Poaceae	foglie	Stefanazzi et al., 2011
Tribolium castaneum	*Drimys winteri*	Winteraceae	corteccia e foglie	Zapata e Smagghe, 2010
Sitophilus zeamais	*Elletaria cardamomum*	Zingiberaceae	semi	Huang et al., 2000
Tribolium castaneum	*Elletaria cardamomum*	Zingiberaceae	semi	Huang et al., 2000
Sitophilus oryzae	*Elyonurus muticus*	Poaceae	foglie	Stefanazzi et al., 2011
Tribolium castaneum	*Elyonurus muticus*	Poaceae	foglie	Stefanazzi et al., 2011
Ephestia kuehniella	*Eucalyptus camaldulensis*	Myrtaceae	frutti	Tunç et al., 2000
Tribolium confusum	*Eucalyptus camaldulensis*	Myrtaceae	frutti	Tunç et al., 2000
Sitophilus oryzae	*Eucalyptus citriodora*	Myrtaceae	foglie	Olivero-Verbel et al., 2010
Sitophilus zeamais	*Eucalyptus citriodora*	Myrtaceae	foglie	Nerio et al., 2009
Sitophilus zeamais	*Eucalyptus saligna*	Myrtaceae	foglie	Tapondjou et al., 2005
Tribolium confusum	*Eucalyptus saligna*	Myrtaceae	foglie	Tapondjou et al., 2005
Sitophilus zeamais	*Evodia rutecarpa*	Rutaceae	frutti	Liu e Ho, 1999
Tribolium castaneum	*Evodia rutecarpa*	Rutaceae	frutti	Liu e Ho, 1999
Cryptolestes ferrugineus	*Foeniculum vulgare*	Umbrelliferae	Prodotto commerciale	Cosimi et al., 2009
Sitophilus zeamais	*Foeniculum vulgare*	Umbrelliferae	Prodotto commerciale	Cosimi et al., 2009
Tenebrio molitor	*Foeniculum vulgare*	Umbrelliferae	Prodotto commerciale	Cosimi et al., 2009
Tribolium castaneum	*Laurelia sempervirens*	Atherospermataceae	corteccia e foglie	Zapata e Smagghe, 2010
Cryptolestes ferrugineus	*Laurus nobilis*	Lauraceae	foglie	Cosimi et al., 2009
Rhyzopertha dominica	*Laurus nobilis*	Lauraceae	Prodotto commerciale	Rozman et al., 2007
Sitophilus oryzae	*Laurus nobilis*	Lauraceae	Prodotto commerciale	Rozman et al., 2007
Sitophilus zeamais	*Laurus nobilis*	Lauraceae	foglie	Cosimi et al., 2009
Tenebrio molitor	*Laurus nobilis*	Lauraceae	foglie	Cosimi et al., 2009
Tribolium castaneum	*Laurus nobilis*	Lauraceae	Prodotto commerciale	Rozman et al., 2007

Rhyzopertha dominica	*Lavandula angustifolia*	Lamiaceae	Prodotto commerciale	Rozman et al., 2007
Sitophilus oryzae	*Lavandula angustifolia*	Lamiaceae	Prodotto commerciale	Rozman et al., 2007
Tribolium castaneum	*Lavandula angustifolia*	Lamiaceae	Prodotto commerciale	Rozman et al., 2007
Cryptolestes ferrugineus	*Lavandula hybrida*	Lamiaceae	Prodotto commerciale	Cosimi et al., 2009
Sitophilus zeamais	*Lavandula hybrida*	Lamiaceae	Prodotto commerciale	Cosimi et al., 2009
Tenebrio molitor	*Lavandula hybrida*	Lamiaceae	Prodotto commerciale	Cosimi et al., 2009
Sitophilus zeamais	*Lippia alba*	Verbenaceae	foglie e fiori	Nerio et al., 2009
Sitophilus zeamais	*Lippia origanoides*	Verbenaceae	foglie e fiori	Nerio et al., 2009
Sitophilus zeamais	*Mentha longifolia*	Lamiaceae		Odeyemi et al., 2008
Tribolium castaneum	*Mentha microphylla*	Lamiaceae		Mohamed e Abdelgaleil, 2008
Sitophilus zeamais	*Myristica fragrans*	Myristicaceae	semi	Huang et al., 1997
Tribolium castaneum	*Myristica fragrans*	Myristicaceae	semi	Huang et al., 1997
Tribolium castaneum	*Nigella sativa*	Ranunculaceae	frutti secchi	Chaubey, 2007
Callosobruchus maculatus	*O. gratissimum*	Labiatae	piante intere	Keita et al., 2000
Callosobruchus maculatus	*Ocimum basilicum*	Labiatae	piante intere	Keita et al., 2000
Callosobruchus maculatus	*Ocimum basilicum*	Labiatae	piante intere	Pascual-Villalobos e Ballesta-Acosta, 2003
Cryptolestes pusillus	*Ocimum basilicum*	Labiatae	foglie	Lopez et al., 2008
Rhyzopertha dominica	*Ocimum basilicum*	Labiatae	foglie	Lopez et al., 2008
Sitophilus oryzae	*Ocimum basilicum*	Labiatae	foglie	Owusu, 2001
Sitophilus oryzae	*Ocimum basilicum*	Labiatae	foglie	Lopez et al., 2008
Tribolium castaneum	*Ocimum basilicum*	Labiatae	foglie	Owusu, 2001
Callosobruchus chinensis	*Ocimum gratissimum*	Labiatae	piante intere	Ogendo et al., 2008
Oryzaephilus surinamensis	*Ocimum gratissimum*	Labiatae	piante intere	Ogendo et al., 2008
Rhyzopertha dominica	*Ocimum gratissimum*	Labiatae	piante intere	Ogendo et al., 2008
Sitophilus oryzae	*Ocimum gratissimum*	Labiatae	piante intere	Ogendo et al., 2008
Tribolium castaneum	*Ocimum gratissimum*	Labiatae	piante intere	Ogendo et al., 2008
Rhyzopertha dominica	*Ocimum kenyense*	Labiatae	parti aeree	Bekele e Hassanali, 2001
Sitophilus zeamais	*Ocimum kilimandscharicum*	Labiatae	parti aeree	Bekele e Hassanali, 2001
Sitophilus oryzae	*Ocimum viride*	Labiatae	foglie	Owusu, 2001
Tribolium castaneum	*Ocimum viride*	Labiatae	foglie	Owusu, 2001
Sitophilus granarius	*Origanum acutidens*	Lamiaceae	piante intere	Kordali et al., 2008
Tribolium confusum	*Origanum acutidens*	Lamiaceae	piante intere	Kordali et al., 2008

Ephestia kuehniella	*Origanum syriacum*	Lamiaceae	foglie	Tunç et al., 2000
Tribolium confusum	*Origanum syriacum*	Lamiaceae	foglie	Tunç et al., 2000
Ephestia kuehniella	*Pimpinella anisum*	Umbrelliferae	semi	Tunç et al., 2000
Tribolium confusum	*Pimpinella anisum*	Umbrelliferae	semi	Tunç et al., 2000
Sitophilus zeamais	*Plectranthus glandulosus*	Labiatae	foglie	Nukenine et al., 2010
Ephestia kuehniella	*Rosmarinus officinalis*	Lamiaceae	foglie	Tunç et al., 2000
Rhyzopertha dominica	*Rosmarinus officinalis*	Lamiaceae	Prodotto commerciale	Rozman et al., 2007
Sitophilus oryzae	*Rosmarinus officinalis*	Lamiaceae	Prodotto commerciale	Rozman et al., 2007
Sitophilus zeamais	*Rosmarinus officinalis*	Lamiaceae	foglie e fiori	Nerio et al., 2009
Tribolium castaneum	*Rosmarinus officinalis*	Lamiaceae	Prodotto commerciale	Rozman et al., 2007
Tribolium confusum	*Rosmarinus officinalis*	Lamiaceae	foglie	Tunç et al., 2000
Sitophilus zeamais	*Tagetes lucida*	Asteraceae	foglie e fiori	Nerio et al., 2009
Sitophilus oryzae	*Tagetes terniflora*	Asteraceae	foglie	Stefanazzi et al., 2011
Tribolium castaneum	*Tagetes terniflora*	Asteraceae	foglie	Stefanazzi et al., 2011
Sitophilus oryzae	*Theobroma cacao*	Sterculiaceae	semi	Owusu, 2001
Tribolium castaneum	*Theobroma cacao*	Sterculiaceae	semi	Owusu, 2001
Rhyzopertha dominica	*Thymus vulgaris*	Lamiaceae	Prodotto commerciale	Rozman et al., 2007
Sitophilus oryzae	*Thymus vulgaris*	Lamiaceae	Prodotto commerciale	Rozman et al., 2007
Tribolium castaneum	*Thymus vulgaris*	Lamiaceae	Prodotto commerciale	Rozman et al., 2007
Tribolium castaneum	*Trachyspermum ammi*	Umbrelliferae	frutti secchi	Chaubey, 2007
Oryzaephilus surinamensis	*varie specie*	varie	foglie e fusti	Shaaya et al., 1997
Rhyzopertha dominica	*varie specie*	Myrtaceae	non specificato	Lee et a., 2004
Rhyzopertha dominica	*varie specie*	varie	foglie e fusti	Shaaya et al., 1997
Sitophilus oryzae	*varie specie*	Myrtaceae	non specificato	Lee et a., 2004
Sitophilus oryzae	*varie specie*	varie	foglie e fusti	Shaaya et al., 1997
Tribolium castaneum	*varie specie*	Myrtaceae	non specificato	Lee et a., 2004
Tribolium castaneum	*varie specie*	varie	foglie e fusti	Shaaya et al., 1997
Rhyzopertha dominica	*Zingiber officinale*	Zingiberaceae	rizomi	Ukeh e Umoetok, 2011
Tribolium castaneum	*Zingiber officinale*	Zingiberaceae	rizomi	Ukeh e Umoetok, 2011
Sitophilus zeamais	*Zingiber zerumbet*	Zingiberaceae	rizomi	Suthisut et al., 2011
Tribolium castaneum	*Zingiber zerumbet*	Zingiberaceae	rizomi	Suthisut et al., 2011

7. BIBLIOGRAFIA

Anwar F., Ali M., Hussain A.I., Shahid M. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Pakistan. *Flavour and Fragrance Journal* 24(4), 170-176.

Asensio C.M., Nepote V., Grosso N.R. 2011. Chemical Stability of Extra-Virgin Olive Oil Added with Oregano Essential Oil. *Journal of Food Science* 76, S445-S450.

Atarés L., Bonilla J., Chiralt A. 2010. Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering* 100, 678–687.

Aznar M., Vera P., Canellas E., Nerín C., Mercea P. and Störmer A. 2011. Composition of the adhesives used in food packaging multilayer materials and migration studies from packaging to food. *Journal of Materials Chemistry* 21, 4358-4370.

Baranauskiené R., Venskutonis P.R., Dewettinck K., Verhé R. 2006. Properties of oregano (*Origanum vulgare* L.), citronella (*Cymbopogon nardus* G.) and marjoram (*Majorana hortensis* L.) flavors encapsulated into milk protein-based matrices. *Food Research International* 39, 413–425.

Batth S.S. 1970. Insect penetration of aluminium-foil packages. Journal of Economic Entomology 63, 653-655.

Bauer K., Garbe D., Surburg H. 2001. Common Fragrance and Flavor Materials: Preparation and Uses. Wiley-VCH, Weinheim, p. 293.

Becerril R., Gómez-Luz R., Goñi P., López P., Nerín C. 2007. Combination of analytical and microbiological techniques to study the antimicrobial activity of a new active food packaging containing cinnamon or oregano against *E. coli* and *S. aureus*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388, 1003-1011.

Becker K., Koszinowski J., Piringer O. 1987. Permeation von Riech- und Aromastoffen durch Polymere, *Parfümerie u. Kosmetik*, 278, 3-11.

Bekele J., Hassanali A. 2001. Blend effects in the toxicity of the essential oil constituents of Ocimum kilimandscharicum and Ocimum kenyense (Labiateae) on two post-harvest insect pests. *Phytochemistry* 57, 385–391.

Botsoglou N.A., Christaki E., Fletouris D.J., Florou-Paneri P., Spais A.B. 2002. The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. *Meat Science* 62, 259–265.

Bowditch T.G. 1997. Penetration of polyvinyl chloride and polypropylene packaging films by *Ephestia cautella* (Lepidoptera: Pyralidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae, and *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae) adults. Stored Prod. Quarant. Entomol. 90: 1028.

Bowles E.J. 2003. The chemistry of aromatherapeutic oils. Allen & Unwin.

Burt S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.

Canellas E., Aznar M., Mercea P., Nerín C. 2010. Partition and diffusion of volatile compounds from acrylic adhesives used for food packaging multilayers manufacturing. *Journal of Materials Chemistry* 20, 5100-5109.

Çalikoğlu E., Kiralan M., Bayrak A. 2009. Effect of direct applications of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves on oxidative stability of sunflower oil during accelerated storage. *Journal of Food Quality* 32, pp. 566-576.

Chaubey M.K. 2007. Insecticidal activity of *Trachyspermum ammi* (Umbelliferae), *Anethum graveolens* (Umbelliferae) and *Nigella sativa* (Ranunculaceae) essential oils against stored-product beetle *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *African Journal of Agricultural Research* 2, 596-600.

Cline L.D. 1978a. Clinging and climbing ability of larvae of eleven species of stored product insect on nine flexible packaging materials and glass. *Journal of Economic Entomology* 71, 689-691.

Cline L.D. 1978b. Penetration of seven common flexible packaging materials by larvae and adults of eleven species of stored product insects. *Journal of Economic Entomology* 71, 726-729.

Cline L.N. e Press J.W. 1990. Reduction in almond moth (Lepidoptera: Pyralidae) infestations using commercial packaging of foods in combination with parasitic wasp, *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Economic Entomology* 83, 1110-1113.

Copping L.G., Menn J.J. 2000. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science* 56, 651–676.

Cosimi S., Rossi E., Cioni P.L., Canale A. 2009. Bioactivity and qualitative analysis of some essential oils from Mediterranean plants against stored-product pests: evaluation of repellency against *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Tenebrio molitor* (L.). *Journal of Stored Products Research* 45, 125-132.

Dambolena J.S., Zunino M.P., López A.G., Rubinstein H.R., Zygadlo J.A., Mwangi J.W., Thoithi G.N., Kibwage I.O., Mwalukumbi J.M., Kariuki S.T. 2010a. Essential oils composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from Kenya and their inhibitory effects on growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11, 410-414.

Dambolena J.S., Zunino M.P., Lucini E.I., Olmedo R., Banchio E.,. Bima P.J., Zygadlo J.A. 2010b. Total phenolic content, radical scavenging properties, and essential oil composition of origanum species from different populations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(2), 1115-1120.

Domenichini G., Forti D. 1975. Research on packaging materials resistant to the attacks of insects. Presented at *1st Symposium on Control of Parasites in the Food Industry and Food Protection*. Piacenza, Italy.

Dušan F., Marián S., Katarína D., Dobroslava B. 2006. Essential oils—their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicology in Vitro* 20, 1435-1445.

Essig E.O., Hoskins W.M., Linsley E.G., Michelbacher A.E., Smith R.F. 1943. A report on the penetration of packaging materials by insects. *Journal of Economic Entomology* 36: 822-826.

Estévez M., Cava R. 2006. Effectiveness of rosemary essential oil as an inhibitor of lipid and protein oxidation: Contradictory effects in different types of frankfurters. *Meat Science* 72, 348–355.

European Patent EP1657181 Antimicrobial packaging based on the use of natural extracts and the process to obtain this packaging.

Exarchou V., Nenadis N., Tsimidou M., Gerothanassis I. P., Troganis A., Boskou D. 2002. Antioxidant Activities and Phenolic Composition of Extracts from Greek Oregano, Greek Sage, and Summer Savory. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(19), 5294-5299.

Ezquerro O., Pons B., Tena M.T. 2003. Multiple headspace solid-phase microestraction for the quantitative determination of volatile organic compounds in multilayer packagings. *Journal of Chromatography* A 999**,** 155-164.

FAO, 1995. Flavours and fragrances of plant origin. Rome.

Fasseas M.K., Mountzouris K.C., Tarantilis P.A., Polissiou M., Zervas G. 2007. Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. *Food Chemistry* 106, 1188–1194.

Fu Y., Zu Y., Chen L., Shi X., Wang Z., Sun S., Efferth T. 2007. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytotherapy Research* 21(10), 989-994.

Gammariello D., Di Giulio S., Conte A., Del Nobile M.A. 2008. Effects of natural compounds on microbial safety and sensory quality of fior di latte cheese, a typical italian cheese. *Journal of Dairy Science* 91, 4138-4146.

Garcia C.C., Talarico L., Almeida N., Colombres S., Duschatzky C., Damonte E.B. 2003. Virucidal activity of essential oils from aromatic plants of San Luis, Argentina. *Phytotherapy Research* 17, 1073-1075.

Garcia M., Donadel O.J, Ardanaz C.E, Tonn C.E., Sosa M.E. 2005. Toxic and repellent effects of *Baccharis salicifolia* essential oil on *Tribolium castaneum. Pest Management Science* 61, 612–618.

Gerhardt P.D., Lindgren D.L. 1954. Penetration of various packaging films by common stored-product insects. *Journal of Economic Entomology* 47: 282-287.

Gerhardt P.D. and Lindgren D.L. 1955. Penetration of additional packaging films by common stored-product insects. *Journal of Economic Entomology* 48, 108-109.

Germinara G.S., Conte A., Lecce L., Di Palma A., Del Nobile M.A. Propionic acid in bio-based packaging to prevent *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera, Dryophthoridae) infestation in cereal products. 2010. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11(3), 498-502.

Goel D., Goel R., Singh V., Ali M., Mallavarapu G.R., Kumar S. 2007. Composition of the essential oil from the root of Artemisia annua. *Journal of Natural Medicines* 61:4, 458-461

Goñi P., López P., Sánchez C., Gómez-Lus R., Becerril R., Nerín C. 2009. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry* 116, 982–989

Guenther E. 1972. The essential oils. Krieger Publishing Company, Florida, USA.

Helander I.K., Alakomi H.L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E.J., Gorris L.G.M., von Wright A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 3590–3595.

Highland H.A. 1984. Insect infestation of packages. In "Insect Management for Food Storage and Processing". F.J. Baur (Ed.), American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota.

Highland H.A. 1991. Protecting packages against insects. In "Ecology and Management of Food-Industry Pests". J.R. Gorham (Ed.), p. 345. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia.

Hosseini M.H., Razavi S.H.,Mousavi M.A. 2009. Antimicrobial, physical and mechanical properties of chitosan-based films incorporated with thyme, clove and cinnamon essential oils. *Journal of Food Processing and Preservation* 33, 727–743.

Ho S.H., Koh L., Ma Y., Huang Y., Sim K.Y. 1996. The oil of garlic, *Allium sativum* L. (Amaryllidaceae), as a potential grain protectant against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *Postharvest Biology and Technology* 9, 41-48.

Hou X., Field P. and Taylor W. 2004. The effect of repellents on penetration into packaging by stored-product insects. *Journal of Stored Products Research* 40, 47-54.

Huang Y., Ho S.H. 1998. Toxicity and antifeedant activities of cinnamaldehyde against the grain storage insects, *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *Journal of Stored Products Research* 34, 11-17.

Huang Y., Tan J., Kini R.M., Ho S.H. 1997. Toxic and antifeedant action of nutmeg oil against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *Journal of Stored Products Research* 33, 289-298.

Huang Y., Lam S.L., Ho S.H. 2000. Bioactivities of essential oils from *Elletaria cardamomum* (L.) to *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of Stored Products Research* 36: 107–117.

Hussain A.I., Anwar F., Nigam P.S., Ashraf M., Gilani A.H. 2010. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90(11), 1827-1836.

Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E., & Vivanco, J. M. 2003. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry*, 83, 547–550.

Katiyar S.K., Agarwal R., Mukhtar H. 1996. Inhibition of tumor promotion in SENCAR mouse skin by ethanol extract of *Zingiber officinale* rhizome. *Cancer Research* 56, 1023-1030.

Kordali S., Cakir A., Ozer H., Cakmakci R., Kesdek M., Mete E. 2008. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresource Technology* 99, 8788–8795.

Kordali S., Aslan I., Çalmaşur O., Cakir A. 2006. Toxicity of essential oils isolated from three *Artemisia* species and some of their major components to granary weevil, *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Industrial Crops and Products* 23 162–170.

Koszinowski J., Piringer O. 1987. Food/package compatibility and migration, *Journal of Plastic Sheeting* 5, 96-115.

Islam M.S., Mahbub Hasan M., Xiong W.,· Zhang S.C., Lei L. 2009. Fumigant and repellent activities of essential oil from *Coriandrum sativum* (L.) (Apiaceae) against red flour beetle *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Pest Science*, 82, 171–177.

Lee B.H., Annis P.C., Tumaalii F., Choi W.S. 2004. Fumigant toxicity of essential oils from the Myrtaceae family and 1,8-cineole against 3 major stored-grain insects. *Journal of Stored Products Research* 40, 553–564

Lee K.G., Shibamoto T. 2002. Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4947–4952.

Lee S.J., Umano K., Shibamoto T., Lee K.G. 2005. Identification of volatile components in basil (Ocimum basilicum L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry* 91, 131–137.

Licciardello F., Del Nobile M.A., Spagna G., Muratore G. 2009. Scalping of ethyloctanoate and linalool from a model wine into plastic films. *LWT – Food Science and Technology*, 42, 1065-1069.

Licciardello F., Cocuzza G.E., Russo A., Muratore G. 2010. Quality maintenance performance and resistance to *Tribolium castaneum* and *Plodia interpunctella* penetration of an alternative packaging material for semolina, *Italian Journal of Food Science* 22(4), 461-466.

Liu Z.L., Ho S.H.. 1999. Bioactivity of the essential oil extracted from *Evodia rutaecarpa* Hook f. et Thomas against the grain storage insects, *Sitophilus zeamais* Motsch. and *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of Stored Products Research* 35, 317-328.

López P., Huerga M.A., Batlle R., Nerín C. 2006. Use of solid phase microextraction in diffusive sampling of the atmosphere generated by different essential oils. *Analytica Chimica Acta* 559, 97-104.

Lopez M.D., Jordan M.J., Pascual-Villalobos M.J. 2008. Toxic compounds in essential oils of coriander, caraway and basil active against stored rice pests. *Journal of Stored Products Research* 44, 273–278.

López P., Sánchez C., Batlle R., Nerín C. 2005. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungi strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 6939–6946.

López P., Sánchez C., Batlle R., Nerín C. 2007a. Vapor-phase activities of cinnamon, thyme and oregano essential oils and key constituents against food-borne microorganisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 4348–4356.

López P., Sánchez C., Batlle R., Nerín C. 2007b. Development of flexible antimicrobial films using essential oils as active agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 8814-8824.

Madsen H.L., Nielsen B.R., Bertelsen G., Skibsted L.H. 1996. Screening of antioxidative activity of spices. A comparison between assays based on ESR spin trapping and electrochemical measurement of oxygen consumption. *Food Chemistry*, 57, 331–337.

Mastromatteo M., Lucera A., Sinigaglia M., Corbo M.R. 2009. Combined effects of thymol, carvacrol and temperature on the quality of non conventional poultry patties. *Meat Science* 83, 246–254.

Mejlholm O., Dalgaard P. 2002. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism Photobacterium phosphoreum in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology* 34, 27– 31.

Mercea P. Appendix 1, Table 3 in "Plastic Packaging Materials for Food" Eds. O.G. Piringer and A.L. Baner, Wiley-VCH, Weinheim, 2000, pp.511.

Misharina T.A., Samusenko A.L.. 2008. Antioxidant properties of essential oils from lemon, grapefruit, coriander, clove, and their mixtures. *Applied Biochemistry and Microbiology* 45, 438–442.

Mohamed M.I.E., Abdelgaleil A.M.S. 2008. Chemical composition and insecticidal potential of essential oils from Egyptian plants against Sitophilus oryzae (L.) (Coleoptera: Curculionidae) and Tribolium castaneum (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Applied Entomology and Zoology* 43, 599–607.

Montero-Prado P., Rodriguez-Lafuente A., Nerin C. 2011. Active label-based packaging to extend the shelf-life of "Calanda" peach fruit: changes in fruit quality and enzymatic activity. *Postharvest Biology and Technology* 60, 211–219.

Keita S.M., Vincent C., Schmit J.P., Ramaswamy S., Bélanger A. 2000. Effect of various essential oils on *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *Journal of Stored Products Research* 36, 355-364.

Mullen M.A. 1995. Pest-proof packaging and minimizing pest populations, In Proceedings of the 1995 Food Processing Pest Management Workshop, 17 August, 1995, pp. 3945. Oklahoma State University Cooperative Extension Service Circular.

Navarro S., Zehavi D., Angel S. and Finkelman S. 2007. Natural nontoxic insect repellent packaging materials. In "Intelligent and Active Packaging for Fruits and Vegetables". C.L. Wilson (Ed.), p. 336. Taylor and Francis, CRC Press, New York, USA.

Nerio L.S., Olivero-Verbel J., Stashenko E.E. 2009. Repellent activity of essential oils from seven aromatic plants grown in Colombia against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera). *Journal of Stored Products Research* 45, 212-214.

Nerio L.S., Olivero-Verbel J., Stashenko E.E. 2010.Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology* 101, 372-378.

Nukenine E.N., Adler C., Reichmuth C. 2010. Bioactivity of fenchone and *Plectranthus glandulosus* oil against *Prostephanus truncatus* and two strains of *Sitophilus zeamais*. *Journal of Applied Entomology* 134, 132-141.

Obeng-Ofori D., Reichmuth C., Bekele A.J., Hassanali A. 1998. Toxicity and protectant potential of camphor, a major component of essential oil of *Ocimum kilimandscharicum* against four stored product beetles. *International Journal of Pest Management* 44, 203-209.

Odeyemi O.O., Masika P., Afolayan A.J. 2008. Insecticidal activities of essential oil from the leaves of *Mentha longifolia* L. subsp. *capensis* against *Sitophilus zeamais* (Motschulsky) (Coleoptera: Curculionidae). *African Entomology* 16, 220–225.

Ogendo J.O., Kostyukovsky M, Ravid U., Matasyoh J.C., Deng A. L., Omolo E.O., Kariuki S.T., Shaaya E. 2008. Bioactivity of *Ocimum gratissimum* L. oil and two constituents against five insect pests attacking stored food products. *Journal of Stored Products Research* 44, 328-334.

Olivero-Verbel J., Nerio L.S., Stashenko E.E. 2010. Bioactivity against *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae) of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils grown in Colombia. *Pest Management Science* 66: 664–668.

Olmedo R., Nipote V., Mestrallet M.G., Grosso N.R. 2008.Effect of the essential oil addition on the oxidative stability of fried–salted peanuts. *International Journal of Food Science and Technology* 43, 1935–1944.

Ouattara B., Simard R.E., Holley R.A., Piette G., Begin A. 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology* 37, 155–162.

Owusu E.O. 2001. Effect of some Ghanaian plant components on control of two stored-product insect pests of cereals. *Journal of Stored Products Research* 37, 85-91.

Özcan M.M., Arslan D. 2011. Antioxidant effect of essential oils of rosemary, clove and cinnamon on hazelnut and poppy oils. *Food Chemistry* 129, 171-174.

Pascual-Villalobos M.J., Ballesta-Acosta M.C. 2003. Chemical variation in an *Ocimum basilicum* germplasm collection and activity of the essential oils on *Callosobruchus maculatus. Biochemical Systematics and Ecology* 31, 673–679.

Paster N., Menasherov M., Ravid U., Juven B. 1995. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi-attacked stored grain. *Journal of Food Protection* 58, 81–85.

Penna S.C., Medeiros M.V., Aimbire F.S.C., Faria-Neto H.C.C., Sertie J.A.A., Lopes-Martins R.A.B. 2003. Antiinflammatory effect of the hydralcoholic extract of *Zingiber officinale* rhizomes on rat paw and skin edema. *Phytomedicine* 10, 381-385.

Pichersky E., Noel J.P., Dudareva N. 2006. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science* 311, 808–811.

Radwan M.N., Allin G.P. 1997. Controlled-release insect repellent device. US Patent 5,688,509.

Rajendran S., Sriranjini V. 2008. Plant products as fumigants for stored-product insect control. *Journal of Stored Products Research* 44(2), 126-135.

Regolamento (CE) n. 1935/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 27 Ottobre 2004 concernente i materiali attivi e intelligenti destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari che abroga le Direttive 80/590/CEE e 89/109/CEE.

Regolamento (CE) n. 450/2009 della Commissione del 29 maggio 2009 concernente i materiali attivi e intelligenti destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari.

Riudavets J., Salas I. and Pons M.J. 2007. Damage characteristics produced by insect pests in packaging film. *Journal of Stored Products Research* 43, 564-570.

Rodríguez A., Battle R., Nerín C. 2007. The use of natural essential oils as antimicrobial solutions in paper packaging. Part II. *Progress in Organic Coatings* 60, 33-38.

Rozman V., Kalinovic I., Korunic Z. 2007. Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and Lauraceae to three stored-product insects. *Journal of Stored Products Research* 43, 349-355.

Runyoro D., Ngassapa O., Vagionas K., Aligiannis N., Graikou K., Chinou I. 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of four *Ocimum* species growing in Tanzania. *Food Chemistry* 119, 311–316.

Şahin F., Güllüce M.; Daferera D., Sökmen A., Sökmen M., Polissiou M., Agar G., Ozer H. 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control* 15(7), 549-557.

Saillard P., Mercea P. 2010. Diffusion of organic compounds in paper, Reports of the 6th plenary meeting, MIGRESIVES EU-Project COLL-CT-030309, Reims/France, 14-15 October.

Salmieri S., Lacroix M. 2006. Physicochemical properties of Alginate/Polycaprolactone- based films containing essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54, 10205-10214.

Santos J.P. 2006. Alternatives to chemical control of stored-product insects on small farms in the tropics. Proceedings of the 9th International Working Conference on Stored Product Protection, 15–18 October 2006, Campinas, Sao Paulo, Brazil. ABRAPOS, Brazil, pp. 663-673.

Shaaya E., Kostjukovsky M., Eilberg J., Sukprakarn C. 1997. Plant oils as fumigants and contact insecticides for control of stored-product insects. *Journal of Stored Products Research* 33, 7-15.

Singh N., Singh R.K., Bhunia A.K., Stroshine R.L. 2002. Efficacy of chlorine dioxide, ozone and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce and baby carrots. *Lebensmittelwissenchaften und Technologien* 35, 720– 729.

Solomakos N., Govaris A., Koidis P., Botsoglou N. 2008. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. *Meat Science* 80, 159-166.

Soylu E.M., Soylu S., Kurt S. 2006. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia* 161, 119-128.

Sreenathan V.R., Iyengar N.V.R., Narasimhan K.S., Majumder S.K. 1960. Studies on insect resistance of packaging materials-cellulose and polyethylene films. *Food Science* 9: 199.

Srinivasa Gopal T.K., Viswanatan Nair P.G., Kandoran M.K., Prabhu B.V., Gopakumar K. 1998. Shelf life of dried anchoviella in flexible packaging materials. *Food Control* 9(4), 205-209.

Stefanazzi N., Stadlerb T., Ferrero A. 2011. Composition and toxic, repellent and feeding deterrent activity of essential oils against the stored-grain pests *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). *Pest Management Science* 67, 639-646.

Süss L., Locatelli D.P. 2001. "I parassiti delle Derrate. Riconoscimento e Gestione delle Infestazioni delle Industrie Alimentari", p. 364. Il Sole 24 Ore, Edagricole, Bologna, Italy.

Suthisut D., Fields P.G., Chandrapatya A. 2011. Fumigant toxicity of essential oils from three Thai plants (Zingiberaceae) and their major compounds against *Sitophilus zeamais*, *Tribolium castaneum* and two parasitoids. *Journal of Stored Products Research* 47, 222-230.

Tapondjou A.L., Adler C., Fontem D.A., Bouda H., Reichmuth C. 2005. Bioactivities of cymol and essential oils of *Cupressus sempervirens* and *Eucalyptus saligna* against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium confusum* du Val. *Journal of Stored Products Research* 41, 91-102.

Tena M.T., Carrillo J.D. 2007. Multiple solid-phase microextraction: Theory and applications. *Trends in Analytical Chemistry* 26(3), 206-214.

Tosa V., Kovacs K., Mercea P., Piringer O. 2008. A finite difference method for modelling migration of impurities in multilayer systems. AIP Confernce Proceedings, 1048, 802-805.

Trojakova L., Reblova Z., Nguyen H.T.T., Pokorny J. 2001. Antioxidant activity of rosemary and sage extracts in rapeseed oil. *Journal of Food Lipids*, 8, 1-13.

Trongtokit Y., Rongsriyam Y., Komalamisra N., Apiwathnasorn C. 2005. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. Phytotherapy Research 19, 303-309.

Tunç I., Berger B.M., Erler F., Dağli F. 2000. Ovicidal activity of essential oils from five plants against two stored-product insect. *Journal of Stored Products Research* 36, 161-68.

Ukeh D.A, Umoetok S.B.A. 2011. Repellent effects of five monoterpenoid odours against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Rhyzopertha dominica* (F.) in Calabar, Nigeria. *Crop Protection* 30, 1351-1355.

Van de Braak S.A.A.J., Leijten G.C.J.J. 1999. Essential oils and oleoresins: A survey in the Netherlands and other major markets in the European Union. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, p. 116.

Vera P., Aznar M., Mercea P., Nerín C. 2011. Study of hotmelt adhesives used in food packaging multilayer laminates. Evaluation of the main factors affecting migration to food. *Journal of Materials Chemistry* 21, 420-431.

Viuda-Martos M., El-Nasser A., El Gendy G.S., Sendra E., Fernandez-Lopez J., El Razik K.A.A., Omer E.A., Perez-Alvarez J.A. 2010a. Chemical composition and antioxidant and anti-listeria activities of essential oils obtained from some egyptian plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 9063-9070.

Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Sánchez-Zapata E., Fernández-López J., Pérez-Álvarez J.A. 2010b. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour and Fragrance Jounal* 25, 13–19.

Vrinda Menon K., Garg S.R. 2001. Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese. *Food Microbiology* 18, 647– 650.

Wan J., Wilcock A., Coventry M.J. 1998. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology* 84, 152–158.

Wang J., Zhu F., Zhou X.M., Niu C.Y., Lei C.L. 2006. Repellent and fumigant activity of essential oil from *Artemisia vulgaris* to *Tribolium castaneum* (herbst) (coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Stored Product Research* 42, 339-347.

Wang L., Liu F., Jiang Y., Chai Z., Li P., Cheng Y., Jing H., Leng X. 2011. Synergistic antimicrobial activities of natural essential oils with chitosan films. Journal of Agricultural and Food Chemistry, *in press.*

Wang W., Wu N., Zu Y.G., Fu Y.J. 2008. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chemistry* 108, 1019–1022.

Zapata N., Smagghe G. 2010. Repellency and toxicity of essential oils from the leaves and bark of *Laurelia sempervirens* and *Drimys winteri* against *Tribolium castaneum*. *Industrial Crops and Products* 32, 405–410.

Zygadlo J.A., Juliani H.R. 2003. Recent progress in medicinal plants. In: Majundar, D.K., Govil, J.N., Singh, V.K., Shailaja, M.S., Gangal, S.V. (Eds.), Phytochemistry and Pharmacology II, VIII. Studium Press LLC, Texas, pp. 273–281.