

C. ZOANI, E. PUCCI, G. ZAPPA

Dipartimento Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali
Divisione Biotecnologie e Agroindustria
Centro Ricerche Casaccia, Roma

METODOLOGIE ANALITICHE PER LA DETERMINAZIONE DI CONTAMINANTI DA MATERIALI A CONTATTO CON GLI ALIMENTI

RT/2018/11/ENEA



AGENZIA NAZIONALE PER LE NUOVE TECNOLOGIE,
L'ENERGIA E LO SVILUPPO ECONOMICO SOSTENIBILE

C. ZOANI, E. PUCCI, G. ZAPPA

Dipartimento Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali
Divisione Biotecnologie e Agroindustria
Centro Ricerche Casaccia, Roma

METODOLOGIE ANALITICHE PER LA DETERMINAZIONE DI CONTAMINANTI DA MATERIALI A CONTATTO CON GLI ALIMENTI

RT/2018/11/ENEA



AGENZIA NAZIONALE PER LE NUOVE TECNOLOGIE,
L'ENERGIA E LO SVILUPPO ECONOMICO SOSTENIBILE

E. Pucci
Ospite ENEA SSPT-BIOAG

La presente pubblicazione rappresenta una sintesi della tesi di laurea magistrale in Scienze dell'Alimentazione e della Nutrizione Umana "Metodologie analitiche per la determinazione di contaminanti da materiali a contatto con gli alimenti" a.a. 2014-2015.

I rapporti tecnici sono scaricabili in formato pdf dal sito web ENEA alla pagina www.enea.it

I contenuti tecnico-scientifici dei rapporti tecnici dell'ENEA rispecchiano l'opinione degli autori e non necessariamente quella dell'Agenzia

The technical and scientific contents of these reports express the opinion of the authors but not necessarily the opinion of ENEA.

METODOLOGIE ANALITICHE PER LA DETERMINAZIONE DI CONTAMINANTI DA MATERIALI A CONTATTO CON GLI ALIMENTI

G. Zappa, C. Zoani, E. Pucci

Riassunto

Nel presente lavoro è stato condotto uno studio finalizzato alla caratterizzazione di un film di acido polilattico funzionalizzato con argento (Ag-PLA) destinato all'utilizzo come imballaggio, effettuando confronti con un film di acido polilattico tal quale (PLA TQ).

Al fine di determinare il contenuto totale di Ag sul PLA funzionalizzato con Ag (Ag-PLA), di effettuare una valutazione preliminare dell'eventuale presenza di altri elementi potenzialmente migranti (considerando gli elementi per i quali la normativa prevede un Limite di Migrazione Specifica: Ba, Co, Cu, Fe, Li, Mn e Zn) nel PLA TQ e nell'Ag-PLA e di valutare eventuali differenze tra il contenuto elementare nei pellet di partenza, nel PLA TQ e nell'Ag-PLA, è stata messa a punto una metodologia analitica per la determinazione del contenuto totale di elementi mediante ICP-AES previa dissoluzione totale dei campioni con un sistema di mineralizzazione a microonde ad alta pressione. Sono state messe a punto le metodologie per l'esecuzione dei test di migrazione globale e specifica con diversi simulanti alimentari a diverse temperature e tempi di contatto in accordo con quanto stabilito dal Regolamento (UE) n 10/2011 s.m.i. (versione consolidata al 2014). La migrazione globale (Overall Migration - OM) è stata valutata per via gravimetrica mentre la migrazione specifica (SM) dell'argento nelle soluzioni di simulante raccolte nelle diverse condizioni (diversi tempi e diverse temperature) è stata determinata mediante ICP-MS.

È stato inoltre determinato per via gravimetrica il residuo secco ottenuto dalle soluzioni di simulante raccolte nelle diverse condizioni (diversi tempi e diverse temperature). Per una più ampia valutazione ed una migliore interpretazione degli effetti indotti dai simulanti alimentari nelle diverse condizioni di esposizione (diversi tempi e temperature), i film di PLA e Ag-PLA sono stati poi sottoposti ad analisi termica mediante analisi termogravimetrica (TGA) e calorimetria differenziale a scansione (DSC).

Al fine di fornire una più ampia caratterizzazione del materiale e valutare l'efficacia antibatterica dell'Ag-PLA, sono stati effettuati test microbiologici con un ceppo di *E. coli* C2984, in terreno LB (Luria-Bertani) e brodo di coltura LB valutando la crescita statica e sono state definite le condizioni per la determinazione della crescita dinamica.

Infine, allo scopo di studiare nel dettaglio l'eventuale rilascio di nanoparticelle di Ag dall'Ag-PLA, è in fase di messa a punto una metodologia basata su Field Flow Fractionation (FFF) per l'individuazione e la caratterizzazione di nanoparticelle negli estratti ottenuti dai test di migrazione.

Parole chiave: Materiali a Contatto con Alimenti, Acido Polilattico, Test di Migrazione, Simulanti Alimentari.

ANALYTICAL METHODS TO DETERMINE CONTAMINANTS FROM FOOD CONTACT MATERIALS IN FOODS

Abstract

This work reports about an experimental study aimed to characterize a film of PolyLactic Acid functionalised with silver (Ag-PLA) for use as packaging, performing some comparisons with a PolyLactic Acid film as it is (PLA-TQ).

In order to determine total content of Ag on PLA functionalised with Ag (Ag-PLA), make preliminary evaluations on the presence of element potentially migrant (considering those elements for which the EU Regulation establishes Specific Migration Limits – SML: Ba, Co, Cu, Fe, Li, Mn and Zn) on PLA-TQ and Ag-PLS, and to evaluate eventual differences between the elemental contents in the pellets used as raw material, in both PLA-TQ and PLA-Ag, an analytical method to determine the total elemental content by ICP-AES has been set up. The method foresees a pre-treatment procedure of sample total dissolution by a high-pressure microwave digestion system. The methodologies to perform the overall and specific migration tests have been set up with different food simulants, at different temperatures and with different contact times, according to Reg. (UE) n 10/2011 (consolidated version 2014). Overall Migration (OM) has been evaluated gravimetrically, while Specific Migration (SM) of Ag in the simulant solutions collected at the different conditions (different t and T) has been determined by ICP-MS. Furthermore, dry residue obtained from the different solutions collected at the different conditions (different t and T) has been determined gravimetrically. For a wider evaluation and a better interpretation of the effects induced by food simulants at the different exposure conditions (t and T), PLA and Ag-PLA films have been submitted to thermo-gravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC).

In order to more widely characterize the material and evaluate the antibacterial effectiveness of Ag-PLA, microbiological tests have been performed using E. Coli C2984 in Luria-Bertani (LB) medium and LB broth. Static growth has been evaluated and the conditions for the dynamic growth have been established.

Finally, with the aim to study in detail the eventual release of Ag nanoparticles from Ag-PLA, a methodology based on Flow Field Fractionation (FFF) is under set up for detecting and characterizing nanoparticles in the extracts obtained from migration tests.

Keywords: Food Contact Materials, PolyLactic acid, Migration Tests, Food Simulant.

INDICE

1. INTRODUZIONE	7
2. PARTE SPERIMENTALE	9
2.1.1 Determinazione del contenuto totale di elementi	10
2.1.2 Dissoluzione dei campioni	11
2.1.3 Procedimento	11
2.1.4 Analisi ICP-AES	12
2.1.5 Procedimento	12
2.2 Test di migrazione	14
2.2.1 Descrizione dei test	14
2.2.2 Determinazione della migrazione globale	17
2.2.3 Determinazione della migrazione specifica dell'argento	18
2.2.4 Determinazione del residuo secco nelle soluzioni di simulanti	23
2.3 Analisi termiche	23
2.3.1 Descrizione dei campioni	23
2.3.2 Analisi termogravimetrica	24
2.3.3 Analisi calorimetrica	24
2.4 Test microbiologici	25
2.5 Individuazione e caratterizzazione di nanoparticelle mediante FFF	26
3 RISULTATI E DISCUSSIONE	27
4 CONCLUSIONI	43
Bibliografia	46

1. INTRODUZIONE

Il packaging può essere definito, in termini del suo ruolo protettivo, come un “mezzo tramite il quale assicurare una consegna di prodotti alimentari in condizioni idonee per l'utente finale, al minimo costo”; oppure, in termini commerciali, come una “funzione tecnico-economica per l'ottimizzazione delle spese di consegna merci, che consente di massimizzare le vendite e i profitti” (P. Fellows,2000).

Le nuove tecnologie di confezionamento, che sono in continua evoluzione, devono da un lato garantire la funzione di protezione degli alimenti e dall'altro lato tenere in considerazione i costi in termini di energia e materiali, l'aumentata coscienza sociale in termini di impatto ambientale e riciclaggio e le severe normative riguardanti gli aspetti di sicurezza alimentare e di smaltimento dei rifiuti (K. Marsh et al., 2007).

I MOCA (“Materiali e oggetti in contatto con alimenti”) sono “i materiali e gli oggetti destinati a venire a contatto, direttamente o indirettamente, con i prodotti alimentari”, essi “devono essere sufficientemente inerti da escludere il trasferimento di sostanze ai prodotti alimentari in quantità tali da mettere in pericolo la salute umana o da comportare una modifica inaccettabile della composizione dei prodotti alimentari o un deterioramento delle loro caratteristiche organolettiche” (Regolamento CE 1935/2004).

La normativa generale MOCA (Reg. CE 1935/2004) contiene i principi della Legislazione sulla Sicurezza Alimentare (Reg. CE 178/2002), e prevede che le disposizioni che possono avere implicazioni sulla salute pubblica, siano adottate previa consultazione dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) che opera in conformità a quanto stabilito nell'Art 10 del Regolamento CE 1935/2004.

La sicurezza dei materiali destinati a venire a contatto con gli alimenti deve essere valutata in quanto le sostanze chimiche possono migrare dai materiali a contatto ai cibi. I materiali dovrebbero essere fabbricati in base alle disposizioni dei regolamenti dell'Unione Europea, che impongono buone pratiche di fabbricazione affinché qualsiasi potenziale trasferimento agli alimenti non implichi pericoli per la salute umana, modifiche inaccettabili della composizione del prodotto e/o un deterioramento delle sue qualità organolettiche.

Negli ultimi anni il crescente utilizzo di materiali di imballaggio di natura plastica, che tra plastica flessibile (film) e plastica rigida rappresentano il 30% del mercato (K. Kapiris et al., 2012), ha portato ad un aumento della preoccupazione da parte della comunità scientifica sul rischio di migrazione di componenti indesiderate negli alimenti, quali monomeri residui e additivi (es.: plastificanti e solventi) utilizzati nella fabbricazione dei polimeri destinati al contatto diretto con i prodotti alimentari (R. Coles et al., 2003).

Il Regolamento (UE) n 10/2011 stabilisce quali materie plastiche possono essere utilizzate nel packaging alimentare.

In seguito all'aumento della sensibilità dei consumatori nei confronti delle problematiche ambientali e delle nuove normative in materia di riduzione dei rifiuti, l'industria della plastica si sta orientando sempre più verso la produzione di polimeri di origine naturale, detti biopolimeri o bioplastiche, prodotte a partire da fonti rinnovabili come polisaccaridi (amido, cellulosa, lignina, etc.), proteine (gelatina, lana, seta, etc.), lipidi (grassi e oli), poliesteri prodotti dalle piante o dai microrganismi (es.: poliidrossialcanoati - PHA), poliesteri derivati da monomeri bio-derivati (es.: acido polilattico - PLA) e altri polimeri quali gomme naturali e polimeri compositi (K. M. Nampoothiri et al., 2010).

Tra le bioplastiche, l'acido polilattico (PLA) è una delle più utilizzate; derivato completamente da fonti rinnovabili (prodotta a partire dall'acido L-lattico puro); il suo ciclo di produzione è in accordo con il modello dello sviluppo sostenibile in quanto può significativamente contribuire al controllo delle emissioni di gas serra principalmente tramite la cattura della CO₂ da parte delle piante di mais in crescita (S.S. Ray, 2012).

Negli ultimi anni la ricerca nel campo dei nano-biocompositi, ossia materiali nanocompositi basati su una matrice biodegradabile, è sempre più attiva (L. Avérous, 2008).

Nel packaging alimentare, i nanomateriali sono utilizzati per legarsi alla matrice polimerica ed offrire resistenza meccanica oppure una barriera ai gas, ai componenti volatili o all'umidità. Una delle applicazioni più interessanti riguarda gli imballaggi attivi e intelligenti con funzione antimicrobica, nei quali vengono incorporate nano-particelle di argento che conferiscono quindi al packaging proprietà antibatteriche.

Eventuali problemi di sicurezza dei consumatori derivati dall'utilizzo di nanoparticelle negli imballaggi alimentari possono derivare dalla migrazione - un fenomeno di contaminazione degli alimenti per effetto di un trasferimento di massa di alcune sostanze (dette migranti) dal materiale a contatto all'alimento - dei nanomateriali nei prodotti alimentari confezionati o l'aumentata migrazione di altri composti presenti nel materiale di imballaggio a seguito della funzionalizzazione con nanoparticelle; inoltre vi sono limitazioni analitiche nella misura e determinazione delle NPs in diverse matrici che rendono difficili le valutazioni di esposizione e di tossicità. Inoltre in mancanza di test specifici e validati e di studi di esposizione a lungo termine, la valutazione deve essere fatta caso per caso in quanto le NPs sono varie per morfologia, dimensione, superficie, attività catalitica, ecc.

La migrazione (che può essere globale o specifica) è un fenomeno che avviene in maniera graduale, per cui è importante stabilire il tempo di contatto tra l'imballaggio e il prodotto alimentare e dipende da alcuni fattori intrinseci dell'alimento come attività dell'acqua, contenuto di grassi, pH, ecc.

Per questo motivo la ricerca si sta sempre più orientando su un'attenta progettazione e produzione di materiali da imballaggio che abbiano livelli minimi di sostanze migranti, così da limitare a monte questa problematica (P. Fellows, 2000; N. Seltenrich, 2015).

2. PARTE SPERIMENTALE

L'attività sperimentale è stata condotta su film di acido polilattico funzionalizzato tramite deposizione di argento (Ag-PLA), confrontati con film di acido polilattico tal quale (PLA TQ).

Provini di PLA TQ e di Ag-PLA sono stati sottoposti alle seguenti prove:

- Test di migrazione con diversi simulanti alimentari, con:
- Determinazione della migrazione globale (Overall Migration - OM) per via gravimetrica;
- Determinazione della migrazione specifica (SM) dell'Ag in soluzione mediante analisi Spettrometria di Massa a Plasma Accoppiato Induttivamente (ICP-MS) delle soluzioni di simulante raccolte nelle diverse condizioni (diversi tempi e diverse temperature);
- Determinazione del residuo secco ottenuto dalle soluzioni di simulante raccolte nelle diverse condizioni (diversi tempi e diverse temperature) per via gravimetrica.
- Determinazione del contenuto totale di Ag, Ba, Co, Cu, Fe, Li, Mn e Zn nei pellets di partenza utilizzate per la realizzazione dei film di PLA e nei film di PLA TQ e Ag-PLA mediante Spettroscopia di Emissione Atomica a Plasma Accoppiato Induttivamente (ICP-AES) previa dissoluzione totale con sistema di mineralizzazione a microonde ad alta pressione.
- Analisi termica dei film di PLA TQ e Ag-PLA prima e dopo i test di migrazione mediante analisi termogravimetrica (TGA) e calorimetria differenziale a scansione (DSC).
- Test microbiologici su film di PLA TQ e Ag-PLA per la determinazione della crescita microbica statica e dinamica

Al fine di studiare nel dettaglio l'eventuale rilascio di nanoparticelle di Ag dal film di Ag-PLA, è stata poi messa a punto una metodologia basata su Field Flow Fractionation (FFF) per l'individuazione e la caratterizzazione di nanoparticelle negli estratti ottenuti dai test di migrazione.

I campioni di PLA e Ag-PLA sono stati preparati presso il Centro Ricerche ENEA di Brindisi dal Laboratorio Materiali Funzionali e Tecnologie per Applicazioni Sostenibili della Divisione Tecnologie e processi dei materiali per la sostenibilità - Dipartimento Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali (SSPT-PROMAS-MATAS), a partire da un unico lotto di acido polilattico commerciale, PLA Biopolimero Ingeo™ 4043D (Figura 8) fornito sottoforma di pellet dalla NatureWorks LLC. L'estrusione dei film di PLA è stata eseguita tramite un estrusore monovite HaakeRheomex 19/25 QC con sistema di azionamento e rullo di raffreddamento POLYLAB QC (Karlsruhe, Germania). Su una parte dei campioni di PLA così ottenuti, è stato depositato Ag (argento) sotto forma di ioni, utilizzando la tecnica dell'RF Sputtering secondo i parametri riportati in Tabella 6. La deposizione di Ag sul film di PLA è risultata omogenea, con una copertura uniforme della superficie del film di PLA con il rivestimento di Ag, come evidenziato dalle immagini registrate mediante Microscopia Elettronica a Scansione (SEM/FEG) (Figura 9). I film sono caratterizzati da una trasmittanza nel visibile pari a circa il 90% per il PLA TQ ed al 55-70% per Ag-PLA (Figura 10) e dai parametri meccanici riportati in Tabella 7.

A partire da un rotolo di PLA TQ di altezza 10 cm, sono stati ottenuti provini di dimensioni 7 x 7 cm. Dopo la deposizione, si ottengono provini di dimensioni ca. 6.5 x 6.5 cm (il bordo esterno di ca. 0.5-1 cm viene

impiegato per fissare il provino sul piattello del sistema di sputtering con kapton e viene poi rimosso). Tali provini sono stati poi tagliati a metà così da ottenere provini di Ag-PLA di dimensioni 6.5-6 x 3.5 cm. La Figura 11 mostra le immagini dei provini di film di PLA TQ e Ag-PLA.

I provini di Ag-PLA sono stati spediti presso i laboratori di Chimica Analitica del C.R. ENEA Casaccia per le successive analisi, insieme ad un campione di pellet di acido polilattico commerciale (PLA Biopolimero Ingeo™ 4043D - NatureWorks LLC) e ad un rotolo di PLA TQ di lunghezza 200 x 4.5 cm (Figura 12). Sui bordi del rotolo di PLA TQ (lati lunghi) erano presenti evidenti segni dell'estrusione; questi si presentavano, infatti, più spessi al tatto e con striature visibili ad occhio nudo. Le parti laterali sono state quindi ritagliate ed eliminate per effettuare le successive analisi su campioni il più possibile omogenei.

I bordi dei film di Ag-PLA erano più omogenei dal punto di vista dello spessore del materiale e non presentavano evidenti striature (quindi non erano presenti i segni dell'estrusione). Su questi film erano invece presenti delle disomogeneità dovute alla modalità di deposizione dell'argento: sui bordi, più precisamente agli angoli, erano presenti delle piccole zone chiare sulle quali non era evidenziabile la deposizione (Figura 13). Queste piccole zone disomogenee sono state quindi escluse.

Le parti centrali sia del PLA TQ che del Ag-PLA erano omogenee, sia dal punto di vista del materiale che della deposizione di argento (Ag-PLA), tranne che per un campione in cui era evidente una zona in cui la deposizione era disomogenea e che quindi è stato scartato (Figura 14).

Le prove sperimentali sono state condotte su

- 24 campioni di PLA TQ di dimensioni 3 x 3 cm (ritagliati dal rotolo di PLA di dimensioni 200 x 4.5 cm)
- 3 strisce di PLA TQ, ciascuna del peso di ca. 100 mg (ritagliati dal rotolo di PLA iniziale di dimensioni 200 x 4.5 cm)
- 26 provini 6.5 x 3.5cm di Ag-PLA, da cui sono stati ottenuti 52 sub-campioni 3x3 cm + 26 parti laterali
- 1 campione di pellet di acido polilattico commerciale, PLA Biopolimero Ingeo™ 4043D - NatureWorks LLC (materiale di partenza per la realizzazione dei film di PLA).

2.1.1 Determinazione del contenuto totale di elementi

Il contenuto totale di Ag, Ba, Co, Cu, Fe, Li, Mn e Zn nei pellets di PLA utilizzati per la realizzazione dei film, nel film di PLA tal quale e nel film di Ag-PLA è stato determinato mediante spettroscopia di emissione a plasma accoppiato induttivamente (ICP-AES), dopo dissoluzione completa dei campioni mediante mineralizzatore a microonde ad alta pressione.

Sono state messe a punto le procedure per l'ottenimento di una dissoluzione completa mediante attacco acido e per la determinazione del contenuto totale di elementi in soluzione.

Al fine di studiare la variabilità tra i campioni e la variabilità intra-campione i provini di Ag-PLA, i campioni sono stati suddivisi in diverse aliquote in maniera da ottenere - per ciascun provino 6.5 x 3.5 cm - 3 sub-campioni costituiti da 2 provini 3 x 3 cm ottenuti dalla parte centrale di ciascun provino + il bordo esterno.

Sono stati sottoposti ad analisi elementare le parti esterne di 15 campioni (Ag-PLA da n°1 a n°15 – Tabella 8, le cui parti interne sono state invece sottoposte ai test di migrazione) + tutte e 3 le sub-aliquote ottenute da due provini interi (Ag-PLA n°19 e n°21)

2.1.2 Dissoluzione dei campioni

2.1.2.1 Reattivi¹

- Acido nitrico (HNO_3 69%_(v/v))
- Perossido di idrogeno (H_2O_2 30%_(v/v))
- H_2O ultrapura, resistività = 18 M Ω

2.1.2.2 Apparecchiature

- Bilancia analitica Gibertini E-50 S
- Mineralizzatore a microonde ad alta pressione Milestone MLS 1200 MEGA

2.1.3 Procedimento

I campioni di pellet e di film sono stati accuratamente pesati con bilancia analitica Gibertini E-50 S e tagliati in parti molto piccole con forbici ceramiche al fine di aumentare la superficie di contatto campione/reattivi. La dissoluzione dei campioni è stata effettuata mediante mineralizzatore a microonde ad alta pressione Milestone MLS 1200 MEGA.

La metodologia di dissoluzione è stata messa a punto considerando quantità di campione comprese tra 50 e 250 mg, testando diverse miscele di reattivi in differenti volumi: HNO_3 (69.9%_(v/v)), $V = 3 \div 6$ ml; 2 ml HNO_3 (69.9%_(v/v)) + 1 ml H_2O_2 (30%_(v/v)).

Sono stati sottoposti a dissoluzione il campione di pellet di PLA, i campioni di film di PLA TQ e 20 campioni di film di Ag-PLA (di cui, 14 bordi esterni di diversi provini e 2 provini completi suddivisi in bordo esterno + 2 parti centrali). La dissoluzione del pellet e del PLA TQ è stata effettuata in triplicato. In tutti i casi è stata sottoposta a dissoluzione una quantità di campione compresa tra 50 e 100 mg.

Per la dissoluzione è stata utilizzata la seguente miscela di reattivi: 2 ml HNO_3 (69%_(v/v)) + 1 ml H_2O_2 (30%_(v/v)), applicando il programma di mineralizzazione è riportato in Tabella 1.

¹ tutti i reattivi utilizzati sono di elevato grado di purezza (99% o superiore)

Step	Tempo (min)	Potenza (W)	Pressione
1	1	250	
2	1	0	
3	5	250	<i>A salita libera</i>
4	5	400	
5	5	600	
Vent	5		

Tabella 1 Condizioni per la dissoluzione dei campioni di PLA con microonde ad alta pressione Milestone MLS 1200-MEGA

Le soluzioni limpide ottenute sono state trasferite quantitativamente in matracci tarati in vetro e portati ad un volume finale di 25 ml con acqua ultrapura e poi sottoposte ad analisi elementare mediante ICP-AES.

Sono stati preparati anche bianchi di processo (applicando la stessa procedura di dissoluzione) e dei bianchi reattivi, poi sottoposti ad analisi elementare nelle medesime condizioni dei campioni.

2.1.4 Analisi ICP-AES

Le soluzioni ottenute dalla dissoluzione dei campioni state sottoposte ad analisi quantitativa mediante Spettroscopia di Emissione Atomica a Plasma Accoppiato Induttivamente per la determinazione del contenuto totale di Ag, Ba, Co, Cu, Fe, Li, Mn e Zn al fine di:

- determinare il contenuto totale di Ag nel film di Ag-PLA;
- valutare la presenza di possibili elementi migranti nel film di PLA TQ e Ag-PLA.

2.1.4.1 Apparecchiature

- Spettrometro simultaneo di emissione atomica con sorgente a plasma accoppiato induttivamente (ICP-AES) Varian Vista MPX

2.1.4.2 Reattivi

- Soluzione standard monoelementale, 0.2 % HNO₃: Ag - 1 mg/l
- Soluzione standard multielementale, 0.5 % HNO₃: Ba - 1 mg/l; Co - 1 mg/l; Cu - 1 mg/l; Mn - 1 mg/l; Zn - 1 mg/l; Fe - 2 mg/l; Li - 2 mg/l.

2.1.5 Procedimento

Sono state effettuate prove preliminari finalizzate ad ottimizzare le condizioni analitiche in base al rapporto segnale/rumore (*signal-to-background*, S/B). Le prove sono state condotte considerando i parametri riportati in Tabella 2 e modificando un parametro alla volta, così da poter valutare ciascun effetto sul rapporto S/B. È stato poi condotto uno studio delle interferenze spettrali in base al quale sono state selezionate le lunghezze d'onda analitiche (es. per Ag, Figura 1); laddove non erano presenti interferenze spettrali, è stata selezionata come lunghezza d'onda analitica quella più intensa.

Parametro modificato	Condizioni testate
Potenza (kW)	tra 1 e 1.2
Plasma flow (L/min)	15
Auxiliary flow (L/min)	tra 0.75 e 1.5
Nebulizer flow (L/min)	tra 0.75 e 0.82
Pump rate (rpm)	tra 15 e 30
Internal stabilization delay (s)	fino a 20
Sample uptake delay (s)	fino a 30

Tabella 2 Condizioni analitiche testate per la messa a punto del metodo con ICP-AES

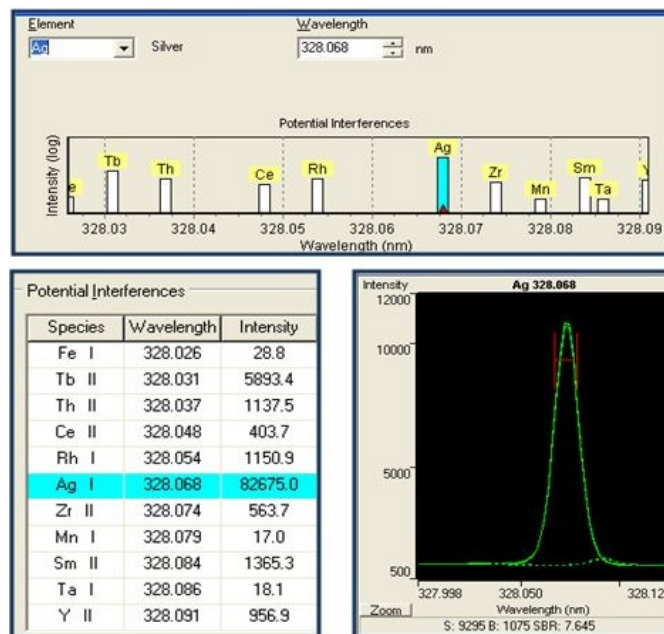


Figura 1 Valutazione delle interferenze spettrali

È stata effettuata l'analisi quantitativa operando nelle condizioni riportate in tabella 3. L'impiego di uno spettrometro con rivelatore CCD ha consentito la determinazione simultanea di Ag, Ba, Co, Cu, Fe, Li, Mn e Zn (Figura 2).

Sono state utilizzate le seguenti lunghezze d'onda (λ) analitiche: Ag - 328.068 nm; Ba-455.403 nm, Co - 238.892 nm, Cu -327.395 nm, Fe - 238.204 nm, Li-670.783 nm, Mn - 257.610 nm e Zn - 213.857 nm.

H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac															
		Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu		
		Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr		
Thorium (Th)																	

Figura 2 Elementi considerati nell'analisi qualitativa mediante ICP-AES

Per la calibrazione si sono impiegate soluzioni multielementali a titolo noto degli elementi in esame ed in particolare: una soluzione monoelementale (soluzione acquosa, 0.2 % di HNO₃), di Ag ad una concentrazione pari a 1 mg/l, ed una soluzione multielementale (soluzione acquosa, 0.5 % di HNO₃), di Ba (1 mg/l), Co (1 mg/l), Cu (1 mg/l), Mn (1 mg/l), Zn (1 mg/l), Fe (2 mg/l) e Li (2 mg/l).

Configurazione	Torcia assiale
Generatore RF	40 MHz free running raffreddato ad aria
Torcia	a tre camere concentriche in quarzo
Gas (plasmagena, ausiliario e nebulizzatore)	Argon
Spray chamber	ciclonica in vetro
Nebulizzatore	a flussi concentrici in vetro (tipo Meinhard)
Portata pompa peristaltica a 3 vie	15 l min ⁻¹
Sistema di dispersione	Policromatore Echelle termostato a 35°C e purgato con gas inerte; lunghezza focale 400 mm; prisma CaF ₂ ; reticolo 9474 righe/mm.
Rivelatore	CCD 1,12 milioni di pixel 15x15 µm con raffreddamento <i>peltier</i> a doppio stadio (-30°C) e protezione anti <i>blooming</i>
Software per controllo strumentazione e acquisizione/trattamento dati	ICP Expert versione 4
Potenza RF (kWatt)	1.2
Flusso gas plasmagena (L min ⁻¹)	15
Flusso gas ausiliario (L min ⁻¹)	1.5
Flusso gas al nebulizzatore (L min ⁻¹)	0.82
Replicate read time (s)	5
Internal stabilization delay (s)	20
sample uptake delay (s)	30
Pump rate (rpm)	30
Rinse time (s)	10
Replicates	5

Tabella 3 Caratteristiche tecniche e condizioni operative ICP-AES Varian Vista MPX

Al fine di valutare le interferenze di background e di studiare gli effetti dei reattivi e del pretrattamento, sono stati analizzati anche H₂O ultrapura, bianchi reattivi e bianchi di processo. Sono state inoltre condotte prove di stabilità del segnale, effettuando misure replicate sulle soluzioni standard degli elementi da quantificare. Le soluzioni ottenute dalla dissoluzione dei campioni sono state analizzate tal quali. Per tutte le letture, sono state effettuate 5 repliche con un tempo di integrazione di 5 s ciascuna.

2.2 Test di migrazione

I test di migrazione globale (*Overall Migration* - OM) e specifica (*Specific Migration* - SM) sono stati effettuati ponendo a contatto campioni di film di PLA TQ ed Ag-PLA con alcuni simulanti alimentari per diversi tempi e a diverse temperature in accordo con il Regolamento UE 10/2011.

Sono stati utilizzati i seguenti simulanti alimentari:

- Etanolo (CH₃CH₂OH) 10%_{v/v} (Simulante A) – alimenti a carattere idrofilo;
- Acido acetico (CH₃COOH) 3%_{p/v} (Simulante B) – alimenti con pH < 4.5;
- Olio di semi di girasole (Simulante D2) – alimenti a carattere lipofilo, contenenti grassi liberi.

Per la messa a punto della metodologia sono state valutate:

- le dimensioni del campione: tali da consentire di rilevare una migrazione globale $\leq 10 \text{ mg/dm}^2$, conformemente a quanto stabilito dal Reg. (UE) 10/2011 - versione consolidata al 2014);
- il volume di simulante da utilizzare: secondo un rapporto superficie/volume (cm^2/cm^3) compreso tra 2 e 0.4, conformemente a quanto stabilito dal DM 21/3/73 s.m.i.;
- i tempi e le temperature di contatto, in accordo a quanto stabilito dal Reg. (EU) 10/2011).

I provini di Ag-PLA sono stati ritagliati con forbici ceramiche (per evitare la contaminazione con eventuali elementi metallici) in modo da ottenere per ciascuno 2 sub-campioni di dimensioni 3 x 3 cm + il bordo esterno (Figura 3). Analogamente sono stati ottenuti campioni di PLA TQ di dimensioni 3 x 3 cm ritagliando sempre con forbici ceramiche il rotolo di PLA.



Figura 3 Campioni di Ag-PLA (a sinistra) e il bordo ritagliato (a destra)

2.2.1.1 Apparecchiature

- Stufa a ventilazione forzata Memmert ULM 500
- Bagno termostatico ad acqua NUVE BS 402
- Bilancia analitica Gibertini E-50 S

2.2.1.2 Simulanti alimentari utilizzati

- $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 10%_{v/v} (Simulante A)
- CH_3COOH 3%_{p/v} (Simulante B)
- Olio di semi di girasole (Simulante D2)
- H_2O ultrapura, resistività = 18 M Ω

2.2.1.3 Procedimento

In primo luogo è stata valutata la modalità di posizionamento dei campioni nei diversi simulanti utilizzati in considerazione del fatto che in H_2O , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 10%_{v/v} (Simulante A) ed CH_3COOH 3%_{p/v} (Simulante B) il film di PLA tende a galleggiare, mentre nell'olio di semi di girasole (Simulante D2) il film di PLA tende ad andare a fondo. Al fine di garantire in tutti i casi il contatto tra la faccia del film di Ag-PLA funzionalizzata con Ag ed il simulante alimentare, i campioni di Ag-PLA sono stati posizionati in H_2O , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ed CH_3COOH con la faccia con la deposizione di Ag rivolta verso il basso, mentre nell'olio di semi di girasole sono stati posizionati con la faccia con la deposizione di Ag rivolta verso l'alto (Figura 4).

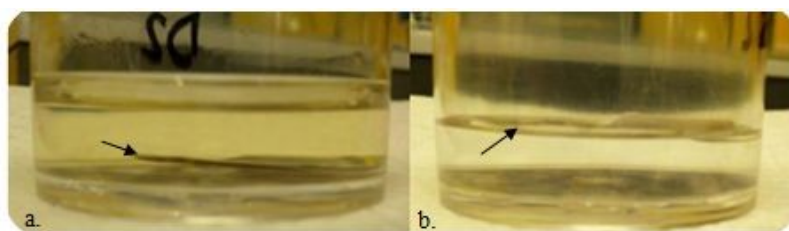


Figura 4 a. Campione di Ag-PLA in olio di semi di girasole (D2) b. Campione di Ag-PLA in $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 10% v/v (A)

Prima di effettuare i test migrazione, i sub-campioni 3 x 3 cm sono stati lavati con acqua deionizzata (resistività $> 18 \text{ M}\Omega$) per allontanare eventuali residui della lavorazione, asciugati in stufa a ventilazione forzata Memmert ULM 500 a 40°C fino a costanza di peso e successivamente pesati con bilancia analitica Gibertini E-50 S.

I campioni di PLA TQ e Ag-PLA (ognuno nel verso corretto) sono stati posti in beute da 50 ml a contatto con 22.5 ml di ciascun simulante alimentare (H_2O ultrapura, Simulante A - $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 10% v/v , Simulante B - CH_3COOH 3% p/v , Simulante D - olio di semi di girasole), avendo così un rapporto superficie/volume pari a 0.4.

Le prove di migrazione sono state effettuate alle temperature di 20°C , 40°C e 70°C in bagno termostatico ad acqua NUVE BS 402 (Figura 5).



Figura 5 Bagno termostatico ad acqua NUVE BS 402

In Tabella 4 si riportano, per le diverse temperature T , i tempi di contatto t considerati per il prelievo delle soluzioni di simulante da utilizzare per la valutazione della migrazione specifica (SM) e i tempi di contatto per la valutazione della migrazione globale (OM). A ciascun tempo t (*) la soluzione di simulante è stata prelevata e conservata per le successive analisi (determinazione del contenuto di Ag in soluzione per la valutazione della migrazione specifica e determinazione del residuo secco). Sono stati quindi aggiunti ulteriori 22.5 ml di soluzione fresca e si è proseguita l'esposizione del campione alle stesse condizioni fino al raggiungimento del time-point successivo.

Per i simulanti A, B e D2 sono stati effettuati i test per la determinazione della migrazione globale e specifica in tutte le condizioni riportate in Tabella 4, mentre per l' H_2O ultrapura sono stati effettuati i test di migrazione globale (*Overall Migration* - OM) a 40°C e 70°C .

	T = 20 °C		T = 40 °C		T = 70 °C
t = 5 min	*		*		*
t=30min	*		*		*
t = 1 h	*		*		*
t = 2 h	*		*		*OM3
t = 4 h	*		*		
t = 6 h	*		*		
t = 24 h	*		*		
t = 3 gg	*		*		
t = 10 gg		*OM1		*OM2	

Tabella 4 Tempi di contatto per la valutazione della migrazione specifica e globale

Dopo il test di migrazione (per tempi e temperature stabiliti) i campioni sono stati nuovamente lavati con acqua deionizzata, asciugati in stufa a 40 °C fino a costanza di peso e pesati con bilancia analitica per la determinazione della migrazione globale (OM).

Tutte le prove sono state eseguite in doppio. In particolare, per le prove a 20 °C e 40 °C, sono stati testati 4 campioni 3 x 3 cm di Ag-PLA e 1 campione 3 x 3 cm di PLA TQ per ciascun simulante (per ciascuna temperatura, 15 campioni = 5 campioni x 3 simulanti). La prova a 40 °C a 10 giorni con il Simulante A è stata poi ripetuta una seconda volta per confermare i risultati ottenuti nel primo test (2 campioni di PLA TQ + 2 campioni di Ag-PLA). Per la prova a 70 °C sono stati testati 2 campioni 3 x 3cm di Ag-PLA ed 1 campione 3 x 3 cm di PLA TQ per ogni simulante (per un totale di 9 campioni). La prova a 70 °C è stata poi ripetuta una seconda volta con 6 campioni di PLA TQ e 6 campioni di Ag-PLA (per un totale di 12 campioni 3 x 3 cm), utilizzando i simulanti alimentari A e B e l'acqua ultrapura.

2.2.2 Determinazione della migrazione globale

La migrazione globale (OM) è stata valutata per via gravimetrica come perdita di peso dopo il trattamento con i simulanti alimentari. Sono stati presi in considerazione i campioni di film di PLA TQ e Ag-PLA trattati con CH₃CH₂OH 10%_{v/v} (Simulante A) e CH₃COOH 3%_{p/v} (Simulante B) a 20 °C per 10 giorni, 40 °C per 10 giorni e 70 °C per 2 h (Tabella 12) e con H₂O ultrapura a 40 °C per 10 giorni e 70 °C per 2 h.

2.2.2.1 Apparecchiature

- Bilancia analitica Gibertini E-50 S

2.2.2.2 Procedimento

I campioni 3 x 3 cm di film di PLA TQ e Ag-PLA sottoposti ai test di migrazione come descritto nel paragrafo 2.3 sono stati pesati prima e dopo l'esposizione ai simulanti alimentari con bilancia analitica Gibertini E-50 S (precisione±0.01 mg), dopo essere stati condizionati in stufa a 40 °C fino a costanza di peso. La migrazione globale (OM) è stata determinata come differenza tra il peso dei campioni dopo il test ed il peso dei campioni prima del test ed è stata espressa in g.

2.2.3 Determinazione della migrazione specifica dell'argento

Per la determinazione della migrazione specifica (SM) dell'argento, le soluzioni dei simulanti alimentari A ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 10%_{v/v}) e B (CH_3COOH 3%_{p/v}) prelevati ad ogni time-point (*) dei test di migrazione (Tabella 4) sono state analizzate mediante ICP-MS.

In particolare è stato impiegato uno spettrometro Bruker Aurora M90, le cui caratteristiche tecniche sono riportate in tabella 5.

Sistema di introduzione del campione	esterno al box della torcia, gestito da PC, dotato di <i>spray chambre</i> raffreddata con <i>cella Peltier</i> , nebulizzatore concentrico a basso flusso e pompa peristaltica a tre canali
Generatore RF	a stato solido, 27.12 MHz equipaggiato con sistema di bobine intrecciate (<i>Turner interlaced coils</i> , US Patent 5,194,731)
Potenza RF (Watt)	600-1600
Gas (plasmageno, ausiliario, nebulizzatore e <i>sheath</i>)	Argon
Sistema per il controllo delle interferenze poliatomiche	<i>Collision Reaction Interface</i> (CRI, US Patent 7,329,863 B2)
Sistema per la focalizzazione selettiva degli ioni all'ingresso del quadrupolo	<i>Ion Mirror</i> con riflessione di 90° (US Patent 6,614,021 B1)
Quadrupolo	tipo off-axis con barre curvate (<i>fringe roads</i>) brevettate (US Patent 6,762,407 B2)
Rivelatore	<i>Discrete Dynode Electron Multiplier</i> (DDEM)
Software per controllo strumentazione e acquisizione/trattamento dati	Bruker Quantum 3.0

Tabella 5 Caratteristiche tecniche ICP-MS Aurora M90

2.2.3.1 Apparecchiature

- Spettrometro di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) Bruker Aurora M90 (90 degree ion mirror ion optics, *Collision Reaction Interface*)

2.2.3.2 Reattivi

- H_2O ultrapura acidulata con HNO_3 1%_{v/v}
- Soluzione standard multielementale (*tune solution*): Be, Mg, Co, In, Ba, Ce, Tl, Pb, Th - 5 $\mu\text{g/l}$
- Soluzioni standard monoelementali di argento (Ag) in H_2O (1% HNO_3) e CH_3COOH al 3%_{p/v}, alle seguenti concentrazioni: 5 mg/l; 100 $\mu\text{g/l}$; 50 $\mu\text{g/l}$ (*Livello 5*); 20 $\mu\text{g/l}$ (*Livello 4*); 5 $\mu\text{g/l}$ (*Livello 3*); 1 $\mu\text{g/l}$ (*Livello 2*); 0.1 $\mu\text{g/l}$; 0.5 $\mu\text{g/l}$ (*Livello 1*); 0.1 $\mu\text{g/l}$; 0.05 $\mu\text{g/l}$
- Soluzioni standard monoelementali di argento (Ag) in $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 5%_{v/v}, alle seguenti concentrazioni: 5 mg/l; 50 $\mu\text{g/l}$ (*Livello 5*); 20 $\mu\text{g/l}$ (*Livello 4*); 5 $\mu\text{g/l}$ (*Livello 3*); 1 $\mu\text{g/l}$ (*Livello 2*); 0.5 $\mu\text{g/l}$ (*Livello 1*); 0.3 $\mu\text{g/l}$;
- Soluzione standard monoelementale di indio (In) in H_2O (1% HNO_3): 20 $\mu\text{g/l}$

2.2.3.3 Procedimento

Preliminarmente è stata effettuata un'operazione di *tuning* del sistema ICP-MS utilizzando una soluzione di Be, Mg, Co, In, Ba, Ce, Ti, Pb e Th 5 $\mu\text{g/l}$, al fine di ottimizzare la sensibilità e la risoluzione e per la

calibrazione delle masse con il controllo dell'accuratezza dell'identificazione dei valori dei rapporti m/c (Figura 6).

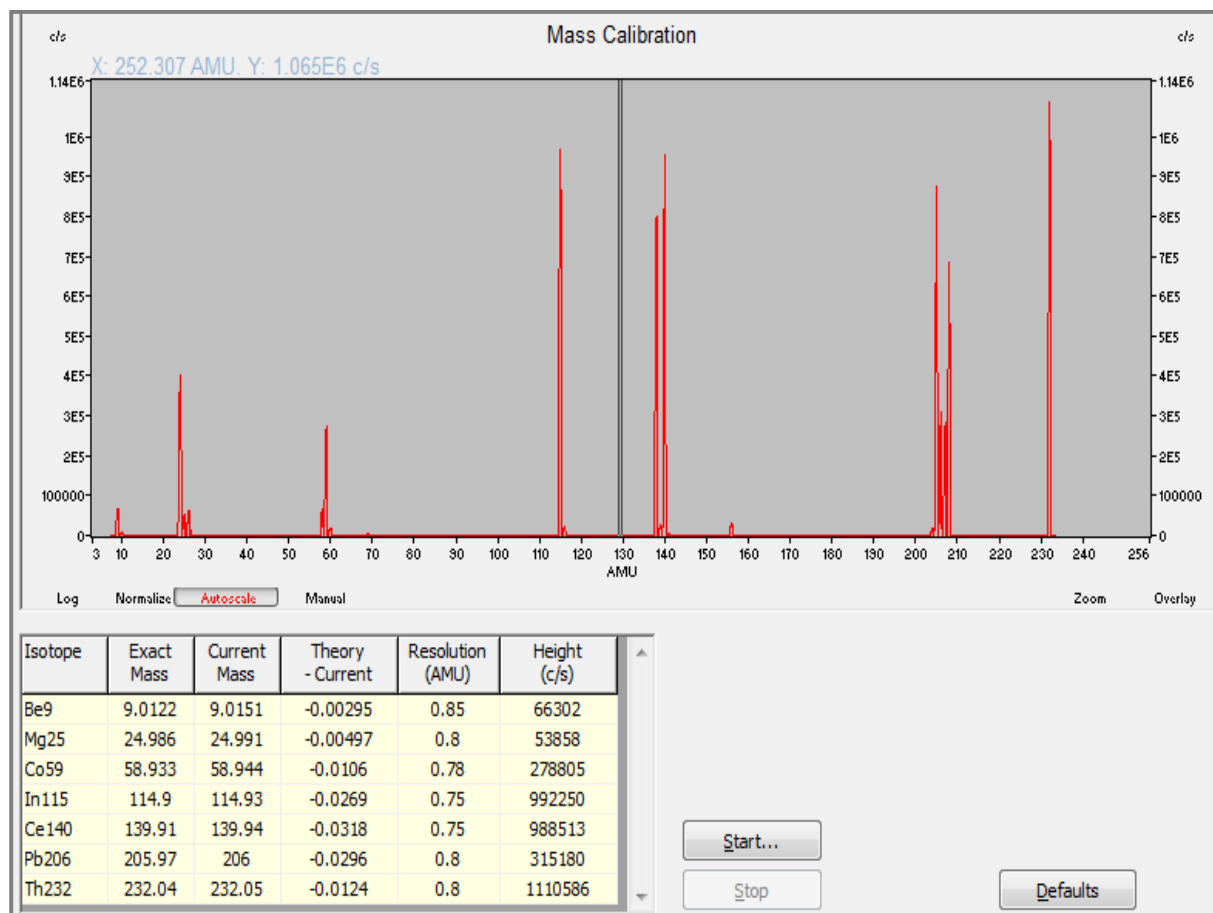


Figura 6 ICP-MS - Mass Calibration

Al fine di valutare l'effetto dei simulanti sul segnale strumentale e di ottimizzare le condizioni analitiche, sono state condotte delle prove preliminari utilizzando soluzioni standard di Ag preparate in H₂O acidulata (1% HNO₃), in CH₃COOH 3%_{p/v} e in CH₃CH₂OH 10%_{v/v} a diverse concentrazioni (da 0.5 mg/l a 0.05 µg/l). Sono stati effettuati confronti considerando specificatamente la risposta strumentale nella determinazione di Ag107 e sono state ottimizzate le condizioni considerando sia le condizioni per l'introduzione del campione e l'atomizzazione ICP (Tabella 6), l'*ion optics* ed il *dwell time* per la scansione della massa di Ag107 (sono stati testati *dwell time* compresi tra 30.000 e 80.000 µs).

Parametro modificato	Condizioni testate
Plasma flow (l/min)	tra 16.5 e 18
Auxiliary flow (l/min)	2.10
Sheath flow (l/min)	tra 0.16 e 0.11
Nebulizer flow (l/min)	1.2
Pump rate (rpm)	4-6

Tabella 6 Condizioni per l'introduzione del campione e l'atomizzazione ICP testate per la messa a punto delle metodologie analitiche mediante ICP-MS

In particolare sono state messe a punto due diverse metodologie: la prima per la determinazione dell'Ag nelle soluzioni in H₂O e in CH₃COOH 3%_{p/v} e la seconda per la determinazione dell'Ag nelle soluzioni in CH₃CH₂OH al 5 %_{v/v}.

Le soluzioni in CH₃COOH 3%_{p/v} (Simulante B) sono state analizzate tal quali, nelle condizioni riportate in Tabella 7.

Condizioni strumentali		
Gas flow parameters (Argon)	Plasma flow	16.50 l/min
	Auxiliary flow	2.00 l/min
	Nebulizer flow	1.00 l/min
	Sheath flow	0.16 l/min
Plasma power	RF power	1.40 kW
Sample introduction	Sampling depth	7.5 mm
	Pump rate	4 rpm
Ion optics	First extraction lens	0 V
	Second extraction lens	- 169.00 V
	Third extraction lens	- 204.00 V
	Corner lens	- 209.00 V
	Mirror lens left	45.00 V
	Mirror lens right	22.00 V
	Mirror lens bottom	38.00 V
	Fringe bias	- 2.50 V
Quadrupole scan	Scan mode	Peak hopping
	Dwell time	40.000 µs
	Points per peak	1
	Scans/Replicate	10
	Replicates/Sample	5
Isotopi analizzati		Ag107
Standard Interno		In115

Tabella 7 Condizioni strumentali per la determinazione di Ag mediante ICP-MS (Bruker Aurora M90) – CH₃COOH3%_{p/v}

Le soluzioni in CH₃CH₂OH 10%_{v/v} (Simulante A) sono state analizzate dopo diluizione almeno 1:2 con H₂O ultrapura, nelle condizioni riportate in Tabella 8. Tale diluizione si è resa necessaria per ridurre il tenore di CH₃CH₂OH.

Inoltre, laddove necessario, le soluzioni sia in CH₃COOH che in CH₃CH₂OH sono state ulteriormente diluite al fine di rientrare nel range di linearità (da 1:2 fino a 1:4).

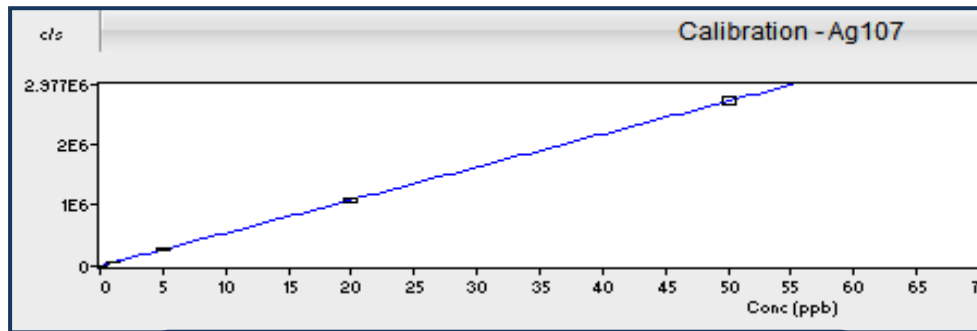
In tutti i casi, sia in fase di *tuning* che in fase di ottimizzazione delle metodologie per l'analisi delle soluzioni in CH₃COOH 3%_{p/v}/CH₃CH₂OH 5%_{v/v}, i livelli di ioni ossidi sono stati controllati considerando il rapporto CeO⁺/Ce⁺ (< 2%), mentre gli ioni a doppia carica sono stati monitorati considerando il rapporto ¹³⁷Ba⁺⁺/¹³⁷Ba⁺ (< 3%).

In entrambi i casi è stata effettuata una calibrazione esterna utilizzando 5 soluzioni a titolo noto di Ag + la soluzione del bianco (rispettivamente CH₃COOH 3%_{p/v} tal quale e CH₃CH₂OH 10%_{v/v} diluito 1:2 con acqua ultrapura). Gli intervalli di lavoro sono stati i seguenti:

- Ag - 0.05 ÷ 50 µg/l per le soluzioni in CH₃COOH 3%_{p/v} (Figura 7)
- Ag - 0.3 ÷ 50 µg/l per le soluzioni in CH₃CH₂OH 5%_{v/v} (Figura 8)

Come standard interno è stata utilizzata una soluzione acquosa (1% HNO₃) di In alla concentrazione di 20 µg/l.

La stabilità del segnale è stata valutata effettuando misure replicate sulla soluzione standard di Ag (*Livello 3*) in H₂O (1% HNO₃) - 20 µg/l, in CH₃COOH al 3%_{p/v} - 20 µg/l e in CH₃CH₂OH al 5%_{v/v} - 5 µg/l.

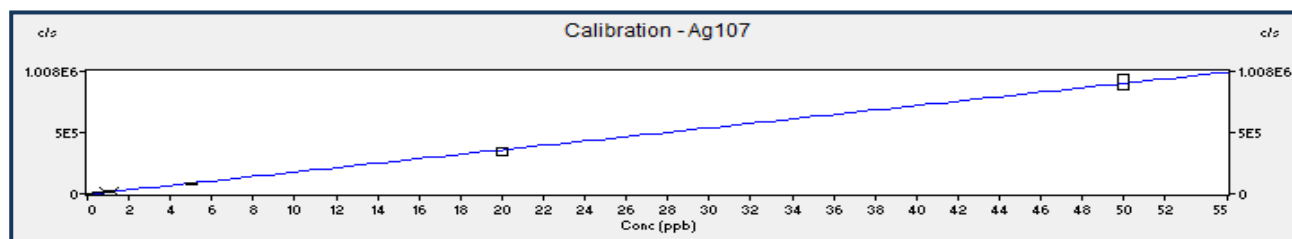


Curve Fit: Linear, Weighted Fit: No, Thru Blank: No
 Correlation Coefficient: 1.000000
 Calibration Equation: $c/s = (2438.2 + 64.84 \times \text{Conc})$

Figura 7 Intervallo di lavoro e correlazione lineare per la determinazione dell'Ag mediante ICP-MS - CH₃COOH 3%_{p/v}

Condizioni strumentali		
Gas flow parameters (Argon)	Plasma flow	18.00 l/min
	Auxiliary flow	2.20 l/min
	Nebulizer flow	1.20 l/min
	Sheath flow	0.11 l/min
Plasma power	RF power	1.40 kW
Sample introduction	Sampling depth	7.5 mm
	Pump rate	6 rpm
Ion optics	First extraction lens	- 514.00 V
	Second extraction lens	- 852.00 V
	Third extraction lens	- 541.00 V
	Corner lens	- 562.00 V
	Mirror lens left	91.00 V
	Mirror lens right	51.00 V
	Mirror lens bottom	56.00 V
Quadrupole scan	Fringe bias	- 3.40 V
	Scan mode	Peak hopping
	Dwell time	60.000 μ s
	Points per peak	1
	Scans/Replicate	10
	Replicates/Sample	5
Isotopi analizzati		Ag107
Standard Interno		In115

Tabella 8 Condizioni strumentali per la determinazione di Ag mediante ICP-MS (Bruker Aurora M90) – CH₃CH₂OH 5%_{v/v}



Curve Fit: Linear, Weighted Fit: No, Thru Blank: No
Correlation Coefficient: 0,999648

Figura 8 Intervallo di lavoro e correlazione lineare per la determinazione dell'Ag mediante ICP-MS - CH₃CH₂OH 5%_{p/v}

2.2.4 Determinazione del residuo secco nelle soluzioni di simulanti

Il residuo secco di alcune delle soluzioni prelevate ai diversi time-point (*) (Tabella 12) è stato determinato per via gravimetrica.

2.2.4.1 Apparecchiature

- Stufa a ventilazione forzata Memmert ULM 500
- Bagno termostatico ad acqua NUVE BS 402
- Bilancia analitica Gibertini E-50 S

2.2.4.2 Procedimento

10 ml di soluzione prelevata a ciascun time-point sono stati trasferiti in pesafiltri (portati precedentemente a peso costante in stufa a ventilazione forzata Memmert ULM 500a 40 °C e tarati), fatti essiccare in bagno termostatico ad acqua NUVE BS 402 a 40 °C e portati a peso costante in stufa a 40 °C. Al fine di ottenere un campione rappresentativo di entrambe le repliche per ciascun time-point, i 10 ml sono stati ottenuti prelevando 5 ml di soluzione per ciascuna replica e miscelandoli insieme. Il residuo secco è stato determinato per via gravimetrica utilizzando una bilancia analitica Gibertini E-50 S.

In Tabella 9 si riporta un elenco dettagliato delle soluzioni sulle quali è stata effettuata la determinazione, con le rispettive condizioni per i test di migrazione specifica.

Temperatura test di migrazione (°C)	Time-point	Campioni	Simulanti
70	t1	5 ml 16A + 5 ml 16B	CH ₃ CH ₂ OH 10% _{v/v}
	t2	5 ml 16A + 5 ml 16B	
	t3	5 ml 16A + 5 ml 16B	
	t4	5 ml 16A + 5 ml 16B	
	t1	5 ml 17A + 5 ml 17B	CH ₃ COOH 3% _{p/v}
	t2	5 ml 17A + 5 ml 17B	
	t3	5 ml 17A + 5 ml 17B	
	t4	5 ml 17A + 5 ml 17B	
40	t9	5 ml 4B + 5 ml 5B	CH ₃ CH ₂ OH 10% _{v/v}
	t9	5 ml 6B + 5 ml 7B	CH ₃ COOH 3% _{p/v}

Tabella 9 Elenco dei campioni portati a secco

2.3 Analisi termiche

Campioni nuovi di PLA TQ e Ag-PLA ed alcuni campioni di PLA TQ e Ag-PLA sottoposti ai test di migrazione sono stati sottoposti ad analisi termiche mediante termo gravimetria (TGA - *Thermogravimetric Analysis*) e calorimetria differenziale a scansione (DSC - *Differential Scanning Calorimetry*).

2.3.1.1 Apparecchiature

- Termogravimetro SDT Q600 (TA Instruments)
- Calorimetro DSC Q100 (TA Instruments)

2.3.2 Analisi termogravimetrica

Sono stati analizzati i seguenti campioni: PLA TQ nuovo (non sottoposto a test di migrazione), PLA TQ sottoposto a test di migrazione con $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 10%_{v/v} per 10 giorni a 40 °C.

I campioni sono stati tagliati con un'apposita fustella al fine di ottenere dei piccoli dischetti del diametro di 5 mm e messi in essiccatore al fine di garantire le medesime condizioni di temperatura e umidità per tutti i campioni prima della prova.

Ciascuna analisi è stata effettuata su 2 dischetti sovrapposti per avere un peso totale di campione compreso tra 1 e 3 mg.

I dischetti sono stati posizionati nel porta campione di allumina e inseriti nella fornace. Le analisi sono state condotte partendo da una temperatura iniziale di 40 °C, nelle seguenti condizioni operative:

- Equilibramento fino a $T = 40$ °C
- Programmata di temperatura in riscaldamento: da 40 a 260 °C;
- Velocità di riscaldamento: 20 °C/min
- Flusso di argon: 100 ml/min

Un secondo porta campione in allumina vuoto è stato utilizzato come riferimento.

Sono state così ottenute le curve termogravimetriche che hanno consentito di valutare la stabilità termica dei campioni e la massima temperatura alla quale si può scaldare il polimero.

2.3.3 Analisi calorimetrica

Sono stati analizzati i seguenti campioni: PLA TQ nuovo e Ag-PLA nuovo (non sottoposto a test di migrazione), PLA TQ e Ag-PLA sottoposti a test di migrazione con $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 10%_{v/v} per 10 giorni a 40 °C, PLA TQ e Ag-PLA sottoposti a test di migrazione con $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 10%_{v/v} per 2 ore a 70 °C

I campioni sono stati tagliati con un'apposita fustella al fine di ottenere dei piccoli dischetti del diametro di 5 mm messi in essiccatore al fine di garantire le medesime condizioni di temperatura e umidità per tutti i campioni prima della prova. Un singolo dischetto di PLA (di peso variabile, compreso tra 1.2 e 1.6 mg) è stato posizionato nell'apposito crogiolo di alluminio e chiuso con tappo; il crogiolo ed il tappo sono stati poi sigillati insieme tramite l'utilizzo di un'apposita pressa. Il campione è stato quindi posizionato nell'apposito alloggiamento all'interno dello strumento ed è stata creata un'atmosfera inerte con flusso continuo e uniforme di argon.

Le analisi sono state effettuate nelle seguenti condizioni operative:

- Equilibramento fino a $T = 0$ °C
- Programmata di temperatura in riscaldamento: da 0 a 140 °C;
- Velocità di riscaldamento: 3 °C/min
- Flusso di argon: 100 ml/min

Sono stati così ottenuti dei termogrammi che permettono di evidenziare le variazioni della struttura del PLA all'aumentare della temperatura.

2.4 Test microbiologici

Al fine di valutare l'attività antimicrobica dell'Ag depositato sul film di Ag-PLA sono stati condotti dei test microbiologici valutando la crescita di *Escherichia coli* C2984 (cellule competenti) in coltura su terreno LB (Luria-Bertani) e un brodo di coltura LB.

Sono state valutate sia la crescita dinamica che la crescita statica ed in entrambi i casi sono state confrontate le esposizioni di *E. Coli* in presenza di PLA TQ e di Ag-PLA.

Sono stati effettuati anche confronti preliminari con altri campioni di film di Ag-PLA a minor deposizione di argento (il Centro Ricerche ENEA di Brindisi dal Laboratorio *Materiali Funzionali e Tecnologie per Applicazioni Sostenibili* della Divisione *Tecnologie e processi dei materiali per la sostenibilità* - Dipartimento *Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali* (SSPT-PROMAS-MATAS). In tabella 10 si riporta l'elenco dei campioni utilizzati per i test microbiologici.

Campioni	Condizioni di deposizione	Dimensioni (cm)
PLA TQ	-	1 x 1
Ag-PLA 01	5 giri 40 watt	1 x 1
Ag-PLA 02	3 giri 40 watt	1 x 1
Ag-PLA 03	1 giro 40 watt	1 x 1

Tabella 10 Campioni utilizzati nei test microbiologici

Prima dei test, i campioni sono stati sterilizzati per 20 minuti sotto cappa biologica.

Il terreno è stato preparato utilizzando il ceppo di *E. coli* C2984 (cellule competenti) in coltura overnight (o/n), preparando sotto cappa biologica 5 piastre Petri con terreno LB (Luria-Bertani) e un brodo di coltura LB (30 ml).

Considerando che per la valutazione dinamica della crescita occorre misurare l'assorbanza (OD) del terreno di coltura a 600 nm mediante spettrofotometro UV-Vis e per effettuare la valutazione statica a partire dalle stesse condizioni iniziali di coltura, sono state dapprima messe a punto le condizioni per l'analisi spettrofotometrica. A tale scopo sono state testate diverse condizioni di diluizione del terreno di coltura (le diluizioni sono state preparate utilizzando brodo LB fresco), a partire dal tal quale fino ad una diluizione 1:10 (1 ml di coltura overnight: 10 ml di brodo LB fresco). La diluizione 1:10 è risultata avere un $OD_{600} = 0.066$, corrispondente a circa 5×10^7 CFU.

La valutazione statica della crescita è stata effettuata a partire dalla diluizione 1:10 ($OD_{600} = 0.066$; ca. 5×10^7 CFU). Per ciascun campione è stata preparata una piastra con 100 μ l di coltura diluita fino a 10^5 CFU, spatolando in modo uniforme le colonie su tutta la piastra. Su ciascuna piastra è stato poi posizionato il campione, avendo cura, per i campioni di Ag-PLA, di collocare la faccia con la deposizione di Ag a contatto con il terreno. È stata poi preparata una piastra per il controllo positivo, suddividendola in diverse aree per le diverse diluizioni: 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 CFU. Le diluizioni sono state siglate – nell'ordine – come segue: 0, -1, -2, -3. Le piastre sono state poi incubate per 24 h ed è stata quindi osservata la crescita delle colonie.

Le condizioni del test sono state poi ottimizzate specificatamente per il film di Ag-PLA a maggior deposizione di Ag (di interesse per il presente lavoro di tesi), con particolare riferimento al numero di CFU iniziali di E. coli e alle dimensioni delle sub-aliquote di campioni (Tabella 11).

Campioni	N° campioni	Condizioni di deposizione	Dimensioni (cm)
PLA TQ	2	-	2 x 1
Ag-PLA 01	2	5 giri 40 watt	1 x 1
Ag-PLA 01	2	5 giri 40 watt	2 x 1

Tabella 11 Ottimizzazione delle dimensioni delle sub-aliquote

A tale scopo sono state preparate 6 piastre, su 3 delle quali sono stati spatolati uniformemente 100 µl di coltura di E. coli diluita fino a 10^3 CFU e poi posizionati rispettivamente 1 campione di PLA TQ 2 x 1 cm, 1 campione di Ag-PLA 1 x 1 cm e 1 di Ag-PLA 2 x1 cm (con la faccia in cui è presente la deposizione di Ag a contatto con l'Agar LB, e quindi con le cellule di E. coli). Sulle altre tre piastre sono stati depositati 100 µl di coltura di E. coli diluita fino a 10^2 CFU e poi sono stati posizionati i film di PLA e Ag-PLA, come descritto precedentemente. Infine è stata preparata una piastra per il controllo positivo alle seguenti diluizioni: 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 CFU. Le diluizioni sono state siglate - nell'ordine – come segue: 0, -1, -2, -3, -4 e -5. Tutte le piastre sono state incubate per 24 h ed è stata quindi osservata la crescita delle colonie dopo incubazione.

Sono state poi messe a punto le condizioni per la valutazione della dinamica di crescita, basata sulla misura l'assorbanza (OD) del terreno di coltura a 600 nm mediante spettrofotometro UV-Vis, testando diverse condizioni di crescita, a partire dalla coltura di E. coli proveniente dalla diluizione 1:10. A tale scopo vengono preparate provetta contenete il terreno di coltura con il ceppo di E. coli per ciascun campione ed un controllo positivo. Viene poi effettuata l'incubazione in agitatore a 37 °C, misurando l'assorbanza delle soluzioni ad intervalli di tempo di 40 minuti.

2.5 Individuazione e caratterizzazione di nanoparticelle mediante FFF

Allo scopo di studiare nel dettaglio l'eventuale rilascio di nanoparticelle di Ag dall'Ag-PLA, è in via di messa a punto una metodologia basata su Field Flow Fractionation per l'individuazione e la caratterizzazione di nanoparticelle negli estratti ottenuti dai test di migrazione, utilizzando il sistema per la AF4 (*Asymmetric Field Flow Fractionation*) AF2000 Multiflow FFF equipaggiato con un rivelatore UV-Vis SPD-20AV (Postnova Analytics).

Utilizzando una membrana di cellulosa rigenerata da 10kD ed uno spacer da 350 µm, per la messa a punto della metodologia di separazione sono stati esaminati diversi carrier liquids:

- soluzione salina di ammonio carbonato $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 0.5 mM (K. Loeschner et al., 2012)
- soluzione tampone ammoniacale a pH10
- soluzione acquosa di idrossido di sodio NaOH a pH tra 9 e 10 (K. Loeschner et al., 2012; O. Geiss et al., 2013);

e sono stati ottimizzati i parametri operativi per la fase di separazione. In particolare sono stati considerati:

- per la fase di *focusing*:

- Injection flow: tra 0.2 e 0.5 ml/min

- Injection time: tra 2 e 5 minuti
- Focus pump: tra 0 e 1.3ml/min
- Cross flow: tra 0.4 e 1.0 ml/min
 - per la fase di *elution*:
- 2 step: lineare tra i 30 e i 45 minuti, cross flow tra 0.4 e 1 ml/min costante 10 minuti, cross flow tra 0 e 0.1 ml/min
- 3 step: costante tra 20 e 30 minuti, cross flow tra 0.7 e 1 ml/min lineare tra 5 e 35 minuti, cross flow tra 0.7 e 1 ml/min costante tra 5 e 10 minuti, cross flow 0.1 ml/min
 - Detector Flow: tra 0.2 e 1 ml/min

Per la messa a punto del metodo sono stati impiegati standard di nanoparticelle di argento in soluzione acquosa di citrato di sodio con diametro di 40, 60 e 100 nm, a concentrazione di 0.02 mg/ml (Sigma-Aldrich).

Per la rivelazione UV è stata utilizzata una lunghezza d'onda di 420 nm. Questo valore è stato scelto in quanto consente di rilevare particelle con comprese tra 40 e 100 nm, considerando che la risposta spettrale specifica di nanoparticelle di Ag sferiche varia in funzione del loro diametro da 412 nm per le NPs da 40 nm a oltre 500 nm per le NPs da 100 nm (*Md E. Hoque et al., 2012; O. Geiss et al., 2013*).

Un'ulteriore prospettiva di sviluppo è data dalla possibilità di interfacciare il sistema FFF con l'ICP-MS, così da determinare la concentrazione di Ag nelle diverse frazioni di nanoparticelle eluite attraverso l'FFF e accompagnare l'informazione sulla tipologia e dimensione delle NP con la caratterizzazione chimica.

3 RISULTATI E DISCUSSIONE

Le attività sperimentali hanno consentito in primo luogo di mettere a punto le metodologie per la caratterizzazione dei materiali a contatto con alimenti, scopo primario del presente lavoro di tesi. Tali metodologie consentono una caratterizzazione dei materiali molto ampia, in quanto riguardano:

- 1) la determinazione del contenuto totale di elementi mediante ICP-AES (con particolare riferimento al contenuto totale di Ag, Ba, Co, Cu, Fe, Li, Mn e Zn) previa dissoluzione completa in mineralizzatore a microonde ad alta pressione;
- 2) l'esecuzione di test di migrazione con diversi simulanti alimentari (Simulante A: CH₃CH₂OH 10 %_{v/v}, Simulante B: CH₃COOH 3 %_{p/v}, Simulante D2: olio di semi di girasole, H₂O);
- 3) la determinazione della migrazione globale (per via gravimetrica);
- 4) la determinazione della migrazione specifica dell'Ag mediante ICP-MS in soluzione H₂O, in CH₃COOH e in CH₃CH₂OH;
- 5) la determinazione del residuo secco nelle soluzioni di simulante dopo i test di migrazione (per via gravimetrica);
- 6) l'analisi termica dei materiali mediante TGA e DSC;
- 7) l'individuazione e la caratterizzazione di nanoparticelle eventualmente rilasciate nelle soluzioni di simulanti in seguito ai test di migrazione;

8) la valutazione dell'attività antimicrobica mediante test statico e test dinamico.

Le suddette metodologie sono state applicate per la caratterizzazione di provini di acido polilattico funzionalizzati con un rivestimento di Ag (Ag-PLA) per valutare le possibilità di sviluppo di un materiale per il packaging alimentare basato su una termoplastica biodegradabile ad attività antimicrobica. Per confronto, sono stati esaminati anche il film di PLA tal quale (PLA TQ) ed i pellets di PLA utilizzati come materiale di partenza per la realizzazione dei film.

In Tabella 12 si riporta il contenuto totale di Ag nei campioni di pellet, PLA TQ e Ag-PLA determinati mediante ICP-AES. La determinazione del contenuto totale di Ag ha consentito di meglio caratterizzare la deposizione del rivestimento di Ag per la funzionalizzazione del packaging. A partire dal contenuto totale medio di Ag nel film di Ag-PLA, tenendo conto che il raggio atomico dell'Ag è di 160 pm ed ipotizzando una forma sferica per gli atomi di Ag, è possibile calcolare che lo strato di Ag depositato sul film di PLA ha uno spessore pari a qualche decina di atomi di Ag.

Campione	Ag (mg/cm ²)
PLA Ag 1 parte esterna	1,84
PLA Ag 3 parte esterna	0,68*
PLA Ag 4 parte esterna	0,64*
PLA Ag 5 parte esterna	1,70
PLA Ag 6 parte esterna	0,67*
PLA Ag 7 parte esterna	0,72*
PLA Ag 8 parte esterna	1,56
PLA Ag 9 parte esterna	1,85
PLA Ag 10 parte esterna	3,49
PLA Ag 11 parte esterna	4,19
PLA Ag 12 parte esterna	1,28
PLA Ag 13 parte esterna	3,43
PLA Ag 14 parte esterna	1,88
PLA Ag 15 parte esterna	1,17
PLA Ag 19 parte esterna	2,37
PLA Ag 21 parte esterna	1,95
Ag-PLA - MEDIA parte esterna*	2,23
numero di campioni	12 (16*)
SD	0,96
RSD (%)	43,0
PLA Ag 19 parte esterna	2,37
PLA Ag 19 parte interna	1,29
PLA Ag 19 parte interna	1,23
PLA Ag 21 parte esterna	1,95
PLA Ag 21 parte interna	2,25
PLA Ag 21 parte interna	0,85
Ag-PLA - MEDIA parte interna	1,40
numero di campioni	4
SD	0,60
RSD (%)	42,5
Ag-PLA - MEDIA COMPLESSIVA	1,81
numero di campioni	16 (20*)
SD	0,58
RSD (%)	32,1
PLA TQ (media)	< 0,001
PELLETS (media)	< 0,001

Tabella 12 Contenuto totale di Ag (mg/cm²) in Ag-PLA, PLA TQ e Pellets di PLA

*- i valori contrassegnati con l'asterisco non sono stati considerati per il calcolo della media

In tabella 13 si riporta il contenuto totale di Ba, Co, Cu, Fe, Li, Mn e Zn in pellets, PLA TQ e Ag-PLA, che è stato determinato con il fine di effettuare una valutazione preliminare dell'eventuale presenza nel materiale di altri elementi potenzialmente migranti, selezionando gli elementi per i quali la normativa prevede un Limite di Migrazione Specifica (Regolamento (CE) 10/2011 (allegato 2). Considerando che in tutti i casi è stato riscontrato un contenuto totale < DL o comunque, laddove rivelabile (Fe, Zn), estremamente basso, non si è ritenuto necessario effettuare le successive analisi mediante ICP-MS per la determinazione degli stessi elementi nelle soluzioni di simulanti dopo i test di migrazione per la valutazione della migrazione specifica. Infatti in nessun caso, anche ammettendo nella peggiore delle ipotesi che l'intera quantità di elemento migrasse nei simulanti, si sarebbero superati i rispettivi limiti di migrazione specifica.

	Ba	Co	Cu	Fe	Li	Mn	Zn
Ag-PLA	< 0.003	< 0.003	< 0.01	0.06	< 0.003	< 0.001	0.03
PLA TQ	<0.003	< 0.003	< 0.01	0.05	< 0.003	< 0.001	0.01
Pellets	< 0.003	< 0.003	< 0.01	< 0.006	< 0.003	< 0.001	< 0.003

Tabella 13 Contenuto totale di Ba, Co, Cu, Fe, Li, Mn e Zn in Ag-PLA, PLA TQ e Pellets di PLA (mg/cm² – valori medi)

Nelle Tabelle 14, 15, 16, 17 e 18 sono riportati i risultati delle misure gravimetriche per la valutazione della migrazione globale (*Overall Migration* – OM). Il Regolamento (CE) 10/2011 (artt. 11 e 12) stabilisce i limiti di migrazione globale, secondo i quali, i materiali e gli oggetti di materia plastica non devono cedere i loro costituenti ai simulanti alimentari in quantità superiori a 10 mg di costituenti totali ceduti per dm² di superficie a contatto con i prodotti alimentari (mg/dm²). Siccome ogni campione messo a contatto con i simulanti alimentari era di dimensione 3 x 3 cm, ossia 0.09 dm² il limite di migrazione globale (OM) calcolato è di 0.9 mg per campione. Per essere considerati idonei al contatto con gli alimenti, i campioni dopo esposizione ai simulanti alimentari non devono avere una riduzione di peso maggiore o uguale a 0.0009 g.

Solamente in un caso, per un campione di PLA TQ (PLA TQ 4) trattato CH₃CH₂OH 10 %_{v/v} (Simulante A) a T = 40 °C, si è riscontrata una diminuzione di peso significativa senza comunque superare il limite di migrazione globale (Tabella 23). Il test è stato ripetuto una seconda volta per verifica; in questa prova, effettuata in duplicato, non si è riscontrata la diminuzione di peso (Tabella 25).

La maggior parte dei campioni testati alle diverse temperature (20 °C, 40 °C e 70 °C) e con i diversi simulanti alimentari (CH₃CH₂OH 10 %_{v/v}, acido acetico e H₂O) non hanno mostrato una significativa variazione di peso dopo i test di migrazione.

In Tabella 26 è riportata la variazione di peso dei campioni in seguito ai test di migrazione con olio di semi di girasole (simulante D). L'aumento di peso di questi campioni è dipendente dalla quantità di olio che viene adsorbita dal materiale stesso. A tale scopo sono in corso ulteriori prove finalizzate a valutare la quantità di olio adsorbito sul film di PLA tramite estrazione dell'olio adsorbito con pentano, dalle quali sarà poi possibile risalire al valore della migrazione globale nell'olio stesso.

Temperatura	40 °C
Simulante	CH ₃ CH ₂ OH 10 % _{v/v}
ID campione	PLA TQ
	13A 13B
Peso campione prima della prova (g)	0.07323 0.06978
Peso del campione dopo 10 giorni (g)	0.07343 0.06700
Differenza di peso (g)	+ 0.00020 + 0.00022

Tabella 17 Misure gravimetriche per la determinazione della migrazione globale a 40°C:
PLA TQ testato con CH₃CH₂OH 10 %_{v/v}

Simulante	Olio di semi di girasole					
Temperatura	20 °C			40 °C		
ID campione	Ag-PLA	PLA TQ	Ag-PLA	PLATQ	Ag-PLA	PLA TQ
	14B 15B	9	8B 9B	6	3A 3B	3
Peso campione prima del test (g)	0.06595	0.07063	0.06799	0.06902	0.07904	0.07788
Peso del campione dopo 2 h (g)	0.07864	0.08335	0.07098	0.07545	0.11884	0.11514
Differenza di peso (g)	+ 0.01269	+ 0.01272	+ 0.00299	+ 0.00373	+ 0.00643	+ 0.03726
						+ 0.01241

Tabella 18 Misure gravimetriche per la determinazione della migrazione globale in olio di semi di girasole (simulante D2) a 20, 40 e 70°C

Nelle Tabelle 19 e 20 si riportano, rispettivamente per i test in CH_3COOH 3 %_{p/v} (Simulante B) ed in $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 10 %_{v/v} (Simulante A), i contenuti di Ag determinati mediante ICP-MS nelle soluzioni di simulanti dopo i test di migrazione effettuati sui provini di Ag-PLA e sul PLA TQ per confronto, ai fini della determinazione della migrazione specifica dell'Ag. Per quanto riguarda CH_3COOH 3 %_{p/v} sono state analizzate tutte le soluzioni a disposizione, riferite ai test di migrazione a 20 °C, 40 °C e 70 °C, mentre per $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 10 %_{v/v} sono state per il momento analizzate soltanto le soluzioni ottenute nelle condizioni di esposizione più drastiche: a T = 70 °C, per tutti i time-point (t = 5', 30', 1 h, 2 h); a T = 20 °C e 40 °C per il tempo di esposizione più lungo, pari a 10 gg.

In Figura 9 si riporta la quantità (mg) di Ag nelle soluzioni di CH_3COOH 3 %_{p/v} (Simulante B) ai diversi time-point compresi tra 5 minuti e 3 giorni, confrontando gli andamenti alle diverse temperature (20 °C, 40 °C e 70 °C). Si può osservare come sia a 40 °C che a 70 °C vengano estratte notevoli quantità di Ag, paragonabili al contenuto totale di Ag nel campione di Ag-PLA. L'Ag-PLA risulta quindi NON idoneo per un utilizzo nel packaging di alimenti acidi (alimenti con pH < 4.5) e per un utilizzo a caldo.

In Figura 10 è mostrato l'effetto cumulativo dei diversi time-point nell'estrazione di Ag con CH_3COOH 3 %_{p/v} dai campioni di Ag-PLA alle diverse temperature; le aree a diverso colore corrispondono ai diversi time-point. Si sottolinea come i time-point a 5', 30', 1 h e 2 h (aree dell'istogramma riportate con colore pieno) siano comuni a tutte e tre le temperature, mentre i time-point a 3 h, 6 h, 12 h e 3 gg (aree dell'istogramma riportate con riempimento tratteggiato) vengono considerati solo a 20 °C e 40 °C.

In Figura 11 è mostrato l'effetto cumulativo dei diversi time-point nell'estrazione di Ag con $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 10 %_{v/v} dai campioni di Ag-PLA a 70 °C; le aree a diverso colore corrispondono ai diversi time-point.

Infine in Figura 12 viene riportato un confronto, in forma di istogramma, tra la quantità (mg) di Ag estratta a T = 20 °C e 40 °C con $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 10 %_{v/v} (Simulante A) e CH_3COOH 3 %_{p/v} (Simulante B) dopo 10 giorni. Si evidenzia come, in particolare a T = 40 °C, si conferma l'effetto del simulante nell'efficacia di estrazione e quindi la non idoneità del materiale per un utilizzo a contatto con alimenti acidi.

T (°C)	t	ID campione	ppb in soluzione (V = 22.5 ml)	µg	µg tot estratti al tempo t
20 °C	5'	Ag-PLA-12A	2,68	0,06	0,06
	30'		24,2	0,54	0,60
	1h		13,2	0,30	0,90
	2h		14,9	0,34	1,24
	3h		18,9	0,42	1,66
	6h		15,8	0,36	2,02
	12h		54,4	1,22	3,24
	3gg		12,9	0,29	3,53
	10gg	Ag-PLA-12B	5,29	0,12	0,12
20 °C	5'	Ag-PLA-13A	2,42	0,05	0,05
	30'		26,7	0,60	0,65
	1h		20,4	0,46	1,11
	2h		25,6	0,57	1,69
	3h		31,7	0,71	2,40
	6h		27,8	0,63	3,03
	12h				
	3gg				
	10gg	Ag-PLA-13B	4,98	0,11	0,11
40 °C	5'	Ag-PLA-7A	128	0,13	0,13
	30'		60,4	1,36	1,49
	1h		55,0	1,24	2,72
	2h		57,5	1,29	4,02
	3h		52,4	1,18	5,19
	6h		49,4	1,11	6,31
	12h		170	3,83	10,1
	3gg		230	5,18	15,3
	10gg	Ag-PLA-7B	9,15	0,21	0,21
40 °C	30'	Ag-PLA-6A	58,3	1,31	1,44
	1h		48,9	1,10	2,54
	2h		32,5	0,73	3,27
	3h				
	6h		35,1	0,79	4,06
	12h				
	3gg				
	10gg	Ag-PLA-6B	12,3	0,28	0,28
70 °C	5'	Ag-PLA-17A	131	2,94	2,94
	30'		180	4,06	7,00
	1 h		181	4,06	11,1
	2 h		228	5,14	16,2

Tabella 19 Migrazione specifica dell'Ag in CH₃COOH 3 %_{p/v}

T (°C)	t	ID campione	ppb in soluzione (V = 22.5 ml)	µg	µg tot estratti al tempo t
70 °C	5'	Ag-PLA-16A	3.30	0.07	0.07
	30'		5.15	0.12	0.19
	1 h		3.42	0.08	0.27
	2 h		4.54	0.10	0.37
20 °C	10 gg	Ag-PLA-4B	5.55	0.12	0.12
40 °C	10 gg	Ag-PLA-10B	6.95	0.16	0.16

Tabella 20 Migrazione specifica dell'Ag in CH₃CH₂OH 10 %_{v/v}

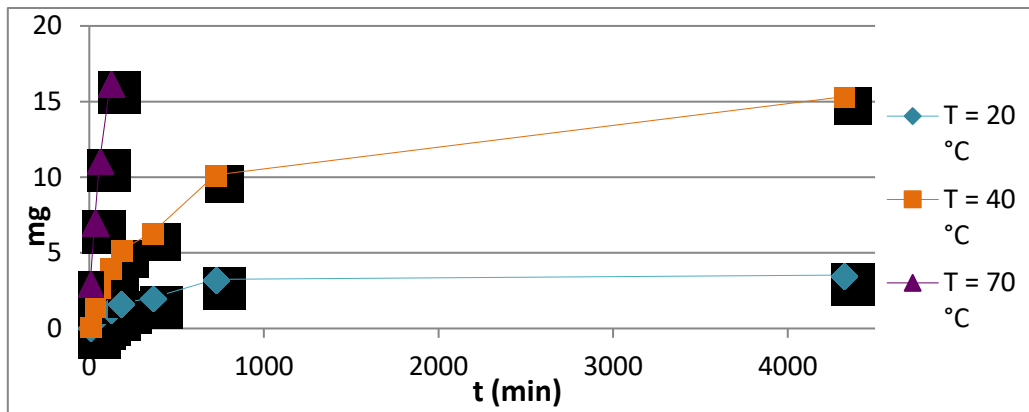


Figura 9 Ag estratto con CH_3COOH 3 %_{p/v} (Simulante B) a T = 20, 40 e 70 °C a diversi time-point (t = 5', 30', 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 12 h, 3 gg)

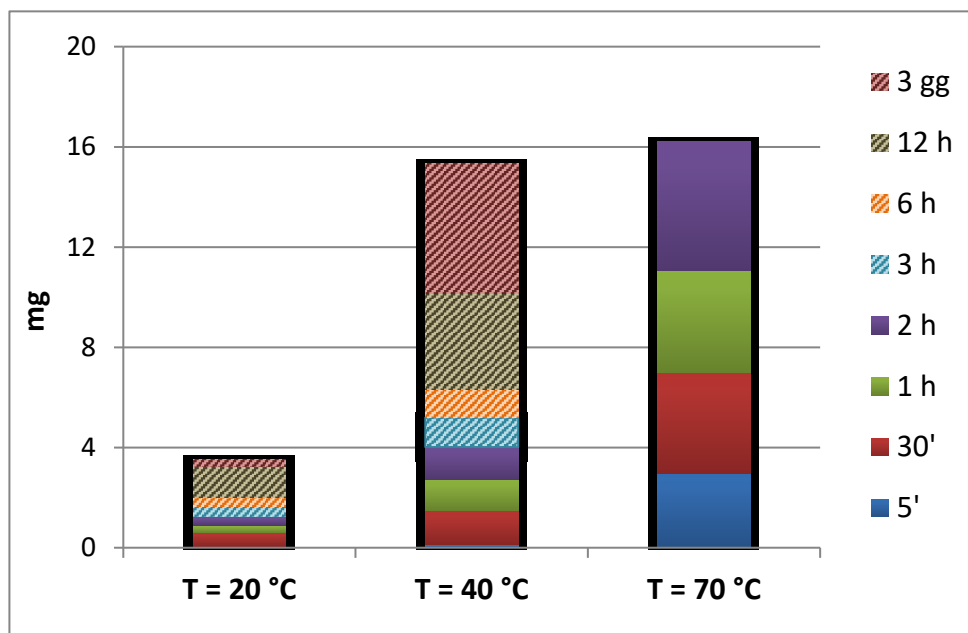


Figura 10 Ag estratto con CH_3COOH 3 %_{p/v} (Simulante B) a T = 20, 40 e 70 °C a diversi time-point (t = 5', 30', 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 12 h, 3 gg)

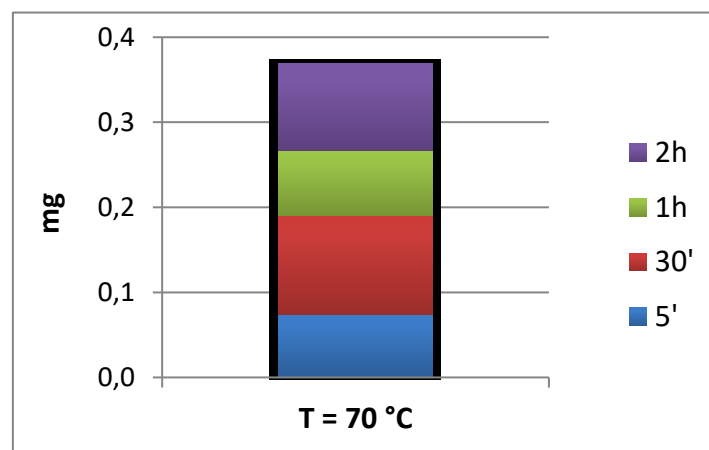


Figura 11 Ag estratto con $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 10 %_{v/v} (Simulante A) a T = 70 °C ai diversi time-point (t = 5', 30', 1 h, 2 h)

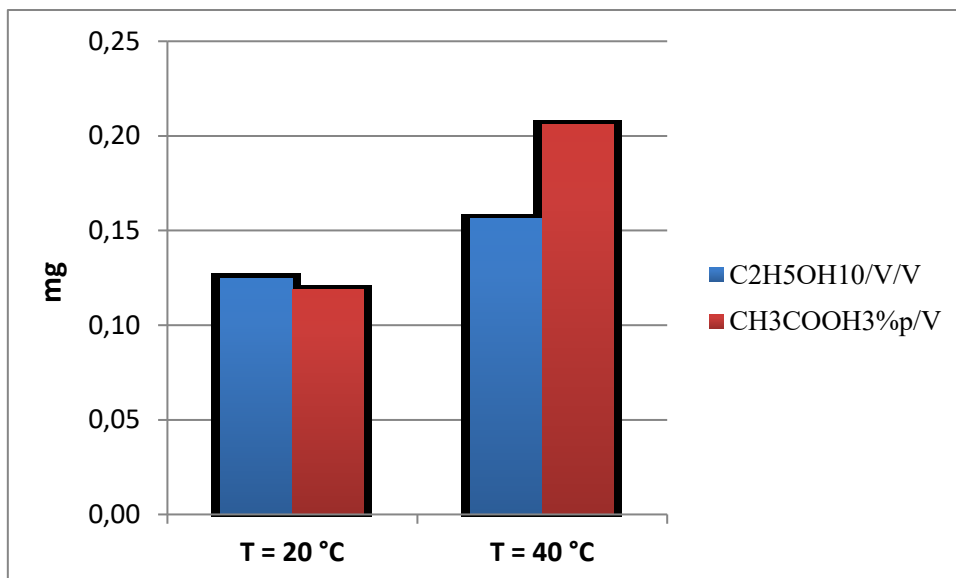


Figura 12 Ag estratto con $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 10 %_{v/v} (Simulante A) e CH_3COOH 3 %_{p/v} (Simulante B) a $T = 20\text{ °C}$ e 40 °C , a 10 giorni

In Figura 13 si riporta la quantità (mg) di Ag nelle soluzioni di $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 10 %_{v/v} (Simulante A) ottenute dal test di migrazione a $T = 70\text{ °C}$ ai diversi time-point (5', 30', 1 h, 2 h), insieme – per confronto – a quella determinata nelle soluzioni di CH_3COOH 3 %_{p/v} alle stesse condizioni. L'effetto del simulante appare molto evidente e nel caso del $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 10 %_{v/v} la capacità di estrazione è notevolmente ridotta.

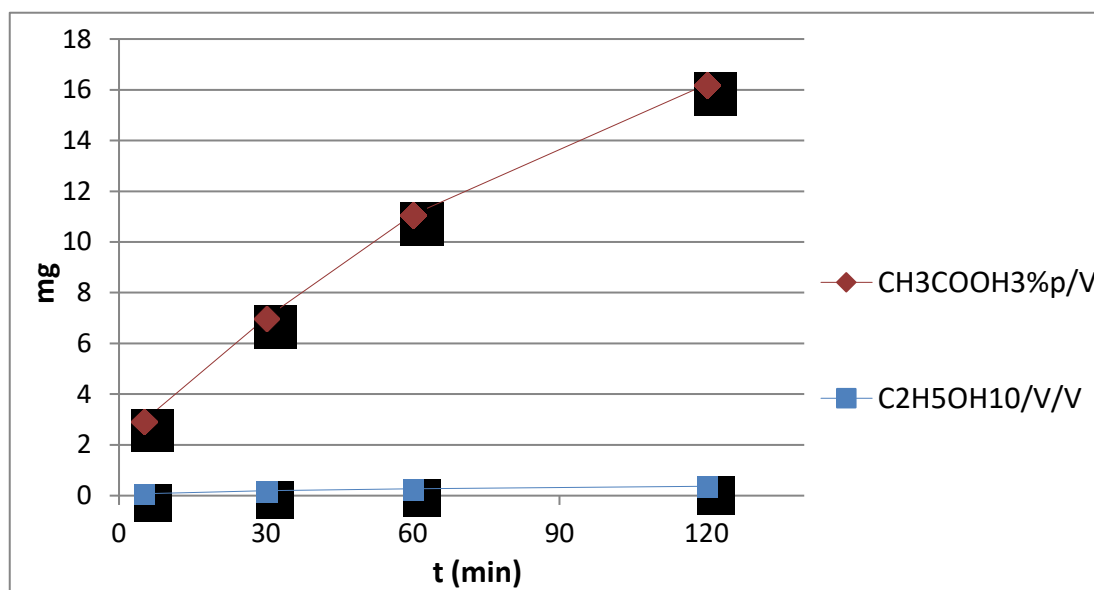


Figura 13 Ag estratto con $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 10 %_{v/v} (Simulante A) e CH_3COOH 3 %_{p/v} (Simulante B) a $T = 70\text{ °C}$ ai diversi time-point ($t = 5', 30', 1\text{ h}, 2\text{ h}$)

I risultati delle analisi ICP-MS per la determinazione della migrazione specifica dell'Ag nei diversi simulanti, confermano quanto è risultato visibile anche ad occhio nudo, all'osservazione dei provini di Ag-PLA prima e dopo i test stessi (Figure 14, 15 e 16). Infatti si è riscontrata per tutte le condizioni di trattamento con CH_3COOH 3 %_{p/v} (Simulante B) una decolorazione netta dei campioni, arrivando fino quasi alla trasparenza nel caso dei 40 °C e 70 °C , mentre con $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 10 %_{v/v} (Simulante A) la decolorazione è stata molto

minore. Anche nei provini trattati con olio di semi di girasole (Simulante D2), si è osservata un'importante decolorazione e questo lascia intuire una migrazione rilevante dell'Ag. Per confermare tale ipotesi, sarà necessario sviluppare una metodologia ICP-MS dedicata, con una particolare procedura di pretrattamento del campione e/o sistema di introduzione del campione dedicato.

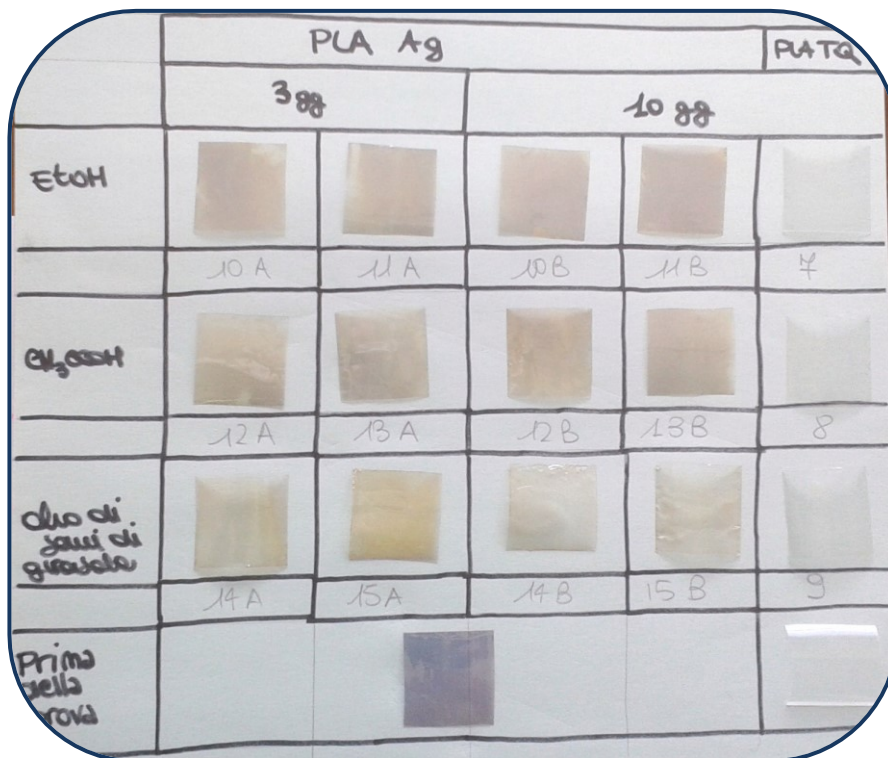


Figura 14 Campioni dopo test di migrazione a 20 °C

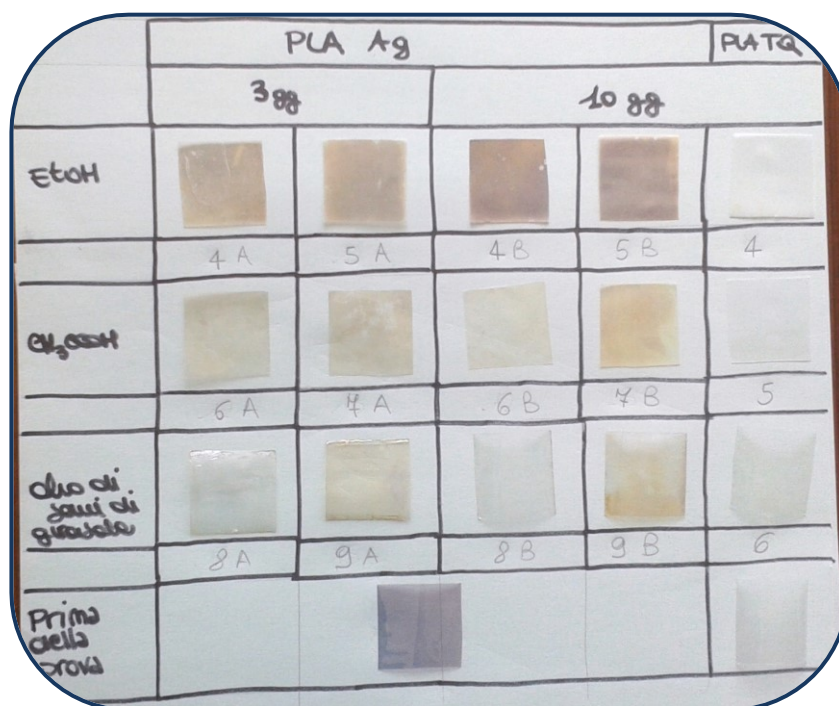


Figura 15 Campioni dopo test di migrazione a 40 °C

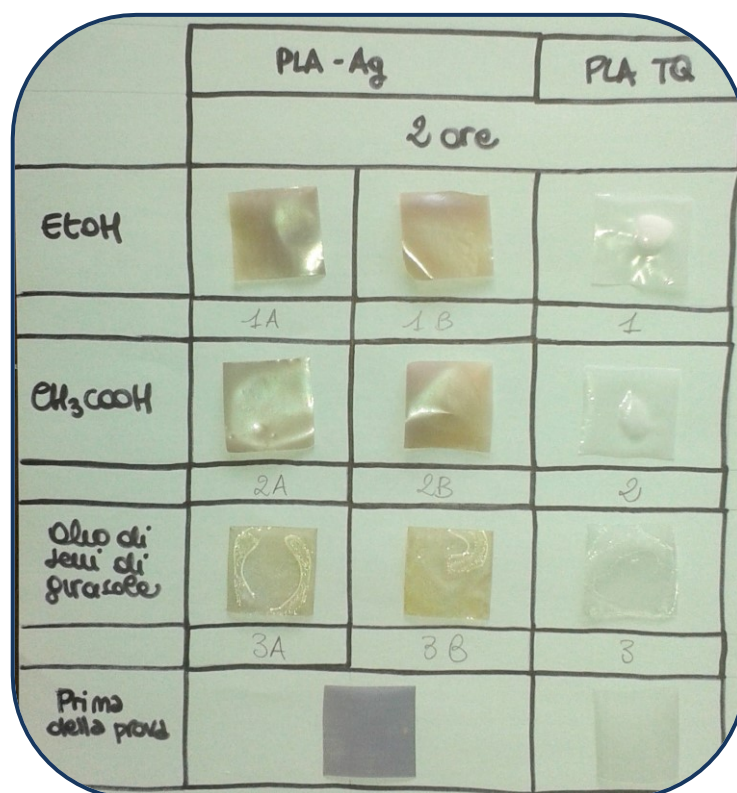


Figura 16 Campioni dopo test di migrazione a 70 °C

A partire dai risultati ottenuti per la migrazione specifica dell'Ag, è stato effettuato un calcolo orientativo per valutare le quantità di Ag potenzialmente rilasciate da un contenitore del volume di 1 L (1 dm³) realizzato con l'Ag-PLA esaminato, che sono state poi confrontate con i valori limite stabiliti dalla normativa vigente (soglia di contaminazione per le acque superficiali = 10 µg/L*), le raccomandazioni OMS (nell'acqua potabile, concentrazioni di 0.1 mg/L sono considerate tollerabili senza rischio per la salute - Testo Unico Ambientale D.Lgs. 152/2006 s.m.i) ed il valore limite per gli alimenti stabilito da EFSA (0.05 mg/kg***). Considerando la migrazione in CH₃COOH 3 %_{p/v} (Simulante B), si ottiene un potenziale rilascio di Ag pari a circa 20 µg/L a T = 40 °C a 10 gg e pari a circa 200 µg/L a T = 70 °C a 5', riconfermando ancora una volta le problematiche già evidenziate connesse con l'impiego dell'Ag-PLA nel packaging per alimenti acidi, soprattutto a caldo. Per quanto riguarda invece la migrazione in CH₃CH₂OH 10 %_{v/v} (Simulante A), si ottiene un potenziale rilascio di Ag pari a circa 10 µg/L a T = 40 °C a 10 gg e pari a circa 5 µg/L a T = 70 °C a 5', ben al di sotto di tutti i valori limite considerati per il confronto. In ogni caso questa valutazione tiene conto esclusivamente del contenuto di Ag rilasciato dal film di Ag-PLA, senza alcun riferimento all'eventuale rilascio in forma di nanoparticelle e quindi ai fini di una più ampia e più esaustiva valutazione per la sicurezza alimentare sarebbe necessario esaminare anche questi ulteriori aspetti.

Per quanto riguarda la determinazione del residuo secco nelle soluzioni di simulante dopo i test di migrazione, in nessun caso è stato riscontrato un aumento di peso rilevabile.

I campioni di PLA TQ e Ag-PLA prima e dopo i test di migrazione nelle diverse condizioni sono stati sottoposti ad analisi termiche. In particolare, al fine di indagare la percentuale di acqua presente nel campione, sono stati

sottoposti ad analisi termogravimetrica (TGA) il PLA TQ nuovo (non sottoposto a test di migrazione) ed il PLA TQ sottoposti al test di migrazione a 40 °C per 10 giorni nel Simulante A ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 10%_{v/v}). In Figura 17 Sono riportate le curve peso/temperatura ottenute. Nel grafico sono mostrate due curve termogravimetriche che mostrano la variazione della massa in funzione della temperatura dei due campioni analizzati: PLA TQ nuovo (curva verde) e PLA TQ trattato con $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 10%_{v/v} (curva rossa).

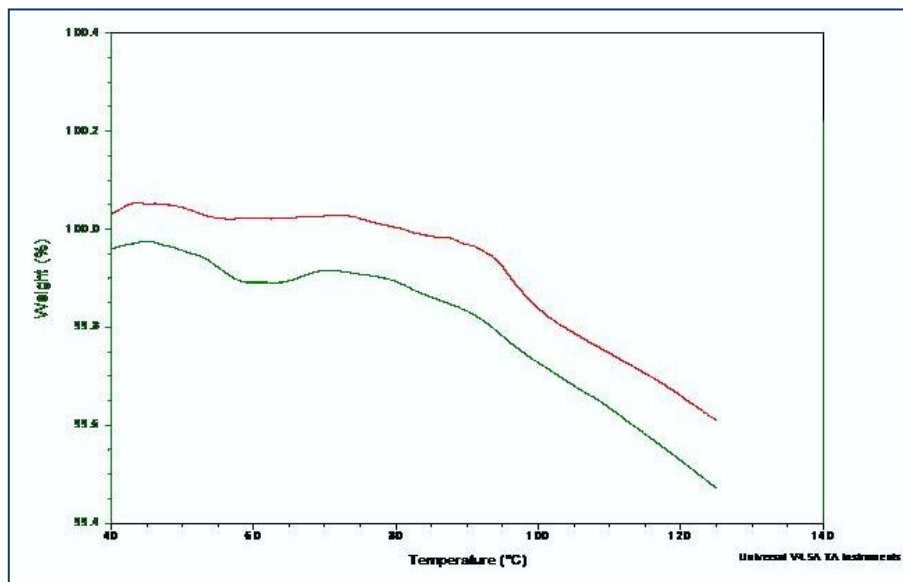


Figura 17 Analisi termogravimetrica di PLA TQ nuovo (curva verde) e PLA TQ trattato con $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 10%_{v/v} (curva rossa)

La percentuale (%) del contenuto di acqua in entrambi i campioni è risultata inferiore al limite di rilevabilità (< 0.1%). Il peso si mantiene pressoché costante all'aumentare della temperatura fino a temperature < 100 °C, dopo i 100 °C il materiale comincia a degradarsi; tutti e due i campioni mostrano lo stesso andamento.

L'analisi mediante calorimetria differenziale a scansione (DSC) ha consentito di ottenere dei termogrammi che consentono di valutare le variazioni della struttura del PLA all'aumentare della temperatura. In Figura 18 sono messi a confronto i grafici ottenuti dall'analisi del PLA TQ (PLA_1, in rosso) e del Ag-PLA (PLA_6, in verde) non sottoposti a test. Si può notare che non c'è differenza tra l'andamento delle due curve. Il picco rappresenta la temperatura di transizione vetrosa (T_g) del polimero, che risulta in entrambi i casi compresa tra 65 e 70 °C. Più alto è il picco (maggiore flusso di calore) e maggiore è lo stress subito dal polimero stesso; considerando che il picco è presente in entrambe le curve, esso è sicuramente dovuto all'estrusione e non alle condizioni di deposizione.

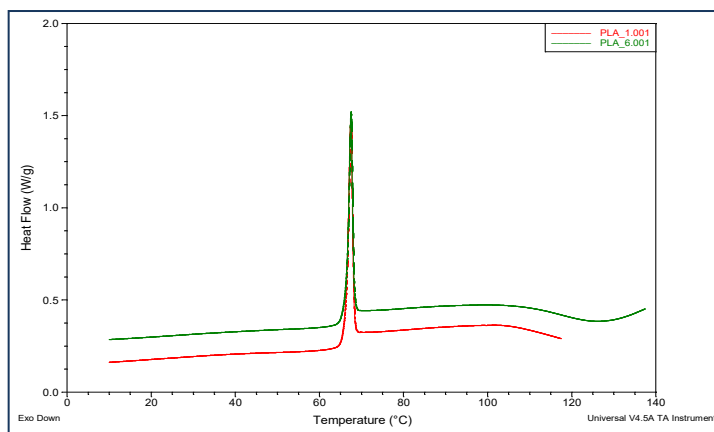


Figura 18 Analisi DSC di PLA TQ (curva rossa) e Ag-PLA (curva rossa) non sottoposti a test

È stato successivamente indagato l'effetto su PLA TQ e Ag-PLA dell'esposizione ai differenti simulanti alimentari per 10 giorni a 40 °C studiando le differenze tra i termogrammi ottenuti tramite analisi DSC dei campioni di PLA TQ e Ag-PLA esposti a CH₃CH₂OH 10%_{v/v} (Simulante B) e acqua ultrapura. I termogrammi di entrambi i campioni (PLA TQ e Ag-PLA) trattati sia con CH₃CH₂OH 10 %_{v/v} che con acqua ultrapura mostrano il medesimo andamento, stessa T_g e stessa temperatura di cristallizzazione (Figura 19).

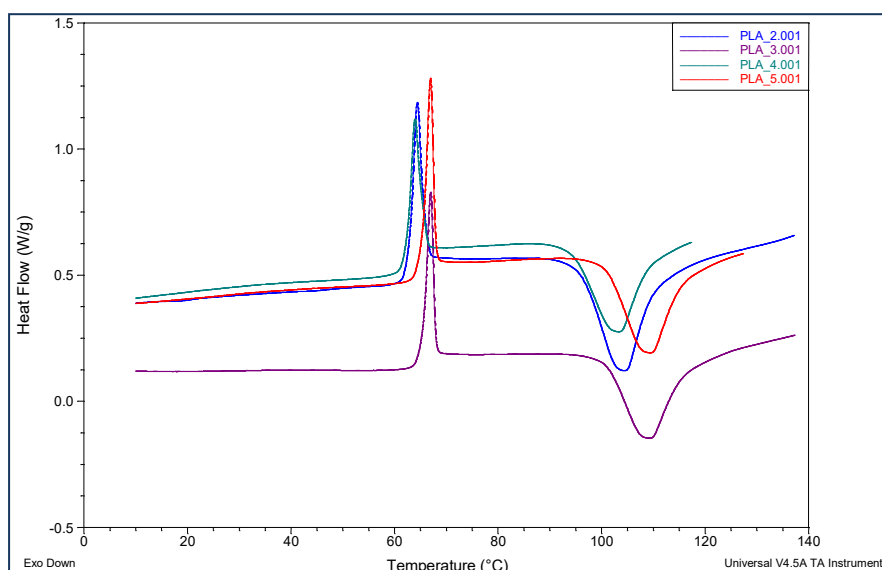


Figura 19 Confronto tra PLA TQ e Ag-PLA sottoposti ai test di migrazione con CH₃CH₂OH 10%_{v/v} (rispettivamente PLA_4 e PLA_2) e PLA TQ e Ag-PLA sottoposti ai test di migrazione con acqua ultrapura (rispettivamente PLA_5 e PLA_3)

Inoltre, per valutare gli effetti di tempo/temperatura, è stato sottoposto ad analisi DSC un campione di Ag-PLA testato a 70 °C per 2 ore con CH₃CH₂OH 10%_{v/v}. Il termogramma risultante (Figura 20) mostra la medesima T_g rispetto al campione trattato a 40 °C, ma l'altezza del picco è in questo caso molto ridotta. Inoltre dopo la T_g non avviene nessun altro riarrangiamento del materiale, come invece accadeva nel caso del campione trattato a 40 °C.

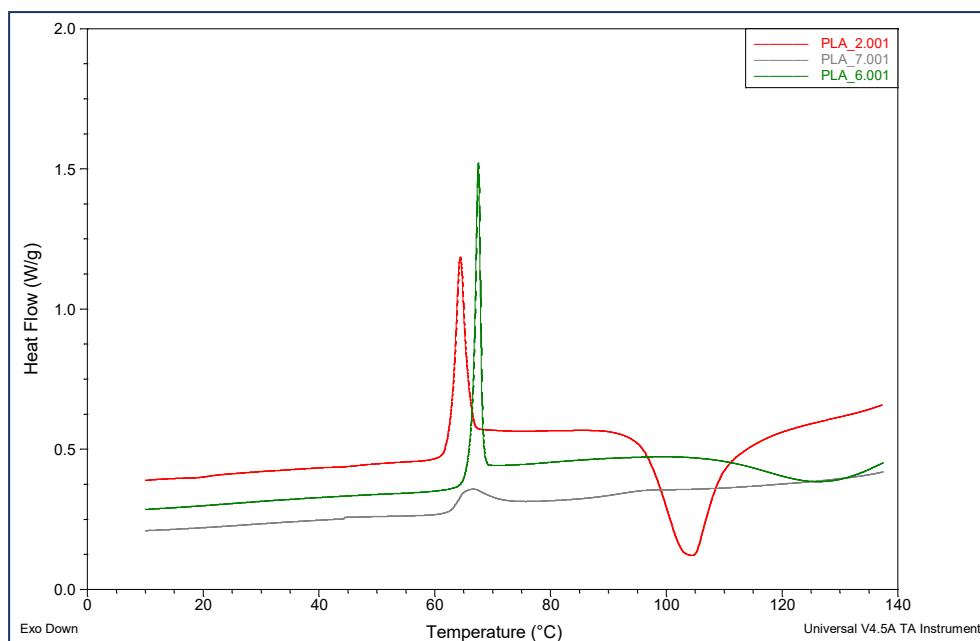


Figura 20 Confronto tra Ag-PLA nuovo (PLA_6), Ag-PLA sottoposto a test di migrazione con $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 10%_{v/v} a 40 °C (PLA_2) e Ag-PLA sottoposto al test di migrazione con $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 10%_{v/v} a 70 °C (PLA_7)

Da questi test è emerso che la T_g varia in funzione del simulante a cui è stato esposto il campione; l'altezza del picco della T_g (il flusso di calore) è invece dipendente dalla temperatura alla quale è avvenuto il trattamento (tende a diminuire all'aumentare della temperatura).

La reazione di cristallizzazione (per campioni sottoposti a test di migrazione alla stessa temperatura, ad es. 40 °C) avviene ad una temperatura compresa tra i 100 e i 110 °C, che dipende dal tipo di simulante a cui è stato esposto il campione. La presenza del secondo picco (reazione di cristallizzazione) è invece dipendente dalla temperatura ed all'aumentare della temperatura (campione sottoposto al test di migrazione a 70 °C) non si ha nessun altro riarrangiamento del materiale dopo la T_g .

Nel complesso, i risultati ottenuti dalle analisi termiche evidenziano come l'Ag-PLA risulti un materiale non idoneo per utilizzo ad alte temperature, come peraltro già evidenziato dalle prove per la valutazione della migrazione specifica dell'Ag.

Per quanto riguarda le prove microbiologiche, i risultati provenienti dalla valutazione statica della crescita di *E. coli* mostrano una zona di inibizione della crescita in corrispondenza del film di Ag-PLA. Nella prima prova effettuata, in cui sono state inoculate 10^5 CFU, è stata riscontrata una maggiore inibizione (solamente nella parte sottostante il film di PLA) nella piastra in cui era presente il campione di Ag-PLA 01 (il PLA con maggior contenuto di Ag). Ciò risulta evidente dal confronto con la piastra con il PLA TQ dove non c'è stata inibizione (Figura 21).



Figura 21 Confronto tra piastra con PLA TQ (sinistra) e Ag-PLA01 (destra)

La prova è stata ripetuta una seconda volta ottimizzando le condizioni (CFU piastrate e dimensioni del fil di PLA) in base alla concentrazione di Ag determinata nei campioni di Ag-PLA01. In particolare è stata valutata la crescita in piastra di *E. coli* con inoculo di 10^3 e 10^2 CFU in presenza di campioni di 1x1 cm e 2x1 cm. In questa prova è risultata più evidente la zona di inibizione di crescita di *E. coli* nelle piastre contenenti il film di Ag-PLA01 di 2x1 cm; la zona di inibizione non riguarda solamente la porzione di terreno sottostante il film ma anche le zone limitrofe (Figura 23).

In Figura 22 si riportano infine le piastre utilizzate per il controllo positivo in entrambe le prove.

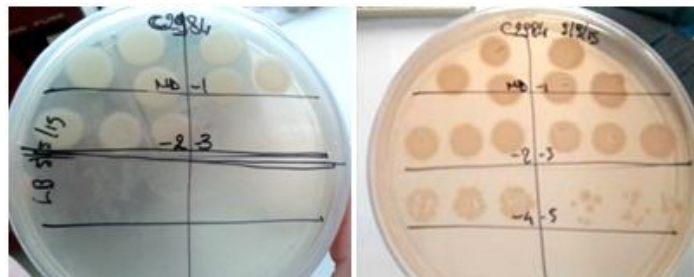


Figura 22 Piastre per il controllo positivo: prima prova (sinistra), seconda prova (destra)

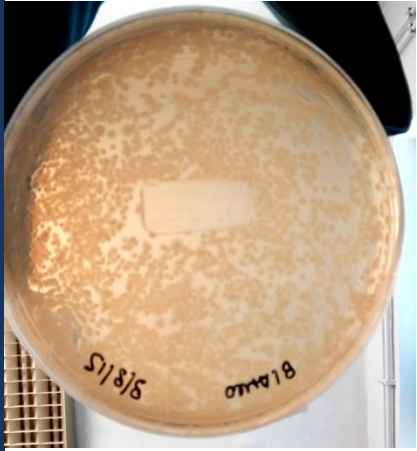
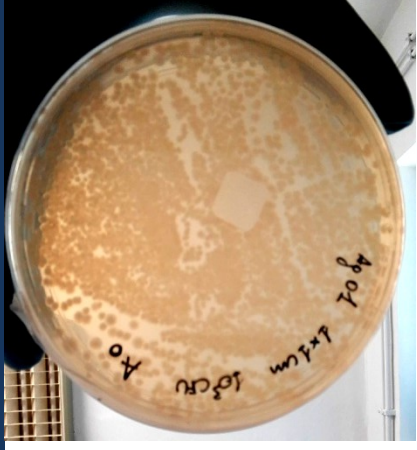
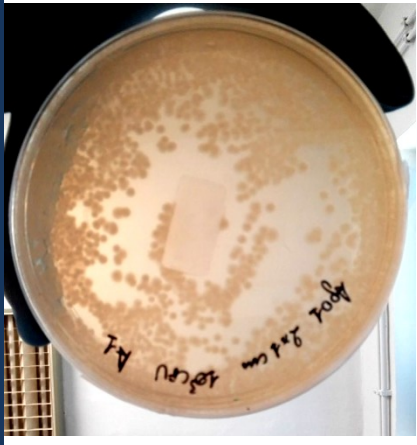
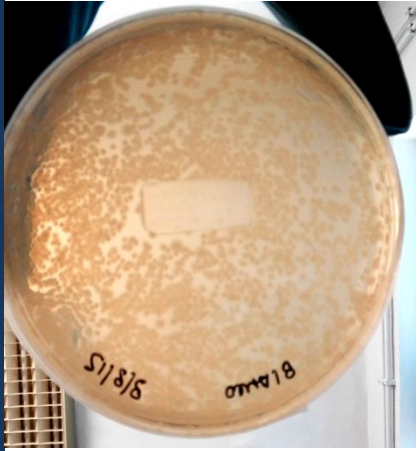

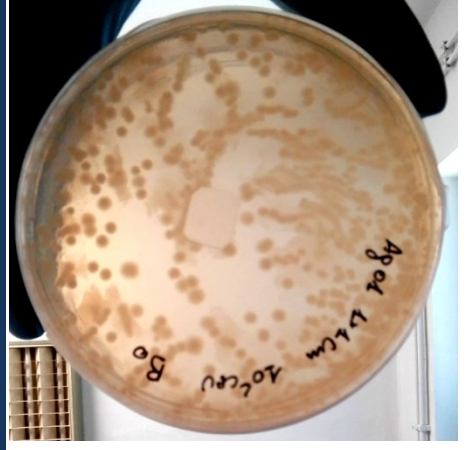
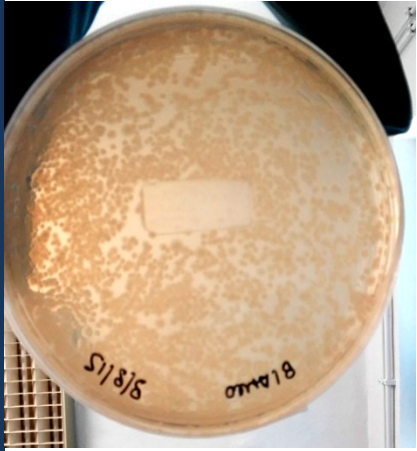

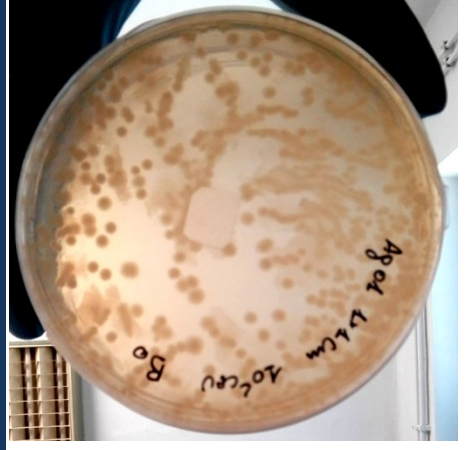
	<p data-bbox="272 1496 309 1704">PLA TQ 2x1 cm</p> 	<p data-bbox="272 1003 309 1243">Ag-PLA01 1x1 cm</p> 	<p data-bbox="272 517 309 757">Ag-PLA01 2x1 cm</p> 
<p data-bbox="523 1780 555 1921">10³ CFU/ml</p>			
<p data-bbox="981 1780 1013 1921">10² CFU/ml</p>			

Figura 23 Valutazione statica della crescita di *E. coli*

4 CONCLUSIONI

Le attività svolte hanno consentito la messa a punto di numerose metodologie per una caratterizzazione dei materiali a contatto con alimenti estremamente ampia, dal contenuto totale di elementi, alla migrazione globale e specifica, alle caratteristiche termiche, fino ai test microbiologici ed al potenziale rilascio di nanoparticelle. In particolare sono state messe a punto le metodologie basate su ICP-AES per la determinazione del contenuto totale di elementi (Ag, Ba, Co, Cu, Fe, Li, Mn e Zn), le procedure per i test di migrazione con diversi simulanti alimentari a diverse temperature, la determinazione del contenuto di Ag nelle soluzioni di simulanti mediante ICP-MS per la valutazione della migrazione specifica, le metodologie per l'analisi termica dei materiali mediante TGA e DSC, le procedure per la valutazione dell'attività antimicrobica in statico e dinamico e sono state condotte le prove per la messa a punto di una metodologia basata su *Flow Field Fractionation* (FFF) per l'individuazione e la caratterizzazione di nanoparticelle di Ag eventualmente rilasciate durante i test di migrazione.

Le suddette metodologie sono state applicate per la caratterizzazione di provini di acido polilattico funzionalizzati con un rivestimento di Ag (Ag-PLA) per valutare le possibilità di sviluppo di un materiale per il packaging alimentare basato su una termoplastica biodegradabile ad attività antimicrobica. Per confronto, sono stati esaminati anche il film di PLA tal quale (PLA TQ) ed i pellets di PLA utilizzati come materiale di partenza per la realizzazione dei film.

Il film di Ag-PLA è risultato avere uno strato di Ag depositato di uno spessore pari a qualche decina di atomi di Ag. Per quanto riguarda il contenuto totale di Ba, Co, Cu, Fe, Li, Mn e Zn in pellets, PLA TQ e Ag-PLA, determinato con il fine di effettuare una valutazione preliminare dell'eventuale presenza nel materiale di altri elementi potenzialmente migranti (Regolamento (CE) 10/2011 - allegato 2), in tutti i casi è stato riscontrato un contenuto totale < DL o comunque, laddove rivelabile (Fe, Zn), estremamente basso. Pertanto in nessun caso, anche ammettendo nella peggiore delle ipotesi che l'intera quantità di elemento migrasse nei simulanti, si sarebbero superati i rispettivi limiti di migrazione specifica.

Le prove effettuate sui campioni di Ag-PLA ed i confronti con il PLA TQ ed i pellets di partenza per la realizzazione dei film di PLA hanno evidenziato che, nonostante non si rilevi una migrazione globale in nessuna delle condizioni testate (diversi simulanti, diverse temperature e diversi tempi di contatto), si presenta invece una migrazione specifica dell'Ag dal film di Ag-PLA in diverse condizioni. In particolare, risulta molto importante la migrazione specifica dell'Ag in CH_3COOH 3 %_{p/v}, con un effetto accentuato dalle alte temperature (test di migrazione condotti a 70 °C). In linea generale, è evidente l'effetto del simulante utilizzato ed infatti CH_3COOH 3 %_{p/v} presenta in tutti i casi considerati una capacità di estrazione molto più alta rispetto a quella del $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 10 %_{v/v}, arrivando ad estrarre sia a 70 °C (t = 2 h) che a 40 °C (t = 10 gg) una quantità di argento confrontabile al contenuto totale di Ag del campione.

L'Ag-PLA risulta quindi NON idoneo per un utilizzo nel packaging di alimenti acidi (alimenti con pH < 4.5) e per un utilizzo a caldo.

La percentuale di acqua contenuta nei campioni esaminati mediante TGA è risultata inferiore al limite di rilevabilità (< 0.1%). Il peso dei campioni è risultato mantenersi pressoché costante all'aumentare della temperatura fino a temperature < 100 °C, mentre dopo i 100 °C il materiale comincia a degradarsi. Tramite DSC è stata determinata la temperatura di transizione vetrosa (T_g) del polimero, che è risultata compresa tra 65 e 70 °C. La reazione di cristallizzazione (per campioni sottoposti a test di migrazione alla stessa temperatura) è risultata avvenire ad una temperatura compresa tra i 100 e i 110 °C, in dipendenza dal tipo di simulante a cui è stato esposto il campione, mentre all'aumentare della temperatura (campione sottoposto al test di migrazione a 70 °C) non si ha nessun altro riarrangiamento del materiale dopo la T_g .

Nel complesso, i risultati ottenuti dalle analisi termiche evidenziano come l'Ag-PLA risulti un materiale NON idoneo per utilizzo ad alte temperature (in coerenza con quanto evidenziato dalle prove per la valutazione della migrazione specifica dell'Ag).

Le prove microbiologiche condotte per la valutazione statica della crescita di E. coli hanno mostrato una zona di inibizione della crescita in corrispondenza del film di Ag-PLA, che – a seconda delle condizioni – non riguarda solamente la porzione di terreno sottostante il film ma anche le zone limitrofe.

Si prevedono ulteriori possibilità di sviluppo del lavoro, che riguardano in primo luogo il completamento della caratterizzazione dei materiali già esaminati. Sono infatti in corso o programmate le seguenti ulteriori prove:

- Determinazione del contenuto di Ag in tutte le soluzioni in $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 10 %_{v/v}, per confermare la presunta idoneità del materiale per il packaging di alimenti con un carattere idrofilico, a temperatura ambiente valutazione del contenuto di olio di semi di girasole (Simulante D2) adsorbito sul film di PLA TQ e Ag-PLA per la determinazione della migrazione globale nel Simulante D2 determinazione del contenuto di Ag nei provini di Ag-PLA dopo i test di migrazione;
- Applicazione della metodologia messa a punto per la valutazione della crescita dinamica sui campioni di Ag-PLA, a completamento dei test microbiologici;
- Applicazione della metodologia basata su FFF messa a punto per l'identificazione e la caratterizzazione dimensionale delle nanoparticelle nelle soluzioni di Simulante A e B dopo i test di migrazione.

Si prevede inoltre di sviluppare una metodologia dedicata, basata su ICP-MS, per la determinazione del contenuto di Ag nelle soluzioni di Simulante D2 (olio di semi di girasole). Questa tipologia di analisi richiede la messa a punto di una metodologia dedicata, con un'adeguata procedura di pretrattamento delle soluzioni e/o un sistema di introduzione del campione dedicato, in relazione al tipo di solvente ed in particolare al tenore di sostanza organica dell'olio stesso.

Sarà inoltre possibile sviluppare una metodologia basata sull'accoppiamento del sistema FFF con ICP-MS, che consenta di determinare anche la concentrazione di Ag nelle diverse frazioni di nanoparticelle eluite attraverso l'FFF, accompagnando così l'informazione sulla tipologia e dimensione delle NP con la caratterizzazione chimica.

Le metodologie sviluppate potranno essere poi applicate su altre tipologie di materiali ed in particolare su nuovi film di Ag-PLA preparati in diverse condizioni e con diversi tenori di Ag, che sono in corso di realizzazione.

A partire dai risultati ottenuti per la migrazione specifica dell'Ag, è stato effettuato un calcolo orientativo per valutare le quantità di Ag potenzialmente rilasciate da un contenitore del volume di 1 L (1 dm³) realizzato con l'Ag-PLA esaminato, che sono state poi confrontate con i valori limite stabiliti dalla normativa vigente (soglia di contaminazione per le acque superficiali = 10 µg/L*), le raccomandazioni OMS (nell'acqua potabile, concentrazioni di 0.1 mg/L sono considerate tollerabili senza rischio per la salute**) ed il valore limite per gli alimenti stabilito da EFSA (0.05 mg/kg***). Per quanto riguarda la migrazione in CH₃COOH 3 %_{p/v} (Simulante B), sono state riconfermate ancora una volta le problematiche già evidenziate connesse con l'impiego dell'Ag-PLA nel packaging per alimenti acidi, soprattutto a caldo; per quanto riguarda invece la migrazione in CH₃CH₂OH 10 %_{v/v} (Simulante A), si ottengono valori ben al di sotto di tutti i valori limite considerati per il confronto. In ogni caso questa valutazione tiene conto esclusivamente del contenuto di Ag rilasciato dal film di Ag-PLA, senza alcun riferimento all'eventuale rilascio in forma di nanoparticelle e quindi ai fini di una più ampia e più esaustiva valutazione per la sicurezza alimentare sarebbe necessario esaminare anche questi ulteriori aspetti.

Considerando che le metodologie disponibili previste dalla normativa per la valutazione della migrazione globale e specifica dei materiali a contatto con alimenti sono state sviluppate per materiali "tradizionali" e il crescente utilizzo per il packaging di nuovi materiali (in particolare materiali biodegradabili e materiali funzionalizzati con nanoparticelle), si sottolinea in linea generale l'esigenza e l'importanza di sviluppare nuove metodologie dedicate alla caratterizzazione dei materiali a contatto con gli alimenti. Tali metodologie dovrebbero da un lato consentire di studiare nel dettaglio e/o di tenere conto di particolari effetti prodotti dall'impiego dei nuovi materiali e/o delle nuove tecnologie nello sviluppo e realizzazione del packaging, e dall'altro lato una sempre più ampia caratterizzazione per i diversi aspetti connessi sia alla sicurezza alimentare che agli eventuali effetti positivi sulla qualità e la conservabilità dei prodotti.

Bibliografia

Aimee R. Poda, A.J. Bednar, A.J. Kennedy, A. Harmon, M. Hull, D.M. Mitrano, J.F. Ranville, J. Steevens (2011) Characterization of silver nanoparticles using flow-field flow fractionation interfaced to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218, 4219– 4225

Alessandro Pegoretti (2008) Compositi polimerici strutturali per l'ingegneria industriale: realtà e sfide tecnologiche. Dispensa del corso di ingegneria industriale, Università degli studi di Trento, 4-7

Alessandro Pegoretti (2010) Nanocompositi biodegradabili a base di acido polilattico. Convegno: "Eco - Innovazione: nuovi materiali e prodotti polimerici", 37-53

Angela Montanari (2004) Idoneità alimentare di un contenitore. Dispensa per il corso di Scienze e Tecnologie Agrarie, Agroalimentari e Forestali. Università degli studi di Parma, 1-12.

Bergeret Anne (2011) Environmental-Friendly Biodegradable Polymers and Composites. Chapter 18 of *Integrated Waste Management – Volume I*, 341-364

Camera di commercio Industria Artigianato e Agricoltura di Torino, laboratorio chimico (2008) Guida agli imballaggi: Confezioni e imballaggi? Vai sul sicuro, 7-22.

Caterina Barone, L.Bolzoni, G.Caruso, A.Montanari, S.Parisi, I.Steinka (2015) *Food Packaging Hygiene*, First edition, chapter 2 "Inorganic Contaminants of Food as a Function of Packaging Features" 17-41.

Coldiretti Macerata (2010) Opuscolo Domanda n°4590/2010: Materiali, oggetti e imballaggi a contatto con i prodotti alimentari. Aspetti generali. Obblighi per gli Operatori del Settore Alimentare. Consumatore finale, 1-8.

Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152 "Norme in materia ambientale" pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 88 del 14 aprile 2006 - Supplemento Ordinario n. 96

Decreto Ministeriale del 21/03/1973. Disciplina igienica degli imballaggi, recipienti, utensili, destinati a venire in contatto con le sostanze alimentari o con sostanze d'uso personale. Pubblicato/a su: *Gazz. Uff. Suppl. Ordin.* n°104 del 20/04/1973.

Direttiva 2002/72/CE della commissione del 6 agosto 2002 relativa ai materiali e agli oggetti di materia plastica destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari.

Direttiva 2002/72/CE della Commissione del 6 agosto 2002, riguardante i materiali e gli oggetti in materia plastica destinati ad entrare in contatto con i prodotti alimentari.

Direttiva 2007/19/CE della commissione del 2 aprile 2007 che modifica la direttiva 2002/72/CE relativa ai materiali e agli oggetti di materia plastica destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari e la direttiva 85/572/CEE del Consiglio che fissa l'elenco dei simulanti da impiegare per la verifica della migrazione dei costituenti dei materiali e degli oggetti di materia plastica destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari.

Direttiva 94/62/CE del parlamento europeo e del consigli del 20 dicembre 1994 sugli imballaggi e i rifiuti di imballaggio.

Eduardo Bolea & J. Jiménez-Lamana & F. Laborda & J. R. Castillo (2011) Size characterization and quantification of silver nanoparticles by asymmetric flow field-flow fractionation coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 401:2723–2732

EFSA: Food Contact Materials (<http://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/foodcontactmaterials>)

EURL-FCM: Laboratorio di riferimento dell'Unione europea per i materiali a contatto con gli alimenti (<https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/food-contact-materials>)

Giulio Natta e Fernando Danusso (1958) Nomenclatura relativa ai polimeri aventi struttura stericamente ordinata. *Rivista “La chimica e l’industria”*, 743-746

HAN Wei, YU YanJun, LI NingTao & WANG LiBing (2011) Application and safety assessment for nano-composite materials in food packaging. *Vol.56 No.12: 1216–1225*

Ioannis S. Arvanitoyannis, Konstantinos V. Kotsanopoulos (2014) Migration Phenomenon in Food Packaging. *Food–Package Interactions, Mechanisms, Types of Migrants, Testing and Relative Legislation—A Review. Food and Bioprocess Technology, Volume 7, Issue 1, 21-36*

ISO 21067:2007 Packaging – Vocabulary, First edition, 1-11

Janim Ahmed & Sunil K. Varshney (2011) Polylactides—Chemistry, Properties and Green Packaging Technology: A Review. *International Journal of Food Properties*, Volume 14, 37-58

K. Madhavan Nampoothiri, Nimisha Rajendran Nair, Rojan Pappy John (2010) An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresource Technology*, 8493–8501

Kanishka Bhunia, Shyam S. Sablani, Juming Tang, and Barbara Rasco (2013) Migration of Chemical Compounds from Packaging Polymers during Microwave, Conventional Heat Treatment, and Storage. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, volume 12, 523-545

Katrin Loeschner, Jana Navratilova, Samuel Legros, Stephan Wagner, Ringo Grombe, James Snell, Frank von der Kammer, Erik H. Larsen (2012) Optimization and evaluation of asymmetric flow field-flow fractionation of silver nanoparticles. *Journal of Chromatography A*, 1272, 116-125

Kenneth Marsh, ph.d., and Betty Bugusu, ph.d. (2007) Food Packaging—Roles, Materials, and Environmental Issues. *Journal of food science*, Vol. 72, Nr. 3, 39-55.

Koni Grob (2008) The future of simulants in compliance testing regarding the migration from food contact materials into food. *Food Control*, Volume 19, Issue 3, 263–268

Kostas Kapiris, O. Al-Dayel, O. Al-Horayess, J. Hefni, A. Al-Durahim and T. Alajyan (2012) Food Quality, chapter 5 “Contamination of Foods by Migration of Some Elements from Plastics Packaging”, 73-80.

Leda Coltro, Joyce Borghetti Pitta, Paulo Afonso da Costa, Mary Ângela Fávaro Perez, Vanessa Aparecida de Araújo, Rafaela Rodrigues (2014) Migration of conventional and new plasticizers from PVC films into food simulants: A comparative study. *Food Control*, 44, 18-129

Lynn J. Frewer, Willem Norde, Arnout Fischer, and Frans Kampers (2011) Nanotechnology in the Agri-Food Sector. Implications for the Future. 39-212

Luc Avérous (2004) Biodegradable multiphase systems based on plasticized starch: a review. *Journal of Macromolecular Science*, Part C—Polymer Reviews Vol. C44, No. 3, 231–274.

Luc Avérous (2008) Polylactic acid: Synthesis, Properties and Application. Chapter 21 of *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, 433-448

Luciano Di Maio, Paola Scarfato, Maria Rosaria Milana, Roberta Feliciani, Massimo Denaro, Giorgio Padula and Loredana Incarnato (2014). Bionanocomposite Poly(lactic Acid)/Organoclay Films: Functional Properties and Measurement of Total and Lactic Acid Specific Migration. *International journal of packaging technology and science*, Volume 27, 535–547

Majid Jamshidian, Elmira Arab Tehrani, Muhammad Imran, Muriel Jacquot, and Stéphane Desobry (2010) Poly-Lactic Acid: Production, Applications, Nanocomposites, and Release Studies. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, volume 9, 552-571

Matteo Alessandro Del Nobile, A. Conte, G.G. Buonocore, A.L. Incoronato, A. Massaro, O. Panza (2009) Active packaging by extrusion processing of recyclable and biodegradable polymers. *Journal of Food Engineering*, 93, 1-6

Mauro Ferraresi (2003) *Il packaging. Oggetto e comunicazione*, terza edizione, 26-28.

Md Ehsanul Hoque, Kambiz Khosravi, Karla Newman, Chris D. Metcalfe (2012) Detection and characterization of silver nanoparticles in aqueous matrices using asymmetric-flow field flow fractionation with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1233, 109– 115

Ministero della Salute – nota 12 maggio 2011 n. 15844 - Regolamento (UE) N. 10/2011 riguardante i materiali e gli oggetti di materia plastica destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari.

Muhammad Imran, Anne-Marie Revol-Junelles, Agnieszka Martyn, Elmira Arab Tehrani, Muriel Jacquot, Michel Linder, and Stéphane Desobry (2010) Active Food Packaging Evolution: Transformation from Micro- to Nanotechnology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (50), 799–82

Nate Seltenrich (2015). A Hard Nut to Crack: Reducing Chemical Migration in Food-Contact Materials. *Environmental Health Perspectives*, 123(7), A174–A179

Nattinee Bumbudsanpharoke and Seonghyuk Ko (2015) Nano-Food Packaging: An Overview of Market, Migration Research, and Safety Regulations. *Journal of Food Science*, Vol. 80, Nr. 5, 910-923

Nicoleta A. Suci, Francesca Tiberto, Sotirios Vasileiadis, Lucrezia Lamastra, Marco Trevisan (2013) Recycled paper–paperboard for food contact materials: Contaminants suspected and migration into foods and food stimulant. *Food Chemistry*, Volume 141, Issue 4, 4146–4151

Norma EN 13432 (2002) "Requisiti per imballaggi recuperabili mediante compostaggio e biodegradazione - Schema di prova e criteri di valutazione per l'accettazione finale degli imballaggi"

Qasim Chaudhry, Michael Scotter, James Blackburn, Bryony Ross, Alistair Boxall, Laurence Castle, Robert Aitken & Richard Watkins (2008) Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. *Food Additives and Contaminants*, 25(3): 241–258

Otmar Geiss, Claudia Cascio, Douglas Gilliland, Fabio Franchini, Josefa Barrero-Moreno (2013) Size and mass determination of silver nanoparticles in an aqueous matrix using asymmetric flow field flow fractionation coupled to inductively coupled plasma mass spectrometer and ultraviolet–visible detectors. *Journal of Chromatography A*, 1321, 100–108

Otto G. Piringer, Albert L. Baner, Roland Franz and Angela Störmer (2008) *Plastic Packaging: Interactions with Food and Pharmaceuticals*, Second Edition

Peter Fellows (2000) *Food processing technology, principles and practice*, Second edition, 462-463.

Pietro Appendino (2005) *Materiali polimerici*. Dispensa di riferimento del corso di Materiali, Politecnico di Torino, 1-100.

Rafael Auras, Bruce Harte, Susan Selke (2004) An Overview of Polylactides as Packaging Materials. *Macromolecular Bioscience*, volume 4, 835-864

Rafael Auras, Bruce Harte, Susan Selke (2005) Polylactides. A new era of biodegradable polymers for packaging application. *ANTEC 2005*, 3240-3244

Regolamento CE 1223/2009 del parlamento europeo e del consiglio del 30 novembre 2009 sui prodotti cosmetici.

Regolamento (CE) n. 1935/2004 del parlamento europeo e del consiglio del 27 ottobre 2004 riguardante i materiali e gli oggetti destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari e che abroga le direttive 80/590/CEE e 89/109/CEE

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

Regolamento (UE) N. 10/2011 della commissione del 14 gennaio 2011 riguardante i materiali e gli oggetti di materia plastica destinati a venire a contatto con i prodotti alimentari.

Renata Dobrucka, Ryszard Cierpiszewski, Andrzej Korzeniowski (2015) Intelligent food packaging - research and development. LogForum 11 (1), 7-14

Richard Coles D. McDowell and M.J. Kirwan (2003) Food packaging technology, 1-91.

Roberta D'Aurelio, Vincenzo Olivieri, Paola Pittia (2009) Valutazione del rischio dei nanomateriali negli alimenti: stato dell'arte. Argomenti n°4, 57-64

Robinson D. K. R. And Morrison M. J. (2010) Nanotechnologies for food packaging: Reporting the science and technology research trends: Report for the ObservatoryNANO. 1-14

SANCOE6 (2014) SUMMARY OF THE NATIONAL LEGISLATION, 1-3.
(http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/foodcontact/docs/sum_nat_legis_en.pdf)

Standard ASTM D-5488-94d (2012) "Standard Terminology of Environmental Labeling of Packaging Material and Packages".

Suprakas Sinha Ray (2012) Polylactide-Based Bionanocomposites: A Promising Class of Hybrid Materials. Accounts of chemical research, Vol. 45, No. 10, 1710–1720

Timothy V. Duncan (2011) Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. Journal of Colloid and Interface Science, 1-24

Treccani (2008) Enciclopedia della scienza e della tecnica

UNI: Ente Nazionale Italiano di Unificazione
(http://www.uni.com/index.php?option=com_content&view=article&id=141&Itemid=2422)

Yutaka Tokiwa & Buenaventurada P. Calabia (2006) Biodegradability and biodegradation of poly(lactide). Applied microbiology and biotechnology, 244–251

ENEA
Servizio Promozione e Comunicazione
www.enea.it

Stampa: Laboratorio Tecnografico ENEA - C.R. Frascati
luglio 2018