

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102011902003820A1

Publication Date

20130609

Applicant

ESSEOQUATTRO SPA

Title

IMBALLAGGIO PER ALIMENTI FRESCHI DI ORIGINE ANIMALE CHE
INIBISCE LO SVILUPPO DELLE AMMINE BIOGENE.

Descrizione dell'invenzione industriale avente per titolo: Imballaggio per alimenti freschi di origine animale che inibisce lo sviluppo delle ammine biogene

A nome di: ESSEOQUATTRO S.P.A.

5 Di nazionalità: italiana

Con domicilio in: Frazione Camazzole 1/A – 35010 Carmignano di Brenta

Inventori: Roberta ORTOLANI

Gianni SAGRATINI

Veronica SIROCCHI

10 Sauro VITTORI

Oggetto dell'invenzione

La presente invenzione si riferisce a un imballaggio per alimenti freschi, in particolare per carne e pesce. Tale sistema ha la prerogativa di inibire lo sviluppo delle ammine biogene e di prolungare le caratteristiche di freschezza degli alimenti, la conservabilità e il mantenimento delle caratteristiche organolettiche.

15

Sfondo dell'invenzione

Alimenti freschi di origine animale: carne e pesce

La carne e il pesce sono tra gli alimenti fondamentali nella dieta umana e di elevato valore nutrizionale, soprattutto come fonte primaria di proteine di origine animale. Nella cosiddetta

20 dieta mediterranea, il pesce rappresenta un importante elemento nutrizionale.

Oltre a rappresentare una delle fonti principali di proteine e di aminoacidi essenziali, la carne è ricca anche di vitamine del gruppo B, di ferro emico e di vari minerali. Se da una parte le caratteristiche nutrizionali della carne sono note ed eccellenti (le proteine contenute sono ad alto valore biologico), dall'altra va detto che la sua conservazione e quindi il mantenimento dei suoi principi nutritivi richiede particolare attenzione e condizioni attentamente controllate.

25 L'elevato contenuto in acqua (50-79%) e proteine (15-23%) della carne fresca fa di questo alimento un ambiente ideale per lo sviluppo di microorganismi, soprattutto nei casi in cui le condizioni di macellazione prima e di conservazione poi determinano un elevato livello di contaminazione. Si può dire quindi che la carne possiede una vita utile (termine noto nel

30 settore della tecnologia alimentare anche come "shelf-life"), in termini di conservabilità abbastanza breve e ha bisogno di essere mantenuta a basse temperature per contenere le reazioni metaboliche dei tessuti e lo sviluppo e la proliferazione di microorganismi, sviluppo che è sempre accompagnato dalla produzione di sostanze secondarie che abbassano la qualità del prodotto stesso. Questa sua breve shelf-life può causare una serie di problemi e

inconvenienti derivanti dal trasporto e distribuzione del prodotto, se questi non vengono effettuati in condizioni ottimali.

5 Il pesce dal punto di vista nutritivo è un alimento eccellente per la sua facile digeribilità, per il notevole contenuto di proteine ad alto valore biologico, minerali e vitamine e per la particolare composizione della frazione lipidica. E' noto per l'alto contenuto di fosforo, ma soprattutto per la peculiare abbondanza di acidi grassi polinsaturi della serie omega-3, in particolare dell'acido eicosapentaenoico o EPA, precursore delle prostaglandine della serie 3, e dell'acido docososaenoico o DHA. Anche in questo caso, data la notevole importanza nutrizionale dell'alimento e la sua facile deperibilità, sono necessarie condizioni di
10 conservazione specifiche (basse temperature) e soprattutto costanti durante trasporto, stoccaggio e vendita, per rallentare la proliferazione microbica e i metabolismi dei tessuti. Anche il pesce, come e più della carne, è un alimento con una "shelf-life" alquanto breve se consumato fresco e per il quale è di estremo interesse commerciale poter incrementare la vita utile mantenendo inalterate le sue eccellenti caratteristiche nutrizionali.

15 *Ammine biogene*

Le ammine biogene sono dei composti basici azotati presenti negli organismi viventi, quindi negli alimenti (C. Ruiz-Capillas, F. Jimenez-Colmenero: Biogenic Amines in Meat and Meat Products; Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 44, 489-499 (2004)).

20 In base alla loro struttura chimica sono classificate in tre categorie: ammine aromatiche (istamina, tiramina, β -feniletilammina, triptamina), diammine alifatiche (putrescina e cadaverina), poliammine alifatiche (spermina, spermidina, agmantina) (T.A. Smith, Amines in Food, Food Chem., 6, 169-200, 1980; C. Ruiz-Capillas, F. Jimenez-Colmenero: Biogenic Amines in Meat and Meat Products; Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 44, 489-499 (2004)).

25 Le ammine biogene sono prodotte negli alimenti a base proteica sia per decarbossilazione degli amminoacidi (azione catalizzata dalle decarbossilasi presenti in alcuni microrganismi) sia mediante amminazione e transaminazione di aldeidi e chetoni (J. Karovicova, Z. Kohaidová, Biogenic Amines in Food, Chem. Pap., 59(1) 70-79 (2005)) sia mediante i normali metabolismi cellulari dei tessuti che costituiscono l'alimento stesso (S. Bardócz, Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. Trends Food
30 Sci Techn., 6, 341-346, 1995).

Elevate concentrazioni di ammine biogene negli alimenti possono costituire un rischio per il consumo dell'alimento stesso, provocando seri problemi gastro-intestinali, risposte pseudoallergiche e forti emicranie. In particolare, elevate concentrazioni di istamina possono
35 avere effetti negativi sul sistema cardiovascolare, provocando un abbassamento della pressione sanguigna, irritazioni cutanee e reazioni allergiche, mentre elevate quantità di tiramina causano rilascio di noradrenalina dal sistema nervoso simpatico, provocando un innalzamento della pressione sanguigna e forti emicranie. Anche spermina e spermidina sono state associate allo sviluppo di allergie alimentari. Sulla base dei loro effetti tossici

strettamente legati alla concentrazione nell'alimento, le ammine biogene sono considerate a tutti gli effetti un indicatore di qualità e di freschezza dei cibi, soprattutto di quelli a base proteica come carne e pesce, correlando una loro elevata concentrazione a uno scadimento delle proprietà nutrizionali dell'alimento stesso.

5 Oltre agli aspetti legati alla sicurezza alimentare, va anche sottolineato che la presenza di ammine biogene è strettamente legata alla qualità organolettica dell'alimento in questione; infatti elevate concentrazioni di ammine biogene modificano significativamente l'aroma dell'alimento, essendo esse stesse la principale causa di odori sgradevoli che rendono l'alimento meno attraente per il consumatore. Infine va anche detto che l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) è molto attenta all'aspetto ammine biogene negli alimenti e, recentemente (dicembre 2010, si veda EFSA Journal 2011; 9(10):2393 per quanto riguarda i prodotti alimentari fermentati) su sollecitazione degli Stati membri, ha lanciato un invito a ricercatori ed esperti del settore a presentare dati sui livelli di ammine biogene negli alimenti e a valutare i rischi connessi a tali sostanze.

15 Sulla base delle considerazioni suesposte, per allungare la vita di un alimento fresco (carne, pesce) diventa di cruciale importanza contenere lo sviluppo delle ammine biogene, così da mantenere il più a lungo possibile la sua freschezza e le sue proprietà nutrizionali intatte. Per fare ciò il mercato ha bisogno di imballaggi idonei e innovativi destinati alla conservazione di alimenti freschi di facile deperibilità come carne e pesce.

20 *Imballaggio attivo (“active packaging”)*

L'imballaggio alimentare (packaging) nasce con lo scopo di conservare gli alimenti, trasportarli in maniera pratica e sicura da un luogo all'altro, proteggerli dalla contaminazione biologica e chimica. Il moderno concetto di imballaggio funzionale è legato a quelle soluzioni di packaging nelle quali si prevede l'impiego di un materiale, un contenitore o un accessorio di imballaggio in grado di svolgere una funzione attiva ed aggiuntiva rispetto a quelle tradizionali di contenimento e generica protezione del prodotto.

Il concetto di imballaggio funzionale ad oggi si traduce in pratica con la realizzazione di un imballaggio attivo. Un packaging attivo si può realizzare utilizzando prodotti in grado di modificare la concentrazione di differenti composti volatili e gas presenti nell'atmosfera interna tra alimento e confezione mediante l'utilizzo di assorbitori di ossigeno, assorbitori e regolatori di umidità, assorbitori di anidride carbonica, assorbitori di etilene, emettitori di etanolo. Oltre a ciò, un “active” packaging può essere realizzato aggiungendo all'imballaggio delle sostanze che vengono rilasciate gradualmente nel tempo e che aumentano la conservabilità dell'alimento esercitando un'azione che può essere antimicrobica, antiossidante o di tipo enzimatico. Agenti antimicrobici aggiunti agli imballaggi sono ad esempio la nisina (antibiotico), i chitosani, il manganese, gli ossidi di zinco e magnesio, utilizzati per conservare la frutta fresca. Antiossidanti di sintesi aggiunti agli imballaggi contenenti cereali sono, ad esempio, il butilidrossitoluene (BHT) ed il butilidrossianisolo (BHA), mentre agenti ad attività enzimatica utilizzati in imballaggi di prodotti lattiero caseari sono la colesterolo

40 riduttasi e la glucosio ossidasi. Il mondo vegetale costituisce un'insostituibile fonte di

sostanze e mix di molecole che possono esercitare un'azione protettiva e conservativa nei confronti dell'alimento grazie alle loro proprietà antiossidanti e antimicrobiche. In particolare, gli estratti naturali e gli oli essenziali che derivano dalle piante sono ricchi di molecole volatili che possiedono queste spiccate azioni biologiche. Tra le piante più diffuse di cui sono state dimostrate in studi scientifici tali proprietà, dobbiamo considerare il *Rosmarinus officinalis* (rosmarino), l'*Origanum vulgare* (origano), la *Salvia officinalis* (salvia). L'azione antimicrobica viene attribuita a classi di composti che costituiscono la frazione volatile, come gli idrocarburi terpenici, i terpeni ossigenati, le aldeidi, i chetoni e gli esteri, o a sostanze specifiche come l'acido carnosico, il carnosolo, l'acido rosmarinico (contenute nel rosmarino) o ad altre come eugenolo, carvacrolo, timolo (contenute nell'origano).

È noto che gli oli essenziali di piante aromatiche rientrano nell'arte profumiera e cosmetica. È stata descritta l'incorporazione di alcuni di questi oli, tra cui il rosmarino, in complesse miscele per deodoranti per uso umano (WO 2011/084463).

Lo stato dell'arte riporta numerosi esempi di uso di sostanze di origine vegetale per prolungare la conservazione di alimenti freschi, in particolare carne e pesce. A parte gli usi tradizionali di spezie aromatiche, quali pepe e peperoncino, con attività antibatterica, gli oli essenziali hanno dimostrato di essere efficaci come antiossidanti e come antibatterici.

Nella letteratura, troviamo numerosi esempi di metodi di conservazione degli alimenti.

Come visto sopra, uno dei principali modi di prolungare la conservazione e la freschezza dell'alimento è di controllare, o meglio contenere la proliferazione della carica microbica, intesa come diretta a batteri, funghi, muffe o altri microrganismi contaminanti. Questo scopo viene perseguito o agendo direttamente sul microrganismo o sui fattori favorenti la sua proliferazione.

Uno dei primi esempi si trova nel brevetto GB 1465533, che tratta gli alimenti con una miscela di aldeide cinnamica, o anche con olio di cannella, in miscela con composti presenti nell'aglio, anche sotto forma di olio di aglio. Il trattamento si mostra particolarmente efficace contro funghi e muffe. Questo tipo di trattamento con oli aventi spiccate caratteristiche organolettiche, pone il problema che l'alimento trattato deve conservare il proprio sapore e aroma, che devono rimanere accettabili e riconoscibili dal consumatore.

JP 60070053 descrive una miscela di una sostanza in grado di assorbire l'ossigeno, e generare anidride carbonica, con una sostanza in grado di generare alcool (etanolo). Si citano l'acido ascorbico e un sale ferroso. La miscela è chiusa nell'imballaggio assieme all'alimento e sviluppa un'azione antibatterica.

WO 95/04481 descrive l'uso di un inibitore della fosfatasi derivato da una pianta e di un 5'-ribonucleoside, direttamente nell'alimento o sotto forma di condimento, per inibire il deterioramento del sapore e prolungarne la persistenza del sapore.

Vi sono numerosi esempi di uso nella conservazione degli alimenti di oli essenziali da piante aromatiche, noti per le loro attività antiossidante e antimicrobica.

GB 2357967 descrive prodotti per l'igiene orale per uso umano, oppure di cibo per animali domestici contenenti uno o più oli essenziali di citronella (*lemongrass*), lavanda e palissandro (*rosewood*) per l'inibizione selettiva di batteri anaerobi del cavo orale.

5 WO 03/009694 usa oli essenziali da una serie di piante in associazione con chitosano per l'inibizione di batteri patogeni per l'uomo e tratta i prodotti agricoli dopo il raccolto. Imballaggi impregnati con l'associazione sono anche descritti.

10 KR 20030015512 descrive una miscela per la conservazione dei prodotti del raccolto. In essa l'olio di rosmarino è citato come componente secondario in una complessa miscela i cui ingredienti attivi principali sono mostarda stabilizzata e/o estratti di rafano per la conservazione di prodotti ortofrutticoli. La miscela è incorporata in un imballaggio.

15 Miscele di vari oli essenziali estratti da piante sono descritte in WO 2004/076680 per un loro utilizzo come inibitori dello sviluppo batterica incorporando le miscele in vari prodotti, tra cui cosmetici e alimenti. Le piante da cui sono estratti gli oli sono *Origanum vulgare L.*, *Thymus vulgari L.*, *Cinnamomum zeylanicum Nees*, *Rosmarinus officinalis L.*, *Lavandula officinalis L.*, *Hydrastis Canadensis L.*, ed estratto di foglia di olivo.

L'attività antiossidante di diversi estratti di piante è descritta in EP 1477619 e il loro utilizzo in vernici per supporti alimentari. Una volta applicata la vernice al supporto, o imballo, le sostanze attive volatilizzano ed entrano in contatto con l'alimento.

20 EP 1657181 B1 si riferisce a un imballaggio antimicrobico formulato con estratti naturali e destinato alla conservazione degli alimenti. Questo documento descrive un formulato liquido attivo comprendente una resina di base, quale nitrocellulosa, acrilica, vinilica, che è scelta in funzione del tipo di imballaggio sul quale è applicata. Un solvente serve per conferire la necessaria fluidità al liquido attivo e altri additivi sono impiegati per dare flessibilità o altre caratteristiche al rivestimento. Gli estratti naturali sono a base di oli essenziali che contengono
25 gli agenti attivi, con opportuni fissativi per immobilizzarli sull'imballaggio e ne assicurano un rilascio controllato. Esempi di estratti sono cannella, zenzero, chiodo di garofano, rosmarino, origano, aneto, basilico. La descrizione è alquanto generica e non vengono specificati gli alimenti cui è destinata la composizione. Le prove di azione antimicrobica sono effettuate *in vitro* su ceppi batterici selezionati e non sull'alimento tale e quale, in questo modo non si può
30 dedurre che l'azione antibatterica si svolga in un ambiente più complesso e meno controllato quale un alimento fresco tenuto nel normale stato di conservazione domestica. L'incorporazione nell'imballaggio della formulazione contenente gli agenti attivi antibatterici è esemplificata con impregnazione, rivestimento e spruzzatura. Non viene data alcuna limitazione particolare al tipo di imballaggio sul quale applicare la formulazione antibatterica.
35 Inoltre, in questo riferimento non si fa il minimo cenno alle ammine biogene, ma il problema è esclusivamente la contaminazione batterica. Gli stessi inventori hanno poi perfezionato questo tipo di imballaggio incorporando gli oli essenziali nella paraffina, come descritto in EP 2025620. L'attività antimicrobica è mostrata sulle fragole.

US 2006/01100080 descrive un imballo ermetico con una particolare configurazione di chiusure e contenente un agente per il prolungamento della freschezza. Nel lungo elenco di tali agenti, sono anche menzionati gli oli essenziali di piante aromatiche, ma senza alcuna evidenza di caratteristiche particolari.

5 Anche US 2008/0220036 descrive imballaggi per alimenti di materiale plastico con incorporati oli essenziali di erbe. Questo riferimento conferma le attività antibatteriche degli oli, in particolare in alcuni loro componenti, ad esempio il timolo. Tuttavia, anche in questo riferimento le prove di attività antibatterica sono condotte in condizioni controllate di laboratorio e su colture *in vitro*. Una variante di questo imballaggio è descritta in GB
10 2449876, dove gli oli essenziali ad attività antibatterica sono incorporati in un materiale microporoso.

GB 2460468 propone una miscela di vapori di olio di arancia e di bergamotto con spiccate proprietà antimicrobiche che, vantaggiosamente, non altera il sapore dell'alimento. Le prove di inibizione sono condotte estensivamente *in vitro* e anche mostrate su campioni di insalata e
15 cetriolo esposti ai vapori.

CN 101803629 descrive un complesso sistema di conservazione del prosciutto stagionato, dove dell'olio di rosmarino è spruzzato sull'alimento, rivestito con una soluzione di chitosano e impacchettato in una confezione contenente antiossidanti a base di ferro e persolfato.

US 2010/0303977 utilizza l'estratto di rosmarino per proteggere la carne e il pesce
20 dall'attacco ossidativo e l'irrancidimento delle parti grasse negli alimenti. L'estratto viene applicato direttamente sull'alimento. Nessun cenno sulle ammine viene fatto.

Richiamando quanto detto sopra per le ammine biogene, nel settore della tecnologia alimentare vi è la consapevolezza che il controllo della carica microbica negli alimenti non è del tutto sufficiente per assicurare la qualità del prodotto. Questo problema è sentito in
25 particolare per i prodotti freschi a rapida deperibilità, specialmente carne e pesce, che risentono fortemente anche delle condizioni ambientali e climatiche.

Abbiamo visto sopra che le ammine biogene sono un importante indice di qualità e il controllo del loro livello assume aspetti regolatori di igiene degli alimenti.

Una rassegna sulle ammine biogene nella carne e nei prodotti derivati si trova in C. Ruiz-Capillas, F. Jimenez-Colmenero: Biogenic Amines in Meat and Meat Products; Critical
30 Reviews in Food Science and Nutrition, 44, 489-499 (2004), citato sopra. In questo lavoro, la quantità di ammine biogene, ossia quelle ammine che derivano dalla decarbossilazione degli aminoacidi liberi, è imputata alla presenza di batteri dotati degli enzimi amminoacido decarbossilasi. La presenza di ammine biogene è adottata come indice della qualità della
35 carne e dei prodotti derivati. Tuttavia, non è un indice del tutto affidabile, dato che non tutti i microrganismi contaminanti sono dotati di questi enzimi e non tutti gli enzimi hanno la stessa capacità di decarbossilazione, quindi, una bassa quantità di ammine biogene non necessariamente corrisponde a un basso grado di contaminazione batterica. Ammine biogene

si formano anche durante il normale metabolismo cellulare, ma in quantità minore rispetto a quelle derivanti da una contaminazione batterica. In questo lavoro si affronta in dettaglio la genesi delle ammine biogene nei vari tipi di carni e prodotti derivati, ma si fa un cenno superficiale ai metodi per il loro controllo e soppressione, citando come metodi di
5 conservazione il freddo e i confezionamenti in atmosfera di CO₂.

J. Karovicova e Z. Kohajdová in *Biogenic Amines in Food*, Chem. Pap. 59(1) 70-79 (2005), affrontano in dettaglio il problema delle ammine biogene negli alimenti, mettendo in evidenza e allo stesso tempo confermando la pericolosità della loro presenza, specialmente la istamina, negli alimenti e il fattore di rischio che rappresentano per certi soggetti particolarmente
10 sensibili. Le ammine biogene, come già detto, originano dall'attività della amminoacido decarbossilasi batterica, ma anche dall'attività metabolica delle cellule. Praticamente tutti gli alimenti possono sviluppare ammine biogene, ma particolare attenzione va prestata agli alimenti freschi, soprattutto carne e pesce (si veda anche P. Kordiovská, e al., *Czech J. Anim. Sci.*, 51, 2006, (6): 262-270). Questo lavoro fornisce molte informazioni sulla tossicologia
15 delle ammine biogene e ne sottolinea continuamente l'importanza della loro determinazione come indice di qualità della freschezza e buona conservazione dell'alimento. Molti metodi analitici sono citati in questo lavoro, ma nessun metodo per l'abbattimento o l'eliminazione delle ammine biogene è citato. Per quanto riguarda la metodica analitica, si veda anche H.K. Mayer e al., *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 3251-3257 e CN 101793881.

20 Nella letteratura (si vedano i summenzionati lavori di Ruiz-Capillas, Karovicova e Kordiovská e coll.) è descritto come per alcuni alimenti sottoposti a fermentazione (formaggi, salumi e vini) la presenza di ammine biogene è naturale e addirittura caratterizzante il sapore, per cui, entro certi limiti, tali ammine non sono necessariamente indice di scarsa qualità del prodotto; per converso, la presenza di ammine biogene in alimenti freschi, specialmente carne
25 e ancora di più il pesce, è un indice non solo di possibile contaminazione batterica, ma anche di scarsa freschezza dell'alimento.

Sono noti dei metodi per ridurre o controllare il livello di ammine biogene in prodotti alimentari.

30 Il brevetto italiano IT 1122949 descrive un metodo per preparare un alimento a basso tenore di ammine, ad esempio un vino, una birra, un formaggio, impiegando nella lavorazione dell'alimento un microrganismo che provoca la transaminazione o la desaminazione dell'istidina. Questo brevetto, oltre a controllare il contenuto della sola istamina, trascurando le altre ammine biogene, impiega microrganismi di cui deve essere esclusa la patogenicità e assicurata la costante attività per gli impieghi industriali.

35 WO 0216221 affronta specificamente il problema delle ammine biogene nella conservazione del pesce fresco. In questo riferimento la produzione delle ammine è esclusivamente attribuita alla contaminazione batterica e la soluzione proposta consiste di una pellicola per imballaggio comprendente un copolimero di etilene con un acido α,β -insaturo avente da 3 a 8 atomi di carbonio ed eventualmente in associazione con zeolite, un altro assorbitore di ammine. Tale
40 pellicola funge da assorbitore di ammine, ma non ha alcun effetto sulla loro produzione. In tal

modo, il pesce subisce il suo naturale invecchiamento, ma l'effetto organolettico delle ammine viene ridotto o annullato. L'associazione tra il polimero e la zeolite fa in modo che l'assorbimento delle ammine non superi il livello di guardia di produzione delle ammine, oltre al quale l'alimento non è più accettabile per il consumo alimentare.

5 In KR 20100074849 si descrive un sistema di soppressione della produzione di ammine biogene nel pesce (sgombro), che mostra l'azione di alcuni estratti naturali che provengono dal *Rhus Chinensis*, dal *Crataegus pinnatifida* e dal limone. Tali estratti vengono spruzzati direttamente sull'alimento pesce e non vengono fissati su un apposito imballaggio per
10 alimenti, costituendo così un limite nell'applicazione, dovendo processare l'alimento prima del confezionamento.

Gli esempi di letteratura brevettuale sugli imballi attivi sono molto numerosi e non possono essere riportati in questa sede nella loro completezza.

Un imballo attivo utile per gli scopi della presente invenzione deve consentire di creare e trattenere all'interno dell'imballo una atmosfera modificata. In alternativa, o a complemento,
15 l'imballo deve essere in grado di rilasciare sostanze a contatto con l'alimento.

Ad esempio, EP 0300286 descrive un multistrato polimerico per confezionare alimenti, in particolare dolci e caffè, il quale è in grado di trattenere all'interno della confezione aromi e profumi graditi al consumatore.

20 Alla luce di quanto detto sopra, il problema della conservazione degli alimenti, in particolare quelli freschi e in modo speciale la carne e il pesce, riguarda naturalmente il controllo e la riduzione della carica batterica, la quale, per le caratteristiche di produzione, consumo e distribuzione fino all'utente finale, sia nell'ambito domestico, sia della ristorazione e somministrazione commerciale, è virtualmente ineliminabile. Tuttavia, il controllo che
25 impedisce la proliferazione della carica batterica, per quanto fondamentale nell'igiene alimentare, non è il solo parametro per assicurare la qualità dell'alimento fresco, del quale si vuole assicurare anche una freschezza intrinseca, ossia un controllo del metabolismo cellulare che costituisce il tessuto dell'alimento stesso.

Le ammine biogene sono un indice importante e riconosciuto della qualità della carne e del pesce ed è ancora sentito il problema di un loro efficace controllo e/o riduzione.

30 Inoltre, questo controllo e/o riduzione non deve utilizzare metodi e sostanze (ad esempio plastificanti o ausiliari di processo) che alterino le caratteristiche organolettiche dell'alimento fresco, che devono comunque rimanere accettabili nell'ambito della cultura del gusto del consumatore. Questo problema, per quanto sentito nel settore, non è del tutto risolto, come si può notare nel brevetto EP 1657181, nel quale il liquido attivo antimicrobico per rivestire
35 l'imballaggio è prodotto utilizzando solventi e additivi di processo, quali flessibilizzanti e altri. Inoltre, alcuni degli oli essenziali utilizzati possono avere dei sapori che non si accordano con l'alimento con il quale vengono a contatto.

Lo scopo di questa invenzione è di risolvere i problemi sopra citati, attraverso un imballaggio e materiale di confezionamento destinato alla conservazione di carne e pesce in grado di inibire lo sviluppo delle ammine biogene nel tempo, garantendo così una migliore conservazione della freschezza e delle proprietà nutrizionali dell'alimento stesso.

5 Sommario dell'invenzione

È stato ora sorprendentemente trovato che l'estratto, o l'olio essenziale di *Rosmarinus officinalis*, di *Citrus limon* e *Vitis vinifera* o loro miscele, quando incorporati in un materiale adatto al confezionamento di alimenti freschi, in particolare carne e pesce, svolgono una attività di inibizione e controllo delle ammine biogene.

10 Pertanto, è un oggetto della presente invenzione un materiale per l'imballaggio di alimenti (detto anche sistema di confezionamento) caratterizzato dal fatto che sulla superficie rivolta verso o a contatto con l'alimento è presente un agente per l'inibizione e il controllo di ammine biogene, detto agente è costituito esclusivamente da un estratto naturale o un olio essenziale o
15 almeno una molecola attiva isolata da detto olio essenziale proveniente da *Rosmarinus officinalis* o *Citrus limon*, o *Vitis vinifera* o miscele di essi idoneo a essere consumato quale alimento.

È un altro oggetto della presente invenzione un procedimento per la produzione di detto materiale, nel quale sulla superficie rivolta verso, o a contatto con, l'alimento è applicato un
20 estratto naturale o un olio essenziale o almeno una molecola attiva isolata da detto olio essenziale proveniente da *Rosmarinus officinalis* o *Citrus limon* o *Vitis vinifera* o miscele di essi.

Un altro oggetto della presente invenzione è l'uso di detto materiale per la confezione di un alimento fresco di origine animale.

Ancora un altro oggetto della presente invenzione è un metodo per inibire la sviluppi di
25 ammine biogene in un alimento fresco comprendente il confezionamento di detto alimento in un detto materiale.

Con la presente invenzione è possibile prolungare la conservazione dell'alimento fresco, mantenendo le caratteristiche organolettiche.

30 Ai sensi della presente invenzione, i termini "imballaggio" e "confezionamento" sono da intendersi sinonimi.

La presente invenzione sarà ora descritta in dettaglio anche per mezzo di figure ed esempi.

Nelle figure:

La Figura 1 mostra una realizzazione preferita dell'invenzione, dove l'imballaggio è il foglio descritto nel brevetto EP 1584464.

La Figura 2 mostra l'andamento delle ammine biogene totali nella carne di vitello conservata negli imballaggi "non active" e "active" 1% a confronto

La Figura 3 mostra l'andamento delle ammine biogene totali nel pesce conservato negli imballaggi "non active" e "active" 4% a confronto

5 Descrizione dettagliata dell'invenzione

Ai fini della presente invenzione, i termini "estratto naturale", "olio essenziale" e "molecola attiva" sono anche genericamente indicate come "principio attivo".

10 Ai fini della presente invenzione, la parte della pianta utilizzata per ottenere l'estratto o l'olio essenziale o la molecola in esso contenuta, è preferibilmente quella parte più ricca in principi attivi che inibiscono lo sviluppo di ammine biogene. Nel caso di *Rosmarinus officinalis* si tratta delle foglie, preferibilmente libere dalle parti legnose; nel caso del *Citrus limon* si tratta delle bucce, preferibilmente libere dalla polpa; e nel caso della *Vitis vinifera* si tratta delle vinacce, in particolare dei semi (vinacciolo). Nelle realizzazioni preferite, per il *Rosmarinus officinalis* è un olio essenziale, nel caso di *Citrus limon* è un estratto naturale (idroalcolico) e
15 nel caso della *Vitis vinifera* l'estrazione viene condotta mediante agitazione magnetica utilizzando una soluzione idroalcolica.

Secondo la presente invenzione, l'olio essenziale o l'estratto naturale è ottenuto preferibilmente mediante idrodistillazione della pianta o del frutto utilizzando acqua. Quando
20 utilizzata, la tecnica di idrodistillazione è preferita poiché evita l'uso di solventi organici e la successiva eliminazione delle loro tracce. Infatti, l'estratto e l'olio essenziale, venendo a contatto con gli alimenti, devono rispettare le relative normative sui confezionamenti. Il distillato viene successivamente diluito con alcool etilico, per esempio per uso alimentare (al 90-95%). Il rapporto di diluizione può variare senza particolari limitazioni in un intervallo ampio, compatibilmente con la natura del materiale di partenza, le condizioni di estrazione e il
25 prodotto finale desiderato. A puro titolo di esempio l'intervallo può variare da 1/99 a 50/50; ma sono possibili anche altri rapporti. Un esempio preferito di rapporto olio essenziale/alcool è 30/70, ma si possono adottare anche altri rapporti olio essenziale/alcool come 20/80, 40/60, 50/50. A questo punto, senza l'utilizzo di alcuna resina fissativa, l'olio viene distribuito sulla parte interna dell'imballaggio che va a diretto contatto con l'alimento. Per una migliore
30 efficacia, l'olio è distribuito uniformemente sulla superficie dell'imballo. Convenientemente, si può eventualmente usare la tecnica della spruzzatura o un gruppo rotocalco o un flexo raclato o testa di spalmatura. Se desiderato, l'alcool etilico viene allontanato con un opportuno mezzo, ad esempio con una corrente di aria calda o una superficie riscaldante, o semplicemente lasciato evaporare. Le condizioni di allontanamento del solvente e i mezzi per
35 attuarle rientrano nelle conoscenze dell'esperto del settore e non necessitano di particolari dettagli.

Nella realizzazione della presente invenzione con le vinacce, si usa l'estratto idroalcolico. In questa realizzazione è preferito l'uso del vinacciolo (semi).

L'olio o l'estratto rimangono stesi sulla superficie dell'imballaggio.

Un'altra realizzazione della presente invenzione prevede l'incorporazione di molecole contenute nella frazione volatile degli oli essenziali di *Rosmarinus officinalis*, di *Citrus limon* o di *Vitis vinifera*, in particolare dalle vinacce, più in particolare dal vinacciolo. Tra queste
5 molecole si citano gli idrocarburi terpenici, i terpeni ossigenati, le aldeidi, i chetoni e gli esteri, o a sostanze specifiche come l'acido carnosico, il carnosolo, l'acido rosmarinico (contenute nel rosmarino). Nel caso della *Vitis vinifera* si fa principalmente riferimento ai polifenoli.

In una realizzazione preferita della presente invenzione, le concentrazioni di principio attivo
10 sono comprese nell'intervallo 0,1-4% p/p. La scelta della concentrazione più adatta è funzione sia dell'azione inibitoria nei confronti dello sviluppo delle ammine biogene, sia dell'aroma sprigionato dall'olio essenziale e/o estratto naturale che deve sposarsi con l'aroma dell'alimento stesso.

Vantaggiosamente, la presente invenzione riduce lo sviluppo di ammine biogene negli
15 alimenti freschi durante il loro normale stato di conservazione dal punto di vendita fino al consumo finale. Da segnalare l'inibizione dell'istamina, i cui effetti avversi sono ben noti.

Secondo la presente invenzione, qualsiasi materiale destinato ad entrare in contatto con
l'alimento, in particolare l'alimento fresco, più in particolare carne o pesce, può essere
20 utilizzato al fine di supportare l'estratto, o l'olio essenziale o una o più molecole attive di *Rosmarinus officinalis* o *Citrus limon* o di *Vitis vinifera*, o loro miscele.

L'imballaggio secondo la presente invenzione può assumere qualsiasi forma nota, dal foglio
di carta per avvolgere il prodotto fresco al punto di vendita, ad esempio banco di macelleria,
salumeria o pescheria, fino alla confezione più complessa, dove lo strato di materiale di
25 confezionamento rivolto verso o in contatto con l'alimento contribuisce con gli altri elementi dell'imballaggio a creare una atmosfera controllata, separata e isolata dall'atmosfera ambiente, dove le sostanze volatili attive nella inibizione o controllo delle ammine biogene sono rilasciate dall'imballo e vanno a contatto con l'alimento, potendo anche esserne assorbite.

In una forma preferita di realizzazione, l'imballaggio è costituito da un film di cellulosa
30 incollato a uno strato metallizzato a sua volta accoppiato a un film di polietilene ad alta densità (PEHD) sul quale viene spruzzato l'olio essenziale o l'estratto naturale.

In una forma particolarmente preferita di realizzazione, l'imballaggio in cui sono incorporati
gli oli essenziali o gli estratti di *Rosmarinus officinalis* e/o di *Citrus limon*, o di vinacce o loro
35 miscele è quello descritto in EP 1584464. L'imballaggio descritto in questo brevetto è noto con il marchio Ideabrill®.

In una altra forma di realizzazione, l'imballaggio è quello descritto in WO 2010/069888.

Una ulteriore forma di realizzazione della presente invenzione prevede un foglio di carta accoppiata come descritto in EP 1584464, la cui superficie a contatto con l'alimento supporta il principio attivo secondo l'invenzione e un sacchetto dello stesso materiale, ma senza principio attivo, dentro il quale viene inserito il foglio che avvolge l'alimento, e il sacchetto viene poi sigillato.

Gli imballaggi prodotti vengono destinati al confezionamento di alimenti freschi da banco come ad esempio carne e pesce.

In una realizzazione preferita dell'invenzione, l'imballaggio prende la forma di un foglio di carta in uso nelle macellerie e nelle pescherie.

10 In una realizzazione particolarmente preferita della presente invenzione, l'alimento viene incartato con l'imballaggio della presente invenzione, arrotolato su se stesso e poi posizionato all'interno di un sacchetto di tipo noto denominato "salva freschezza" che viene successivamente sigillato, ad esempio con un lembo incollante o termosaldato. Preferibilmente, questo sacchetto "salva freschezza" è costituito dagli stessi materiali che
15 compongono l'imballaggio della realizzazione preferita della presente invenzione, ossia come descritto in EP 1584464, ma senza principio attivo. La chiusura sigillata permette la creazione di un'atmosfera interna della confezione, in cui gli oli essenziali e/o estratti naturali, costituiti da molecole volatili, agiscono sia per contatto diretto con l'alimento stesso sia per diffusione proprio nell'atmosfera interna dell'imballaggio. In questo modo le molecole bioattive
20 contenute nel principio attivo sono in grado di agire inibendo lo sviluppo delle ammine biogene.

Secondo tale realizzazione preferita, e facendo riferimento alla Figura 1, l'imballaggio è sotto forma di un foglio (10) comprendente un primo strato (11) fatto di carta, che è accoppiato a un secondo strato (12) fatto di polietilene, un terzo strato metallico (13) depositato su detto
25 secondo strato (12), detto secondo strato (12) è accoppiato al primo strato (11) sul lato del terzo strato metallico (13) per interposizione di un quarto strato adesivo (14) tra il terzo strato metallico (13) e il primo strato di carta (11), caratterizzato dal fatto che detto secondo strato (12) presenta sulla superficie (24) rivolta verso o a contatto con l'alimento detto estratto naturale o un olio essenziale o almeno una molecola attiva isolata da detto olio essenziale
30 proveniente da *Rosmarinus officinalis* o *Citrus limon* o *Vitis vinifera* o miscele di essi.

Secondo questo brevetto, e come illustrato nella Figura 1, un foglio per l'imballaggio di alimenti è genericamente indicato con il numero (10).

Il foglio (10) comprende un primo strato (11) fatto di carta, che è accoppiato a un secondo strato (12) fatto di polietilene.

35 Il secondo strato (12) è trattato secondo la presente invenzione per incorporare supportati gli estratti o gli oli essenziali, o le sostanze attive di *Rosmarinus officinalis* o di *Citrus limon* o di vinacce o loro miscele.

- Un terzo strato metallico (13) è depositato sul secondo strato (12). In una realizzazione particolarmente vantaggiosa della presente invenzione, per salvaguardare la freschezza dell'alimento è sufficiente una coprenza di vapori di alluminio inferiore ai 18 nm pari a 0,05 gr./mq. (quantitativo di molto inferiore rispetto ad altri brevetti). Questo comporta un vantaggio dal punto di vista ecologico per lo smaltimento dell'imballaggio.
- Il secondo strato (12) è accoppiato al primo strato (11) sul lato del terzo strato metallico (13) per interposizione di un quarto strato adesivo (14) tra il terzo strato metallico (13) e il primo strato di carta (11).
- Il lato (18) dello strato di carta (11) può essere eventualmente destinato alla stampa.
- Il secondo strato (12) è fatto di polietilene. Il polietilene può essere ad alta, media o bassa densità e viene scelto a seconda delle caratteristiche desiderate, ad esempio bassa densità o rigidità o permeabilità, secondo criteri ben noti nel settore.
- Preferibilmente, il terzo strato metallico (13) è di alluminio. L'alluminio è utilizzato in funzione delle sue note caratteristiche negli imballi alimentari, come il riflettere la luce e la radiazione infrarossa e quella ultravioletta, facilitando o proteggendo così la freschezza dell'alimento contenuto nell'imballaggio.
- Il quarto strato adesivo è vantaggiosamente composto di amidi vegetali e glucosio.
- In un'altra forma di realizzazione preferita della presente invenzione, il foglio appena descritto qui sopra, e ulteriormente descritto nel brevetto EP 1584464, viene inserito in un sacchetto chiudibile, preferibilmente in modo sigillato, ad esempio per termosaldatura.
- In una forma ancora più preferita della presente invenzione, detto sacchetto ha la stessa costituzione del materiale del foglio con la condizione che detto secondo strato (12) riferito al sacchetto, non supporta detto principio attivo.
- La scelta dei materiali, carta, polimeri, metalli e strati adesivi, è fatta in funzione della destinazione dell'imballaggio. L'imballaggio della presente invenzione è destinato al confezionamento e conservazione di alimenti, in particolare alimenti freschi, più in particolare carne e pesce, pertanto la scelta dei materiali deve essere conforme alle normative in vigore.
- Per ogni caratteristica particolare di questa realizzazione preferita dell'invenzione, e nota in commercio con il marchio Ideabrill[®], si rinvia al contenuto di EP 158446.
- Per la valutazione del tenore di ammine biogene negli alimenti analizzati (carne e pesce freschi), è stata utilizzata una metodica analitica che prevede l'utilizzo della tecnica di estrazione in fase solida (solid phase extraction, SPE) e per la parte strumentale di un cromatografo liquido ad alte prestazioni (high performance liquid chromatography, HPLC) sviluppata dai presenti inventori (G. Sagratini, M. Fernández-Franzón, F. De Berardinis, G. Font, S. Vittori, J. Mañes, Simultaneous determination of eight underivatized biogenic amines in fish by solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food*

Chemistry, 2011, doi: 10.1016/j.foodchem.2011.10.054). Come sistemi di rivelazione accoppiati all'HPLC si sono utilizzati un rivelatore a fotodiodi (DAD) in alternativa a un rivelatore a fluorescenza (FD) in alternativa a un analizzatore di massa a singolo quadrupolo (MS) o a triplo quadrupolo (MS/MS). Va precisato che i primi due sistemi analizzano le ammine biogene in forma derivatizzata mentre le tecniche facenti riferimento alla spettrometria di massa (MS e MS/MS) permettono l'analisi delle stesse anche in forma non derivatizzata.

Il campione di alimento, carne o pesce, viene trattato secondo metodi noti per l'estrazione e determinazione delle ammine biogene. Questi metodi rientrano nelle conoscenze generali del settore (si veda anche la letteratura citata nella presente domanda) e non necessitano di particolari descrizioni nella presente invenzione.

Di seguito si fornisce la descrizione esemplificativa di un metodo, restando inteso che altri metodi possono essere utilizzati a conferma del risultato ottenuto dalla presente invenzione.

Nello specifico, una quantità di matrice opportunamente campionata, viene estratta con un volume opportuno di acido tricloroacetico (TCA) al 5% o altro mezzo idoneo mediante omogeneizzazione per un tempo opportuno (circa 3 minuti), la miscela eterogenea viene quindi centrifugata (ad esempio per 10 min a 5000 rpm) e il supernatante messo da parte. Si effettua una seconda estrazione con TCA al 5%, si centrifuga e si riuniscono i supernatanti. A questo punto, se le ammine vengono analizzate in HPLC-DAD o HPLC-FD è necessaria una reazione di derivatizzazione, altrimenti si veda successivamente. Quindi si preleva un'aliquota di soluzione acida, la si pone in una provetta ben al riparo dalla luce e si procede alla nota reazione di derivatizzazione con Dansilcloruro (NaHCO_3 , NaOH 2M e Dansilcloruro (10 mg/ml in acetone)). La miscela viene posta in agitazione magnetica per un tempo e a una temperatura opportuna. Al termine della derivatizzazione si neutralizza con una base (ad esempio NH_4OH al 28%) il dansile in eccesso, quindi si procede all'evaporazione dell'acetone residuo sotto un debole flusso di gas inerte (ad esempio azoto). A questo punto, il residuo viene sottoposto a purificazione su cartucce SPE C_{18} a fase inversa, le quali, posizionate sulla stazione da vuoto, vengono attivate con acetonitrile e poi condizionate con acqua. L'estratto derivatizzato viene quindi caricato sulla cartuccia, l'eluato scartato e la cartuccia lavata con acqua. Quindi, dopo aver seccato perfettamente la cartuccia, si eluisce con acetonitrile. L'estratto purificato ottenuto viene ora filtrato su filtri da 0,45 μm e iniettato in HPLC. L'analisi in HPLC viene condotta utilizzando una colonna a fase inversa C_{18} , una fase mobile costituita da metanolo/acetonitrile (7/3) e acqua utilizzando un gradiente cromatografico. Le ammine monitorate sono: triptamina, feniletilamina, putrescina, cadaverina, tiramina, istamina, spermina, spermidina. La lunghezza d'onda di monitoraggio λ è 254 nm.

Qualora si utilizzi invece come rivelatore uno spettrometro di massa a singolo o a triplo quadrupolo le ammine biogene non hanno bisogno di essere derivatizzate. Quindi un aliquota del supernatante precedentemente ottenuto viene basificato a pH 11 (ad esempio con NH_4OH al 28%) e caricato su una cartuccia SPE STRATA X precedentemente attivata e condizionata.

- La cartuccia viene lavata con una miscela acqua/metanolo. Quindi, dopo aver seccato perfettamente la cartuccia, si eluisce con una miscela metanolo/acido acetico. L'estratto purificato ottenuto viene evaporato sotto flusso di azoto, ripreso con HCl 0.1N, filtrato su filtri da 0,45 μm e iniettato in HPLC-MS o HPLC-MS/MS. L'analisi in HPLC viene condotta
- 5 utilizzando una colonna a fase inversa Sinergy Hydro, una fase mobile costituita da metanolo e tampone ammonio formiato ($\text{HCOOH}/\text{HCOO}^-\text{NH}_4^+$) a pH 3,3 utilizzando un gradiente cromatografico. Lo spettrometro di massa è equipaggiato con una sorgente di ionizzazione electrospray (ESI) operante in modalità ioni positivi. Le ammine monitorate sono esattamente quelle citate in precedenza.
- 10 I seguenti esempi illustrano ulteriormente l'invenzione.

Esempio 1

Preparazione del campione di carne

- 5 g di matrice (carne), opportunamente campionati, vengono estratti con 15 ml di acido tricloroacetico (TCA) al 5% mediante omogeneizzazione in Ultraturrax per 3 minuti; la
- 15 miscela eterogenea viene quindi centrifugata per 10 min a 5000 rpm e il supernatante messo da parte.

Si effettua una seconda estrazione con 10 ml di TCA al 5%, si centrifuga e si riuniscono i supernatanti.

- A questo punto si preleva 1 ml di soluzione acida, la si pone in una provetta al riparo dalla
- 20 luce e si procede alla reazione di derivatizzazione aggiungendo 300 μl di NaHCO_3 , 200 μl di NaOH 2M e 2 ml di Dansilcloruro (concentrazione 10 mg/ml in acetone). La miscela viene posta in agitazione magnetica per 45 minuti a 40°C. Al termine della derivatizzazione vengono aggiunti 100 μl di NH_4OH al 28% per neutralizzare il dansile in eccesso, quindi si procede all'evaporazione dell'acetone residuo sotto un debole flusso di azoto.

- 25 A questo punto il residuo viene sottoposto a purificazione su cartucce SPE C_{18} a fase inversa, le quali, posizionate sulla stazione da vuoto, vengono attivate con 5 ml di acetonitrile e poi condizionate con 5 ml di acqua.

- L'estratto derivatizzato viene quindi caricato sulla cartuccia, precedentemente attivata (4 ml di acetonitrile) e condizionata (4 ml di acqua), l'eluato scartato e la cartuccia lavata con 5 ml di
- 30 acqua. Quindi, dopo aver seccato perfettamente la cartuccia, si eluisce con 4 ml di acetonitrile. L'estratto purificato ottenuto viene ora filtrato su filtri da 0,45 μm e iniettato in HPLC. L'analisi in HPLC viene condotta utilizzando una colonna Gemini C18 (250 x 3 mm I.D., 5 μm), una fase mobile costituita da metanolo/acetonitrile (7/3) e acqua utilizzando un gradiente cromatografico. Le ammine monitorate sono: triptamina, feniletilamina, putrescina, cadaverina, tiramina, istamina, spermina, spermidina. La lunghezza d'onda di
- 35 monitoraggio λ è 254 nm.

Esempio 2

5 g di matrice (pesce), opportunamente campionati, vengono estratti con 15 ml di acido tricloroacetico (TCA) al 5% mediante omogeneizzazione in Ultraturrax per 3 minuti; la miscela eterogenea viene quindi centrifugata per 10 min a 5000 rpm e il supernatante messo da parte.

- 5 Si effettua una seconda estrazione con 10 ml di TCA al 5%, si centrifuga e si riuniscono i supernatanti. Un'aliquota del supernatante (2 ml) viene basificato a pH 11 (con NH₄OH al 28%) e caricato su una cartuccia SPE STRATA X precedentemente attivata (4 ml metanolo) e condizionata (4 ml di acqua basificata a pH 11). L'eluato viene quindi scartato e la cartuccia lavata con 2 ml di una miscela acqua/metanolo (95/5). Quindi, dopo aver seccato
- 10 perfettamente la cartuccia, si eluisce con 4 ml di una miscela metanolo/acido acetico (99/1). L'estratto purificato ottenuto viene evaporato sotto flusso di azoto, ripreso con HCl 0,1N (2 ml), filtrato su filtri da 0,45 µm e iniettato in HPLC-MS/MS. L'analisi in HPLC viene condotta utilizzando una colonna a fase inversa Synergi Hydro (250×4,0 mm I.D., 5µm), una fase mobile costituita da metanolo e tampone ammonio formiato (HCOOH/HCOO⁻NH₄⁺) a
- 15 pH 3,3 utilizzando un gradiente cromatografico. Lo spettrometro di massa è equipaggiato con una sorgente di ionizzazione electrospray (ESI) operante in modalità ioni positivi. Per ogni ammina vengono monitorate le rispettive transizioni massa/massa (ione precursore/ione prodotto). Le ammine monitorate sono: triptamina, feniletilammina, putrescina, cadaverina, tiramina, istamina, spermina, spermidina.

20 Procedura di ottenimento degli oli essenziali o estratti naturali

- L'olio essenziale di *Rosmarinus Officinalis* o l'estratto naturale di *Citrus Limon* o l'estratto idroalcolico di vinacce, preferibilmente vinacciolo sono stati ottenuti mediante il processo di idrodistillazione utilizzando un apparato di tipo Clevenger a partire dalle foglie (nel caso del rosmarino) o dalle bucce (nel caso del limone). Nel caso del rosmarino, le foglie, contenenti i
- 25 principi bioattivi, sono state inizialmente preparate per il processo di idrodistillazione eliminando le parti legnose. Nel caso del limone le bucce sono state separate dalla polpa e tagliate in piccole parti. A questo punto 600 g di matrice (foglie di rosmarino o bucce di limone) sono stati idrodistillati a 100°C per 5 ore utilizzando 3,5 l di acqua, ottenendo un quantitativo variabile di olio essenziale e o estratto naturale dipendente dalla matrice
- 30 utilizzata. L'olio essenziale per effetto della sua natura lipofila si separa dall'acqua e viene facilmente raccolto. Nel caso della *Vitis Vinifera* sono state utilizzate le vinacce, con specifico riferimento ai vinaccioli; l'estrazione è stata condotta su un quantitativo di matrice pari a 100 g mediante agitazione magnetica a temperatura controllata (20°C, ma si possono usare anche altre temperature 30 o 40 o 45°C) utilizzando 400 ml di una soluzione idroalcolica
- 35 (acqua/etanolo in rapporto 30/70 ma si possono utilizzare anche altri rapporti come 10/90 o 20/80) per un tempo di 8 ore (fino a un massimo di 72 ore). L'estratto ottenuto è stato poi filtrato, la soluzione evaporata e liofilizzata per allontanare definitivamente l'acqua.

Efficacia sulle ammine biogene

- Lo studio per valutare l'efficacia dei nuovi imballaggi arricchiti con oli essenziali è stato
- 40 condotto in questo modo: i campioni di carne o pesce freschi sono stati confezionati sia negli

5 imballaggi secondo la presente invenzione (di seguito anche denominati “active”) sia in imballaggi di controllo (non arricchiti con oli e di seguito anche denominato “non active”) quindi conservati in frigorifero a 4°C. Lo studio è stato condotto nell’arco di 7 giorni, effettuando campionamenti nei giorni 0, 2, 4, 7. I risultati relativi al tenore totale delle ammine biogene nella carne rossa di vitello conservata nei due imballaggi “active” 1% e “non active” sono riportati nella Figura 2.

10 Dalla Figura 2 si nota molto chiaramente come la carne conservata nell’imballaggio “active” 1% nel tempo produca, grazie alla presenza degli oli essenziali, una quantità di ammine biogene inferiore rispetto a quella contenuta nel classico imballaggio “non active”. In particolare, va sottolineato come al giorno 2 ci sia una differenza di 8 mg kg⁻¹ a favore dell’“active” (percentuale di inibizione 12%), differenza che viene mantenuta anche nei giorni 4 e 7 ma con valori più bassi (5 e 6 mg kg⁻¹, percentuali di inibizione 7 e 8%). Il tenore totale delle ammine biogene risulta comunque essere sempre inferiore nell’imballaggio “active” rispetto al “non active”. Oltre al tenore totale sono stati anche valutati, relativamente alle ammine biogene, altri indici come il B.A.I (biogenic amine index) e il rapporto spermidina/spermina (SPD/SPM) (C.M.G. Silva, M.B.A. Gloria, Bioactive amines in chicken breast and thigh after slaughter and during storage at 4±1°C and in chicken-based meat products, *Food Chemistry*, 78 (2002) 241-248) che hanno confermato l’azione degli imballaggi active nei confronti dei non active. Interessanti risultati sono stati ottenuti nel caso delle singole ammine, in particolare per tiramina e spermina. L’azione inibitoria nei confronti dello sviluppo delle ammine biogene da parte degli imballaggi “active” risulta essere massima nei primi due giorni; questo risultato è di una certa rilevanza soprattutto se si tengono in considerazione i tempi di normale consumo di questo prodotto fresco. Risultati analoghi sono stati ottenuti anche testando gli imballaggi arricchiti con oli essenziali sulla carne bianca di pollo.

L’azione inibitoria degli imballaggi attivi nei confronti delle ammine biogene è stata anche valutata sull’alimento pesce. Nella Figura 3 riportiamo i dati relativi al tenore totale delle ammine biogene in campioni di pesce (merluzzi) conservati nei due imballaggi “active” 4% e “non active”.

30 Anche in questo caso si deduce chiaramente come il pesce conservato nell’imballaggio “active” 4% sviluppi nel tempo un tenore di ammine biogene più basso rispetto al pesce contenuto nell’imballaggio “non active”. Infatti, in tutti i giorni di campionamento il tenore totale di ammine si attesta per l’imballaggio “active” su valori significativamente più bassi rispetto al “non active”. Dopo due giorni lo sviluppo di ammine biogene nell’imballaggio “non active” è quasi raddoppiata rispetto all’“active” 4% (percentuale di inibizione 45%) e anche nei giorni 4 e 7 si registrano notevoli differenze tra i due imballaggi, sempre a favore dell’“active” (percentuali di inibizione 36 e 39%). Inoltre, interessanti risultati sono stati ottenuti nei casi delle singole ammine, in particolare per istamina e cadaverina. Quindi anche nel caso del pesce, l’olio essenziale di rosmarino svolge un’azione di soppressione dello sviluppo delle ammine biogene permettendo una migliore conservazione dell’alimento e conseguentemente salvaguardandone la freschezza.

Gli imballaggi attivi secondo la presente invenzione sono stati sottoposti a prove per valutare l'eventuale alterazione su di essi da parte degli estratti, oli o molecole fissati. Le prove consistono nella permanenza dell'imballo attivo in stufa a 60°C per una settimana. Non sono state rilevate alterazioni di sorta, in particolare del film a contatto con il principio attivo.

- 5 Concludendo, sia nel caso della carne sia nel caso del pesce sono stati ottenuti risultati analoghi testando gli imballaggi attivi formulati con percentuali di olio essenziale e/o estratto naturale a diverse concentrazioni comprese nell'intervallo range 0,1-4%. Inoltre sono state testate anche miscele di olio essenziale di rosmarino/estratto di limone in diversi rapporti percentuali tra di loro.

RIVENDICAZIONI

1. Materiale per l'imballaggio di alimenti (10) comprendente un primo strato (11) fatto di carta, che è accoppiato a un secondo strato (12) fatto di polietilene, un terzo strato
5 metallico (13) depositato su detto secondo strato (12), detto secondo strato (12) è accoppiato a detto primo strato (11) sul lato del terzo strato metallico (13) per interposizione di un quarto strato adesivo (14) tra detto terzo strato metallico (13) e detto primo strato di carta (11), caratterizzato dal fatto che su detto secondo strato (12) sulla superficie (24) rivolta verso o a contatto con l'alimento è presente un estratto
10 naturale o un olio essenziale o almeno una molecola attiva isolata da detto estratto naturale o detto olio essenziale proveniente da *Rosmarinus officinalis* o *Citrus limon* o *Vitis vinifera* o miscele di essi.
2. Materiale secondo la rivendicazione 1, in cui detto estratto naturale o olio essenziale o almeno una molecola attiva isolata da detto olio essenziale o miscele di essi è presente
15 in una concentrazione compresa tra 0,1 e 4% p/p.
3. Materiale secondo la rivendicazione 1 o 2, sotto forma di foglio.
4. Materiale per l'imballaggio di alimenti sotto forma di sacchetto chiudibile atto a contenere il foglio della rivendicazione 3.
5. Sacchetto secondo la rivendicazione 4, dove detto sacchetto è chiudibile in modo
20 sigillato.
6. Sacchetto secondo la rivendicazione 5, dove detta chiusura sigillata avviene per termosaldatura.
7. Sacchetto secondo la rivendicazione 5 o 6, detto sacchetto ha la stessa costituzione del
25 materiale della rivendicazione 1 o 2, con la condizione che detto secondo strato (12) non supporta detto estratto naturale o un olio essenziale o almeno una molecola attiva isolata da detto olio essenziale proveniente da *Rosmarinus officinalis* o *Citrus limon* o *Vitis vinifera* o miscele di essi.
8. Procedimento per la produzione del materiale delle rivendicazioni 1-3, nel quale sulla
30 superficie rivolta verso o a contatto con l'alimento è applicato un estratto naturale o un olio essenziale o almeno una molecola attiva isolata da detto estratto naturale o detto

olio essenziale proveniente da *Rosmarinus officinalis* o *Citrus limon* o *Vitis vinifera* o miscele di essi.

- 5
9. Procedimento secondo la rivendicazione 8, nel quale detto estratto naturale o olio essenziale o detta almeno una molecola attiva è diluito con alcool etilico e successivamente distribuito sulla superficie rivolta verso o a contatto con l'alimento.
10. Procedimento secondo la rivendicazione 9, nel quale detto alcool etilico è allontanato.
11. Uso del materiale di confezionamento di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-7 per la confezione di un alimento fresco di origine animale.
- 10
12. Uso secondo la rivendicazione 11, dove detto alimento è scelto nel gruppo che consiste di carne e pesce.
13. Metodo per inibire lo sviluppo di ammine biogene in un alimento fresco comprendente il confezionamento di detto alimento in un materiale di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-7.
- 15
14. Metodo secondo la rivendicazione 13, dove detto alimento è scelto nel gruppo che consiste di carne e pesce.
- 20
15. Metodo per inibire lo sviluppo di ammine biogene in un alimento fresco comprendente il confezionamento di detto alimento in un materiale in cui sulla superficie rivolta verso o a contatto con l'alimento è presente un estratto naturale o un olio essenziale o almeno una molecola attiva isolata da detto estratto naturale o detto olio essenziale proveniente da *Rosmarinus officinalis* o *Citrus limon* o *Vitis vinifera* o miscele di essi.
16. Metodo secondo la rivendicazione 15, dove detto alimento fresco è carne o pesce.

CLAIMS

1. Material for packaging food (10) comprising a first layer (11) made of paper, that is coupled to a second layer (12) made of polyethylene, a third metal layer (13) deposited on said second layer (12), said second layer (12) is coupled to said first layer (11) on the side of said third metal layer (13) by interposing a fourth adhesive layer (14) between said third metal layer (13) and said first layer of paper (11), characterized in that on said second layer (12) on the surface (24) facing the or in contact with the food is present a natural extract or an essential oil or at least an active molecule isolated from said natural extract or said essential oil from *Rosmarinus officinalis* or *Citrus limon* or *Vitis vinifera* or mixtures thereof.
2. Material according to claim 1, wherein said natural extract or said essential oil or said at least one active molecule isolated from said essential oil or mixtures thereof is present in a concentration comprised between 0.1 and 4% w/w.
3. Material according to claim 1 or 2, in the form of a sheet.
4. Material for packaging food in the form of a closable bag suitable to contain said sheet of claim 3.
5. Bag according to claim 4, wherein said bag is sealable.
6. Bag according to claim 5, wherein said sealing is made by thermosealing.
7. Bag according to claim 5 or 6, wherein said bag has the same composition of the material of claim 1 or 2, on condition that said second layer (12) does not support said natural extract or said essential oil or said at least one active molecule isolated from said essential oil from *Rosmarinus officinalis* or *Citrus limon* or *Vitis vinifera* or mixtures thereof.
8. Process for producing the material of claims 1-3, wherein on the surface facing the or in contact with the food it is applied a natural extract or an essential oil or at least an active molecule isolated from said natural extract or said essential oil from *Rosmarinus officinalis* or *Citrus limon* or *Vitis vinifera* or mixtures thereof.

9. Process according to claim 8, wherein said natural extract or essential oil or said at least one active molecule is diluted with ethyl alcohol and subsequently distributed on the surface facing the or in contact with the food.
10. Process according to claim 9, wherein said ethyl alcohol is removed.
- 5 11. Use of the packaging material of anyone of claims 1-7 for packaging a fresh food of animal origin.
12. Use according to claim 11, wherein said food is selected from the group consisting of meat and fish.
- 10 13. Method for inhibiting the development of biogenic amines in a fresh food comprising packaging of said food in a material of anyone of claims 1-7.
14. Method according to claim 13, wherein said food is selected from the group consisting of meat and fish.
- 15 15. Method for inhibiting the development of biogenic amines in a fresh food comprising packaging said food in a material wherein on the surface facing the or in contact with the food is present a natural extract or an essential oil or at least an active molecule isolated from said natural extract or said essential oil from *Rosmarinus officinalis* or *Citrus limon* or *Vitis vinifera* or mixtures thereof.
16. Method according to claim 15, wherein said fresh food is meat or fish.

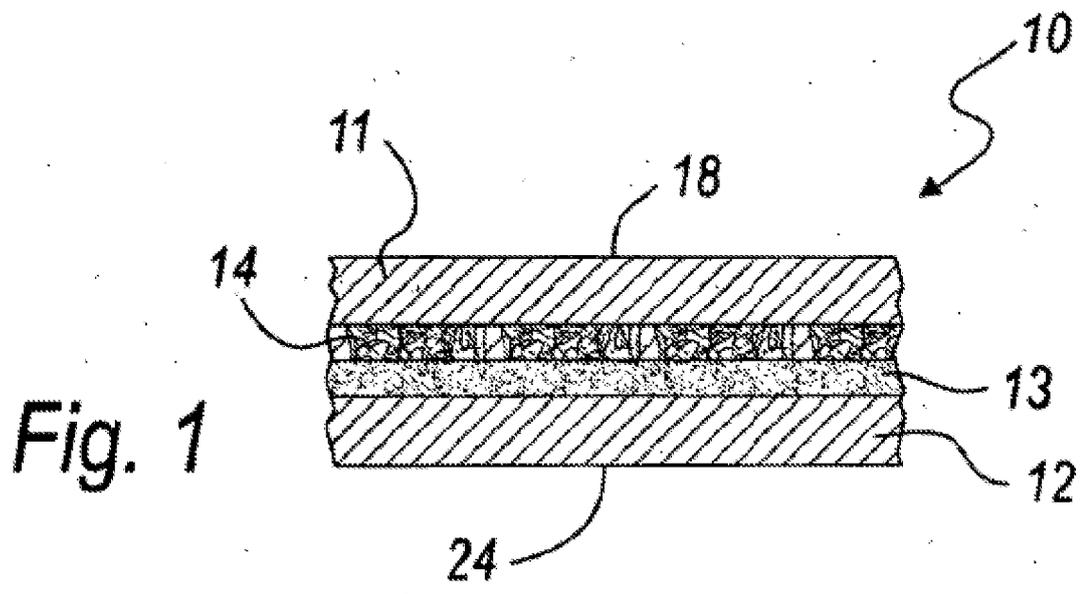


Fig. 1

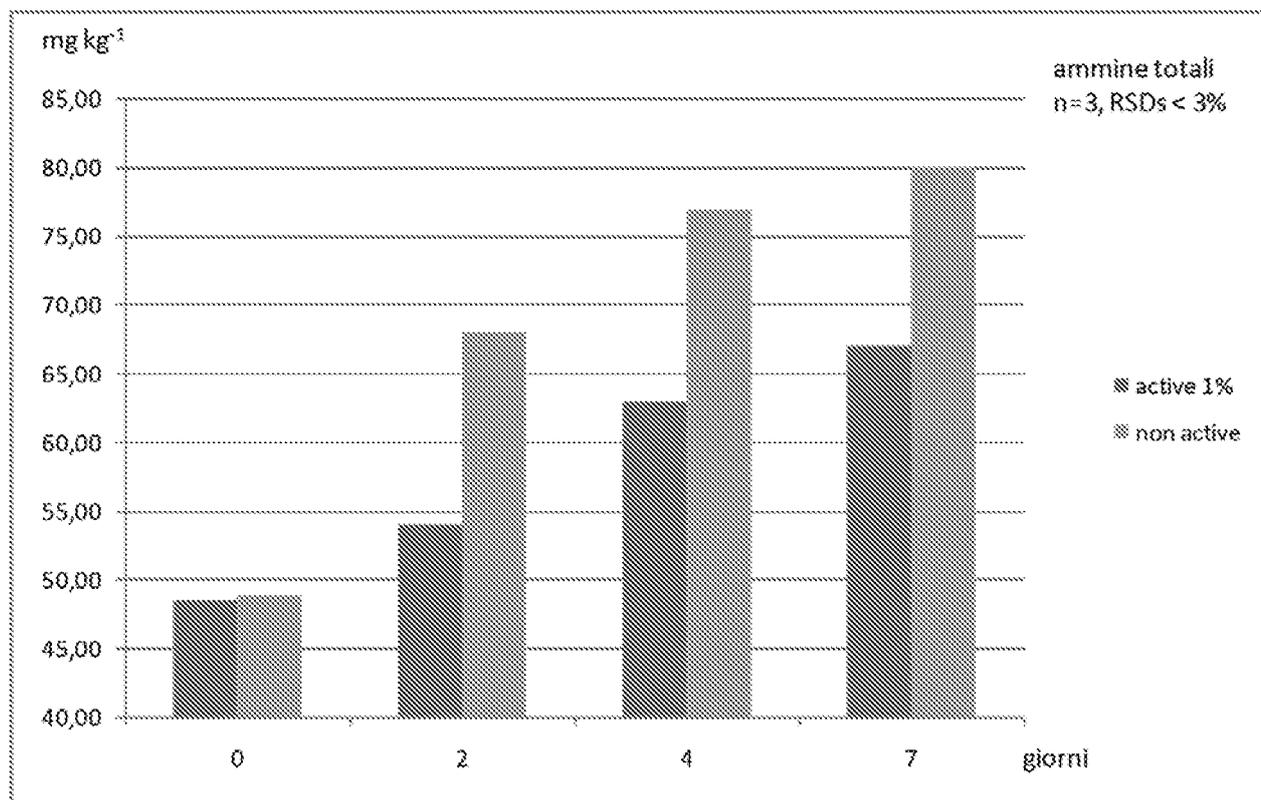


Figura 2

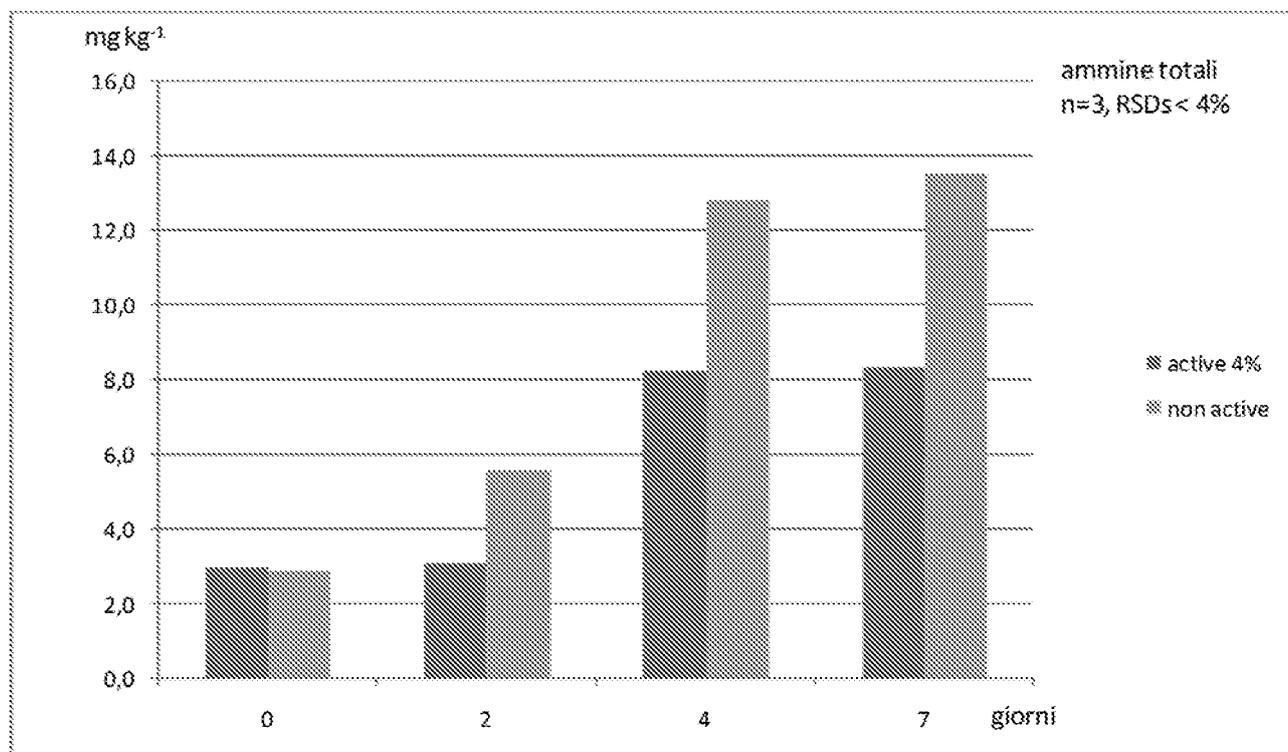


Figura 3