



REGIONE
PIEMONTE

FEASR - Fondo europeo agricolo per lo sviluppo rurale
l'Europa investe nelle zone rurali

Programma di sviluppo rurale 2014-2020

Misura 16 – Innovazione e Cooperazione
Operazione 16.1.1 Costituzione, Gestione e Operatività
dei Gruppi Operativi del Pei-Agri

Salumi Liberi

Progetto per la riduzione dei nitrati/nitriti nei prodotti di salumeria e nel prosciutto cotto

Costo complessivo: € 567.321,85
Contributo pubblico concesso: € 453.857,48
di cui quota FEASR: €195.703,35



www.regione.piemonte.it/svilupporurale



Progetto SALUMI LIBERI

Review parametri chimico - fisici

APPROCCI PER RIDURRE L'USO DI NITRITI E NITRATI NEI SALUMI

Rassegna bibliografica a cura di

Laura Bersani¹, Franco Fracchia¹, Jean Daniel Coisson² e Marco Arlorio²

1: Laboratorio Chimico della Camera di Commercio - Torino

2: Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università del Piemonte Orientale – Novara

INTRODUZIONE

L'esigenza di poter conservare gli alimenti nel tempo con modalità idonee a garantire la sicurezza alimentare insieme alla richiesta di limitare l'uso di conservanti "chimici" da parte dei consumatori sta spingendo gli operatori del settore a trovare soluzioni adeguate che consentano di perseguire entrambi gli obiettivi.

In particolare, nel comparto della carne conservata è molto attiva la ricerca di soluzioni che consentano da un lato di ridurre in modo igienicamente sicuro l'uso di conservanti (in particolare di nitriti e nitrati) e dall'altro di mantenere caratteristiche nutrizionali ed organolettiche legate ad una corretta conservazione. Si tratta quindi di coniugare esigenze legate alla sicurezza con la qualità del prodotto, intesa nel suo significato più vasto, comprendendo in particolare gli aspetti organolettici e sensoriali.

A queste esigenze si sta affiancando la richiesta di adottare pratiche che vadano a limitare la produzione di perdite alimentari: in particolare in uno studio (Wilkstrom *et al.*, 2018) condotto per quantificare settimanalmente la produzione di gas serra legato al consumo di prodotti carnei da parte di un nucleo di quattro persone, emerge che il 18 % degli alimenti viene sprecato, ponendo in evidenza l'importanza di mantenere nel tempo un alimento sicuro e con caratteristiche idonee al consumo.

MECCANISMO D'AZIONE di NITRITI e NITRATI

L'uso di conservanti per i prodotti carnei è previsto dalla legislazione comunitaria che nel Regolamento CE 1333/2008 e s.m.i. consente in particolare l'uso di sali di nitriti e nitrati, da aggiungere al momento della produzione, in quantità differenti a seconda della tipologia di carne conservata. I nitrati e i nitriti vengono assorbiti dall'organismo con modalità differenti, in quanto i nitrati vengono parzialmente convertiti in nitriti già nel cavo orale. I nitriti assorbiti possono ossidare l'emoglobina in metaemoglobina che se presente in eccesso limita la funzione dei globuli rossi di trasportare ossigeno alle cellule (metaemoglobinemia, particolarmente critica nel neonato); inoltre, se presenti in eccesso ed in determinate condizioni (ambiente fortemente acido) possono formare, reagendo con ammine libere, le nitrosammine, di cui alcune sono note sostanze cancerogene. Da non sottovalutare è anche la produzione di radicali liberi. L'EFSA (2017), confermando la criticità di questi additivi, ha quindi stabilito che le dosi giornaliere ammesse (DGA) per i nitrati ed i nitriti sono rispettivamente di 3.7 mg/kg pc/die e 0.06 mg/kg pc/die. Da ricordare che l'assunzione di nitrati e nitriti deriva da altri alimenti nella dieta (vegetali, acqua), non solo dai salumi trattati.

Il meccanismo d'azione di questi sali (Zeppa, 2013) prevede la formazione di composti tossici anche nei confronti degli sporigeni, proteggendo quindi l'alimento oltre che l'uomo (in particolare dal *Clostridium botulinum*, microorganismo tossigeno) ed ha anche un ruolo importante per le caratteristiche organolettiche del salume.

Come riportato nella valutazione del rischio effettuata da EFSA (2017), l'aggiunta dei sali di nitriti e di nitrati svolge la funzione di ostacolare la crescita di microrganismi patogeni (in particolare di *Clostridium botulinum*, come anticipato) mediante diversi meccanismi, come i) la riduzione della disponibilità di acqua, ii) la formazione di sostanze inibitorie a partire dal nitrito (mediante un'azione sugli enzimi intra/extracellulari, sugli acidi nucleici, sulle membrane cellulari), o iii) la limitazione della disponibilità di metalli fondamentali per il metabolismo microbico, come il ferro.

Oltre alla funzione di conservanti, i nitriti svolgono un ruolo importante per le caratteristiche organolettiche, agendo positivamente sull'uniformità del colore (azione secondaria particolarmente importante a livello tecnologico e sensoriale), sulla struttura e sul sapore della carne conservata, oltre a proteggere i grassi da processi ossidativi (Sindelar, 2011): il monossido di azoto derivato dai nitriti è infatti in grado di reagire con la mioglobina formando la *nitrosomioglobina* di colore rosso scuro, tipico degli insaccati crudi. Se questi vengono sottoposti ad un trattamento con calore, si ottiene il nitrosocromiogeno, una proteina denaturata di colore rosa chiaro tipico delle carni cotte. Entrambe le reazioni di formazione di questi pigmenti non sono reversibili.

Dal punto di vista organolettico i nitriti possono inoltre influire positivamente su tessitura e uniformità del colore, e, come azione secondaria rispetto alle precedenti, attraverso la limitazione della disponibilità del ferro, elemento catalizzatore delle reazioni ossidative, prevengono l'ossidazione dei grassi.

PARAMETRI CHIMICO FISICI

Per valutare l'effetto dei nitriti e nitrati per assicurare la stabilità del prodotto, occorre indagare i parametri chimico fisici che vengono interessati nel meccanismo d'azione dei conservanti.

Si considerano in particolare il pH e l'attività dell'acqua: il valore di attività dell'acqua risulta strettamente correlato all'acqua presente nell'alimento, ma rappresenta in modo corretto l'effettiva disponibilità di acqua necessaria per la vita microbica, considerando anche quella non quantificabile con il parametro umidità.

Occorre differenziare due tecnologie di produzione (Martuscelli, 2007), cioè i salumi a rapida acidificazione e quelli sottoposti a lunga stagionatura.

Nel primo caso l'abbassamento del pH è sufficiente per consentire la conservazione, e non è necessario procedere con una disidratazione elevata per diminuire la disponibilità dell'acqua misurata attraverso il parametro di attività dell'acqua.

Invece durante il processo di maturazione dei salumi stagionati avvengono reazioni biochimiche che influiscono sul pH del prodotto che subisce un innalzamento, non agendo più come parametro di contenimento della crescita microbica. In questo caso il parametro che occorre valutare per la conservazione è l'attività dell'acqua (a_w) che rappresenta, ai valori presenti nei salumi, un importante indice per prevedere se sono presenti condizioni favorevoli per la proliferazione dei microrganismi (Alais, 1991).

CARATTERISTICHE NUTRIZIONALI, ORGANOLETTICHE

Nel 2011 si è provveduto ad aggiornare i dati nutrizionali dei principali salumi italiani con certificazione DOP e IGP (sito CREA). Confrontando i dati precedenti e quelli attuali, si nota un miglioramento sostanziale del prodotto, pur mantenendo le caratteristiche essenziali per il mantenimento delle certificazioni. I processi produttivi si sono modificati secondo le necessità espresse dai consumatori e dalle pressioni mediatiche sia per la riduzione di conservanti sia per l'esigenza di migliorare i parametri nutrizionali, diminuendo i

costituenti con un impatto negativo. Si sono quindi evidenziati una riduzione nell'utilizzo di cloruro di sodio, un miglioramento del profilo lipidico a partire dalle tecniche di allevamento e dalla dieta somministrata agli animali e una riduzione del quantitativo di conservanti (nitriti e nitrati), attuando inoltre nuovi metodi di conservazione durante il processo produttivo (refrigerazione, nuove conoscenze microbiologiche, norme HACCP, utilizzo di spezie ad azione antiossidante e batteriostatiche). Sono stati anche valutati i contenuti in sali minerali, vitamine e tipologia di acidi grassi. I salumi di oggi assumono quindi un nuovo ruolo nutrizionale nelle diverse fasi della vita dei consumatori a seconda delle loro necessità.

Nel campo di interesse sull'igiene della produzione dei salumi è da segnalare il progetto di ricerca UE PHYTOME 2012-2015 che ha testato una serie di formulazioni e processi produttivi innovativi nella produzione di salumi per verificare l'influenza sugli aspetti nutrizionali. In questo studio internazionale si è infatti confrontato l'aspetto nutrizionale di prodotti ottenuti solamente con estratti vegetali come additivi o contenenti una bassissima quantità di nitriti sottoponendo 80 volontari ad una dieta in cui rientravano anche altri alimenti con cui si ha possibilità di entrare in contatto con i composti di derivazione nitrosa (NOCs compounds), quali acqua e verdure a foglia larga. Il programma alimentare prevedeva l'alternarsi di somministrazione di salumi contenenti nitriti, di carni bianche, somministrazione contemporanea di prodotti privi di nitriti e quelli convenzionali ed un periodo in cui viene somministrata acqua contenente nitrati associata ad uno dei quattro tipi di carne somministrata precedentemente. Al termine del periodo di ogni regime alimentare sono stati prelevati campioni di urine, feci, saliva e tessuto del colon in modo da valutare l'esposizione, i danni riportati dal consumo di nitrati e i benefici dal consumo di prodotti in cui i nitriti erano assenti. Le analisi hanno portato alla conclusione che il consumo di prodotti contenenti estratti vegetali diminuisce la possibilità della formazione di derivati nitrosi ad azione cancerogena; inoltre si tratta di prodotti che vengono ben accettati da parte dei consumatori che, una volta informati del rischio all'esposizione ai nitriti, ricercano un prodotto che riduca il manifestarsi di effetti negativi. Nonostante questo, durante questo progetto è emerso che non per tutti i prodotti a base di carne si può sostituire completamente l'utilizzo dei nitrati e dei nitriti, ma che sarebbe opportuno sviluppare un processo produttivo in cui sia prevista una riduzione di questi conservanti abbinandoli a derivati di origine vegetale.

Successivamente, in numerosi lavori di ricerca (Wójciak *et al.* 2019, Ferysiuk *et al.* 2020, Bertolini *et al.* 2020, Szymandera-Buszka *et al.* 2020) si sono esaminati gli effetti sulle caratteristiche organolettiche dovuti alla sostituzione totale o parziale di nitriti e nitrati con derivati vegetali.

Dal punto di vista organolettico, ad esempio, il test sensoriale effettuato da un panel di assaggiatori ponendo a confronto prodotti contenenti diversi estratti in etanolo di piante come origano, timo, maggiorana, basilico e levisco – alla concentrazione di circa 0.05% - con campioni di controllo negativo (senza la presenza di estratti vegetali) ha evidenziato che le modifiche delle caratteristiche sensoriali possono rendere il prodotto poco appetibile da parte dei consumatori (Szymandera-Buszka *et al.*, 2020). La scelta degli "ingredienti" ad azione batteriostatica o antimicrobica, quindi, deve tener conto degli aspetti sensoriali.

L'approccio utilizzato da Bertolini *et al.* (2020) con il coinvolgimento di consumatori informati ha ottenuto un'altra valutazione. Infatti ad una modalità di conduzione di un'analisi di tipo sensoriale di un salume ottenuto senza additivi mediante un'Analisi Quantitativa Descrittiva (QDA) con l'utilizzo di un panel di assaggiatori, si è affiancato un test di accettabilità eseguito con 60 consumatori sottoposti a 3 modalità diverse per l'assaggio:

- "blind" in cui l'assaggio viene fatto senza alcuna informazione riguardante il prodotto;
- "atteso" in cui non si ha nessun assaggio, ma il consumatore è invitato a descrivere le aspettative riguardo ad un salame senza conservanti

- “reale” in cui si ha l’assaggio consapevole del prodotto senza conservanti (consumatore informato).
Dai risultati ottenuti si evidenzia che dal punto di vista sensoriale non ci sono variazioni sostanziali del sapore tipico dei salumi prodotti con nitrati e nitriti, ma soprattutto che i consumatori hanno alte aspettative di gradimento per i prodotti senza conservanti e che quindi vengono condizionati in modo positivo quando si presenta loro un prodotto privo di conservanti.

ETICHETTATURA

Secondo quanto previsto dalla legislazione vigente occorre prestare attenzione nel poter riportare in etichetta che il prodotto non contiene additivi, qualora non si usino nitriti e nitrati o altri conservanti. La nota 0036275 – P del Ministero della Salute del 14/09/2017 ricorda infatti ai sensi dell’articolo 7 del Regolamento UE 1169/2011 che le informazioni in etichetta non devono ingannare il consumatore, e pertanto se vengono utilizzati estratti vegetali in sostituzione di additivi non è possibile inserire l’asserzione “senza additivi”. Occorrerà quindi effettuare una disamina dei claim utilizzabili, avvalendosi eventualmente delle Linee Guida UNI/PdR 57:2019 per Prodotti alimentari e bevande senza additivi, in cui si definiscono i requisiti e il modello di valutazione della conformità da parte terza e questo documento può costituire un riferimento utile.

APPROCCI ALTERNATIVI ALL’USO di NITRITI e NITRATI

Come evidenziato in un’indagine condotta in Italia (Roila *et al.* 2018), il contenuto di nitrati e nitriti presenti come additivi all’interno dei salumi incide poco sull’esposizione dei consumatori, in quanto possiamo ritrovare questi composti in moltissimi prodotti come costituenti naturali, ad esempio nelle verdure, o come contaminanti, come nell’acqua. Per poter comunque ridurre questo tipo di esposizione e poter andare incontro ad una maggiore richiesta di prodotti “clean label” si stanno valutando (Alahakoon *et al.* 2015) diversi approcci come:

- uso di spezie tal quali, che hanno spesso lo svantaggio di determinare una modifica organolettica del prodotto finito
- uso di estratti di spezie, in modo da isolare e utilizzare solo la componente ad azione antiossidante e antibatterica (polifenoli)
- uso di estratti di piante contenenti per loro natura una percentuale di nitrati significativa (rimane comunque obbligatorio segnalare in etichetta la presenza di nitriti), caso precedentemente descritto
- uso di oli essenziali ad azione antibatterica
- uso di una combinazione di questi estratti con una dose minima di nitriti e nitrati
- utilizzo di starter microbiologici che permettano la riduzione da nitrati a nitriti e la loro degradazione, in modo da non avere un accumulo nel prodotto finito
- uso di estratti botanici antimicrobici (ovvero estratti ricchi in polifenoli antimicrobici) che possono essere mascherati agevolmente tramite microincapsulazione per ridurre l’impatto organolettico
- uso di sottoprodotti alimentari, ricchi in fibre, che permettono di abbassare l’a_w, e in polifenoli (albedi di Citrus, scarti di pomodoro, erbe da cucina) che presentano buona compatibilità con la matrice, ma un’azione limitata su *C. botulinum*.

Ripercorrendo la letteratura nel campo si può considerare a sé un’alternativa individuata nella rassegna bibliografica (Alahakoon *et al.* 2015) per migliorare il controllo dello sviluppo microbiologico, ovvero l’uso della tecnica HHP (alta pressione idrostatica) da sola o combinata con altri trattamenti di conservazione, le cui principali sperimentazioni sono riportate nella Tabella seguente.

Treatment	Product	Effect	Reference
HHP at 600 MPa	Dry cured ham	Absence of <i>L. monocytogenes</i> after 120 days	Hugas, Garriga, and Monfort (2002)
HHP at 400 MPa	Cooked ham	1.9 log CFU/g reduction of <i>L. monocytogenes</i> after 42 days	Aymerich, Jofre, Garriga, and Hugas (2005)
HHP at 450 MPa	Iberian ham	3.6 log CFU/g reduction of <i>L. monocytogenes</i> after 60 days	Morales, Calzada, and Nunez (2006)
HHP at 400 MPa with pediocin, sakacin and enterocin	Meat homogenates	<i>L. monocytogenes</i> was < 10 ² CFU/g for 61 days	Garriga, Aymerich, Costa, Monfort, and Hugas (2002)
HHP at 400 MPa with potassium lactate	Sliced cooked ham	Inhibition of <i>L. monocytogenes</i> and <i>Salmonella</i> during 84 days	Aymerich <i>et al.</i> (2005)
HHP at 600 MPa	Cooked ham, dry cured ham and marinated beef loin	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> below the detection limit during 120 days storage	Jofre, Aymerich, Grebol, and Garriga (2009)

Come noto, l'uso di tecnologie innovative (fra cui anche le tecnologie dette "non termiche") può ridurre significativamente la flora microbica totale degli alimenti trattati, seppure in alcuni casi trattando la matrice si ottengano impatti significativi sulla componente aromatica degli stessi o variazione di colore, fattori negativi sotto il profilo della accettabilità del prodotto da parte del consumatore. Il trattamento con HHP, comunque, può essere considerato effettivo per la riduzione o la totale eliminazione di alcuni batteri patogeni (ad esempio *L. monocytogenes*).

La maggior numerosità e varietà di sperimentazioni si riscontra in relazione all'uso di estratti vegetali, per i quali si riporta innanzitutto quanto riportato sempre nella rassegna bibliografica di Alahakoon *et al.* 2015.

Potential alternatives	Concentrations used	Type of meat product/media	Effects	References
Green tea extract	1–2%	Ground beef meat	Reduced lipid oxidation and stabilized the meat color	Mustafa (2013)
Tea catechin with modified atmospheric packaging	200 mg/kg	Beef patties	Improved lipid stability and color stability	Tang <i>et al.</i> (2006)
Rosemary and oregano extract	0.02% of each	Raw pork batters	Higher antioxidant activity and prevention of color deterioration	Hernandez-Hernandez, Ponce-Alquicira, Jaramillo-Flores, and Legarreta (2009)
Grape seed extracts	0.00015–0.125%	Aqueous media	Impact on growth of <i>L. monocytogenes</i>	Bisha, Weinsattel, Brehm-Stecher, & Mendonca (2010)
Oregano and cranberry, with sodium lactate	Oregano and cranberry (50:50) at 750 ppm with 2% sodium lactate	Cooked ground beef	Impact growth of <i>L. monocytogenes</i> .	Apostolidis, Kwon, and Shetty (2008)
Aqueous extract of <i>Coptis</i> rhizome with sodium nitrite	Sodium nitrite 6–8 ppm with 0.05% <i>Coptis</i> extract	Broth media	Synergistic antibotulinal activity, reducing sodium nitrite from 6–8 ppm–2 ppm with 0.05% <i>Coptis</i> extract	Cui <i>et al.</i> (2010)
Anka rice with nitrite	Anka rice 0.5% 25 ppm nitrite	Low-nitrite Chinese sausages	No difference with 100 ppm nitrite added, color stability	Liu, Wu, and Tan (2010)
Annatto (<i>Bixa orellana</i> L.) powder	60% in sausage and 0.08, 0.31, and 0.16% (v/v) in broth	Sausage	Higher redness value, no growth of <i>C. perfringens</i> , control of <i>C. botulinum</i> growth	Zarringhalami, Sahari, and Hamidi-Esfehani (2009)
Grape seed extract, pine bark extract and oleoresin rosemary	1% each ingredient	Cooked beef	Impact growth of <i>L. monocytogenes</i>	Ahn, Grun, and Mustapha (2007)

Lo studio di Cui *et al.* (2010) ha individuato alcune piante con proprietà antisettiche/antimicrobiche da abbinare all'uso del nitrito. Questo approccio "sinergico" fra "botanicals" e nitriti è stato confermato anche da altri studi e, come detto precedentemente, rappresenta una soluzione performante per poter ridurre in modo significativo la quantità di additivi utilizzati senza diminuire la sicurezza del prodotto.

Per poter trovare un'alternativa all'utilizzo di additivi conservanti, diversi studi si sono quindi concentrati sul dimostrare come questa azione possa essere svolta da alcune molecole naturalmente presenti in spezie usate comunemente all'interno dei prodotti a base di carne, come pepe, rosmarino, origano, cannella, ecc. (Daglia 2012, Tomović *et al.* 2017). Ma altri autori hanno individuato anche matrici alternative come *Allium sativum*, *Thymus vulgaris*, *Juglans regia* (cortex), *Salvia officinalis*, noce moscata e chiodi di garofano. In molti casi sono stati applicati estratti ottenuti con vari solventi dalle matrici in questione e, oltre all'azione antibatterica, si è evidenziato un effetto positivo anche sulla stabilità ossidativa della frazione lipidica del salume.

Un riassunto di numerose valutazioni condotte in questo campo si ritrova nella review di Efenberger-Szmechtyk *et al.* (2021) di cui si riportano nelle pagine seguenti le tabelle riassuntive.

Plant material					
Common name	Scientific name	Extraction solvent	Method of microbiological analysis	Target microorganisms	Reference
Grape skins and seeds	<i>Vitis vinifera</i>	Water	Microplate photometer method	Gram-negative bacteria: <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella poona</i> , Gram-positive bacteria: <i>Bacillus cereus</i> , Yeasts: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida albicans</i>	Serra et al. (2008)
Blueberry Raspberry	<i>Vaccinium myrtillus</i> <i>Rubus idaeus</i> , var. Ottawa	Acetone/ water (70/30 v/v)	Disc diffusion method, plate count method (bacterial growth curve measurement)	Gram-negative bacteria: <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium	Puupponen-Pimiä et al. (2001)
Lingonberry	<i>Vaccinium vitis-idaea</i>			Gram-positive bacteria: <i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Lactobacillus crispatus</i> , <i>Lactobacillus johnsonii</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ,	
Blackcurrant Cloudberry Cranberry Sea buckthorn berry Strawberry	<i>Ribes nigrum</i> var. Öjeby <i>Rubus chamaemorus</i> <i>Vaccinium oxycoccus</i> <i>Hippophae rhamnoides</i> <i>Fragaria ananassa</i> Senga Sengana				
Bilberry Lingonberry Cranberry Red raspberry	<i>Vaccinium myrtillus</i> <i>Vaccinium vitis-idaea</i> <i>Vaccinium oxycoccus</i> <i>Rubus idaeus</i> var. Ottawa	Acetone/water (70/30 v/v)	Plate count method	Gram-negative bacteria: <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enterica</i> Infantis, <i>S. enterica</i> Typhimurium, <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> ,	Nohynek et al. (2006)
Cloudberry Strawberry	<i>Rubus chamaemorus</i> <i>Fragaria ananassa</i> Senga Sengana			Gram-positive bacteria: <i>Bacillus cereus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>	
Black currant Sea buckthorn berry Chokeberry Highbush bilberry Rowanberry Crowberry Wild blackberry European cornel Blackthorn	<i>Ribes nigrum</i> var. Öjeby <i>Hippophae rhamnoides</i> <i>Aronia mitschurinii</i> <i>Vaccinium myrtillus</i> <i>Sorbus aucuparia</i> <i>Empetrum nigrum</i> <i>Rubus fruticosus</i> <i>Cornus mas</i> <i>Prunus spinosa</i>	Formic acid/methanol/ water (0.1/70/29.9 v/v)	Disc diffusion method broth microdilution method	Gram-negative bacteria: <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus vulgaris</i> Gram-positive bacteria: <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Sarcina lutea</i> , <i>Micrococcus flavus</i> ,	Radovanović et al. (2013)
Grape skin	<i>Vitis vinifera</i> (white varieties: Debit, Kuć, Kujundžusa, Marastina, Medna, Rkaciteli*, Zlatarića; red varieties: Babić, Lasi, Merlot*, Plavina, Rudežusa, Trnjak, Vranac	Ethanol/water (80/20, v/ v)	Broth microdilution method	Gram-negative bacteria: <i>Escherichia coli</i> O157:H7, and <i>Salmonella Infantis</i> , <i>Campylobacter coli</i> Gram-positive bacteria: <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Katalinić et al. (2010)
Grape pomace	<i>Vitis vinifera</i> (Merlot and Syrah varieties)	Ethanol/ethyl acetate/hexane	Disc diffusion method broth microdilution method	Gram-negative bacteria: <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Gram-positive bacteria: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> Yeasts: <i>Candida albicans</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida krusei</i>	Oliveira et al. (2013)
Grape seeds	<i>Vitis vinifera</i>	Ethanol/water (50/50 v/v)	Agar well diffusion method	Gram-negative bacteria: <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Gram-positive bacteria: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , Molds: <i>Aspergillus niger</i> , <i>Fusarium oxysporum</i>	Ghouila et al. (2017)
Plums Red grapes elderberry fruits	<i>Prunus domestica</i> <i>Vitis vinifera</i> <i>Sambucus nigra</i>	Ethanol/water (70/30 v/v)	Agar well diffusion method	Gram-negative bacteria: <i>Escherichia coli</i> Gram-positive bacteria: <i>Bacillus</i>	Coman et al. (2017)

Plant material						
Common name	Scientific name	Extraction solvent	Method of microbiological analysis	Target microorganisms	Reference	
Pomegranate peels	<i>Punica granatum</i> (Mollar de Elche, Valenciana de Albaterra, Piñón Tierno de Ojós, Hicaznar, Borde de Albaterra, Borde de Beniél cultivars)	Methanol/water (70/30 v/v)	Radial growth inhibition Broth microdilution method	<i>cereus</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> Yeasts: <i>Candida albicans</i> Gram-negative bacteria: <i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i> Gram-positive bacteria: <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Spizizenii</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Moulds: <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>Gibberella fujikuroi</i> var. <i>Fujikuroi</i> , <i>Alternaria alternate</i> , <i>Botryotinia fuckeliana</i>	Rosas-Burgos et al. (2017)	
Pomegranate peels	<i>Punica granatum</i> L. (Hicaznar)	Methanol/water (80/20 v/v) + 0.01% HCl	A broth dilution method spread plate method (survival curves)	Gram-negative bacteria: <i>Cronobacter sakazakii</i> strains	Polat Yemis, Bach, and Delaquis (2019)	
Green tea	<i>Camellia sinensis</i>	–	Plate count method	Gram-negative bacteria: <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> Gram-positive bacteria: <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus sanguis</i> , <i>Streptococcus sobrinus</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , Yeasts: <i>Candida albicans</i>	Cho, Oh, and Oh (2010)	
Green tea	<i>Camellia sinensis</i>	–	Agar dilution method	Gram-positive bacteria: <i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA and MRSA strains)	Cho, Schiller, and Oh (2008)	
Green tea	<i>Camellia sinensis</i>	Water	Turbidity measurement	Gram-negative bacteria: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Gram-positive bacteria: <i>Staphylococcus aureus</i> ,	Bazzaz et al. (2016)	
Rooibos Green tea Black tea Rosemary Lemongrass Mulberry leaf Bamboo leaf Lotus leaf Peppermint Persimmon leaf Mate tea Green tea Black tea	<i>Aspalathus linearis</i> <i>Camellia sinensis</i> <i>Camelia sinensis</i> , <i>Rosmarinus officinalis</i> <i>Cymbopogon citrates</i> <i>Morus alba</i> <i>Sasa borealis</i> <i>Nelumbo nucifera</i> <i>Mentha piperita</i> , <i>Diospyros kaki</i> <i>Ilex paraguariensis</i> <i>Camellia sinensis</i> <i>Camellia sinensis</i>	Water ethanol/water (90/10 v/v)	Broth microdilution method	Gram-negative bacteria: <i>Shigella flexneri</i> , <i>Salmonella enterica</i> Gram-positive bacteria: <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus sobrinus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	Oh et al. (2013)	
Thyme Rosemary Oregano Peppermint Sage	<i>Thymus vulgaris</i> <i>Rosmarinus officinalis</i> <i>Origanum vulgare</i> <i>Mentha piperita</i> <i>Salvia officinalis</i>	Ethanol/water (70/30 v/v) methanol/water (70/30 v/v)	Disc diffusion method	Gram-negative bacteria: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> Gram-positive bacteria: <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> Gram-negative bacteria: <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , , <i>Bordetella bronchiseptica</i> Gram-positive bacteria: <i>Staphylococcus aureus</i> ,	Bancirova (2010) Kozłowska et al. (2015)	

Plant material					
Common name	Scientific name	Extraction solvent	Method of microbiological analysis	Target microorganisms	Reference
Tumeric	<i>Curcuma longa</i>	Ethanol	Agar well	<i>Staphylococcus epidemidis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus hirae</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Geobacillus stearothermophilis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> ,	Dhiman et al. (2016)
Ginger	<i>Zingiber officinale</i>	methanol	diffusion method	Gram-negative bacteria: <i>Serratia</i> sp.	
Wild mint	<i>Mentha arvensis</i>	acetone	Radial growth inhibition	Gram-positive bacteria: <i>Bacillus cereus</i>	Shan et al. (2007)
Ashwagandha	<i>Withania somnifera</i>	water		Yeasts: <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	
Indian snakeroot	<i>Rauvolfia serpentina</i>	Methanol/water (80/20 v/v)	Agar well diffusion method	Molds: <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Penicillium atrinum</i>	
Amla	<i>Emblica officinalis</i>			Gram-negative bacteria: <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella anatum</i>	
Arjuna	<i>Terminalia arjuna</i>	Gram-positive bacteria: <i>Bacillus cereus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> ,			
Centella	<i>Centella asiatica</i>				
Caraway	<i>Carum carvi</i>				
Cinnamon	<i>Cinnamomum cassia</i>				
Cinnamon	<i>Cinnamomum burmannii</i>				
Coriander	<i>Coriandrum sativum</i>				
Cumin	<i>Cuminum cyminum</i>				
Clove	<i>Eugenia caryophyllata</i>				
Star anise	<i>Illicium verum</i>				
Bay	<i>Laurus nobilis</i>				
Mint	<i>Mentha canadensis</i>				
Nutmeg	<i>Myristica fragrans</i>				
Sweet basil	<i>Ocimum basilicum</i>				
Oregano	<i>Origanum vulgare</i>				
Parsley	<i>Petroselinum crispum</i>				
Green peppercorn	<i>Piper nigrum</i>				
Black pepper	<i>Piper nigrum</i>				
White pepper	<i>Piper nigrum</i>				
Rosemary	<i>Rosmarinus officinalis</i>				
Sage	<i>Salvia officinalis</i>				
Thyme	<i>Thymus vulgaris</i>				
Chinese prickly ash	<i>Zanthoxylum bungeanum</i>				
Betelnut	<i>Areca catechu</i>				
Yinchenhao	<i>Artemisia capillaris</i>				
Qinghao	<i>Artemisia caruifolia</i>				
Huangqi	<i>Astragalus mongholicus</i>				
Chaihu	<i>Bupleurum scorzonerifolium</i>				
Lingxiaohua	<i>Campsis radicans</i>				
Cassia	<i>Cassia auriculata</i>				
Juhua	<i>Chrysanthemum morifolium</i>				
Shanyu	<i>Cornus officinalis</i>				
Jinqiaomai	<i>Fagopyrum cymosum</i>				
Yuxingcao	<i>Houttuynia cordata</i>				
Xuanfuhua	<i>Inula britannica</i>				
Jinyinhua	<i>Lonicera japonica</i>				
Guanzhong	<i>Matteuccia struthiopteris</i>				
Cow-itch plant	<i>Mucuna pruriens</i>				
Box myrtle	<i>Myrica nagi</i>				
Huangbo	<i>Phellodendron murense</i>				
Huzhang	<i>Polygonum uspidatum</i>				
Heshouwu	<i>Polygonum multiflorum</i>				
Xiaku	<i>Prunella vulgaris</i>				
Shiliupi	<i>Punica granatum</i>				
-	<i>Rhus succedanea</i>				
Diyu	<i>Sanguisorba officinalis</i>				
Huangqin	<i>Scutellaria baicalensis</i>				
Belliric myrobalan	<i>Terminalia bellirica</i>				
Diding	<i>Viola yedoensis</i>				
Great burnet	<i>Sanguisorba ofinalis</i>	Ethanol/water (70/30 v/v)	Oxford cup method microdilution method	Gram-negative bacteria: <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella Typhimurium</i> Gram-positive bacteria: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Zhu et al. (2019)
Clove	<i>Syzygium aromaticum</i>	Water	Agar well diffusion method	Gram-negative bacteria: <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Shewanella putrifaciens</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>	Radha Krishnan et al. (2014)
Cinnamon	<i>Cinnamomum cassia</i>		Broth microdilution method		
Oregano	<i>Origanum vulgare</i>				
Mustard	<i>Brassica nigra</i>				

Plant material		Extraction solvent	Method of microbiological analysis	Target microorganisms	Reference
Common name	Scientific name				
Walnut leaves	<i>Juglans regia</i>	Water	Agar well diffusion method	Gram-positive bacteria: <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , Gram-negative bacteria: <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Pereira, Oliveira, et al. (2007)
Grape leaves	<i>Vitis vinifera</i> (white varieties: <i>Marastina</i> , <i>Posip</i> ; red varieties: <i>Lasin</i> , <i>Merlot</i> , <i>Syrah</i> , <i>Vranac</i>)	Ethanol/water (80/20 v/v)	Broth microdilution method	Gram-positive bacteria: <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> Yeasts: <i>Candida albicans</i> , <i>Candida neoformans</i> Gram-negative bacteria: <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella Infantis</i> , <i>Campylobacter jejuni</i>	Katalinic et al. (2013)
Olive leaves	<i>Olea europaea</i>	Ethanol/water (80/20 v/v)	Broth microdilution method	Gram-negative bacteria: <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Salmonella</i> Enteritidis Gram-positive bacteria: <i>Listeria monocytogenes</i> ,	Liu, McKeever, and Malik (2017)

Da queste tabelle, è possibile evincere che le tecniche di estrazione (principalmente basate su miscele idro-alcoliche) e le condizioni di valutazione dell'inibizione microbica sono molto differenziate, rendendo difficile la valutazione comparativa dei diversi estratti botanici. Sembra comunque comprovata l'azione inibitoria (se non battericida, in alcuni casi) di alcune di queste matrici.

Gli studi, come riportato da Gutierrez Del Rio *et al.* (2018), si sono inoltre rivolti a individuare le singole molecole o classi molecolari coinvolte in queste azioni.

I principali responsabili di questa azione sono i composti fenolici come acidi fenolici (acido gallico, proto catecuico, acido caffeico e rosmarinico), diterpeni (carnosolo e acido carnosico), flavonoidi (quercitina, catechina, apigenina, canferolo, naringenina e speretina) e componenti degli oli essenziali di natura terpenica (eugenolo, carvacrolo, timolo e mentolo) e tiolica (allincina). Questi composti agiscono come donatori di protoni, interrompendo le reazioni a catena, chelando metalli come ferro e rame necessari come cofattori nelle reazioni ossidative. Per poter ridurre le quantità di spezia da aggiungere alle preparazioni, è possibile concentrare queste sostanze, preparando degli estratti a partire dalla parte di pianta che ne contiene una maggiore quantità (definita come "droga ufficiale" = parte della pianta contenente i principi attivi di interesse, ad oggi termine sostituito con "bocanicals"), ponendo sempre attenzione a non apportare delle modifiche di tipo negativo al prodotto finale dal punto di vista organolettico.

Tra le fonti alternative studiate si può prendere l'esempio del melograno, che ha permesso di ottenere estratti ricchi in composti polifenolici antimicrobici, oltre che in antociani che hanno presentato un impatto positivo anche sul colore del prodotto finito (Howell *et al.* 2013). La strategia in questo caso permette di affiancare le proprietà microbiostatiche a quelle coloranti, due aspetti tipici anche di nitriti/nitrati.

Altre fonti vegetali che non rientrano tra le spezie che si possono citare sono i vinaccioli e le vinacce, il the verde, i frumenti pigmentati (Shah *et al.* 2014). Infine Pena-Perez *et al.* (2017) hanno individuato una matrice alternativa in alghe e microalghe, da cui hanno ottenuto estratti attivi ricchi in polifenoli (in particolare rutina, quercetina e kaemferolo). L'utilizzo delle alghe tal quale resta chiaramente critico, in particolare per il forte impatto a livello organolettico, non compatibile con i salumi, oggetto di questo progetto di ricerca.

Infine, per quanto riguarda gli oli essenziali, diverse sono le loro applicazioni, sia nel loro uso come tali (Pateiro *et al.*, 2021), sia in combinazione con i nitriti (Rezaei *et al.* 2020). Molti degli oli essenziali testati sono quelli derivanti dalle spezie già citate (chiodi di garofano, noce moscata, etc.), ma si possono avere anche soluzioni alternative per esempio con l'olio essenziale di *Citrus sinensis* o con quello di *Helychrisum italicum* (che presenta attività sia sui batteri, sia sulle muffe).

In conclusione, rispetto alla letteratura analizzata, si possono evidenziare i seguenti aspetti e le seguenti vie percorribili:

- a) *l'utilizzo di estratti vegetali naturali potrebbe aprire alla possibilità di ottenere prodotti a cui attribuire valenza di tipo "nutraceutico" per il contenuto di ingredienti ad azione potenzialmente benefica sull'organismo;*
- b) *non esiste una soluzione universale per i diversi patogeni, in quanto ad esempio L. monocytogenes e E. coli richiedono soluzioni diverse rispetto a C. botulinum;*
- c) *non è da trascurare un effetto combinato di oli essenziali od estratti vegetali con il nitrito e quindi se non la completa sostituzione di nitrati o nitriti, si può prevedere comunque un risultato positivo nella loro netta riduzione, sfruttando combinazioni sinergiche con gli estratti naturali.*

BIBLIOGRAFIA e SITOGRAFIA

- Alahakoon A.U., Jayasena D.D., Ramachandra S. et al. 2015 Alternatives to nitrite in processed meat: Up to date *Trends in Food Science & Technology* 45, 37-49
- Alais C., Linden G. 1991 Food Biochemistry editor Ellis Horwood 7, 95 – 103
- Bertolini A., Garavaldi A., Musi V., Lasagni P., Magnani U. 2020 Qualità sensoriale di salami di tipo felino www.crupa.it/media/documents/crupa_blog/Articolo_Salami_REV_14_10_2020
- CREA <https://www.crea.gov.it/web/alimenti-e-nutrizione/-/valore-nutrizionale-dei-salumi-italiani>
- Cui H., Gabriel A.A., Nakano H. 2010 Antimicrobial efficacies of plant extracts and sodium nitrite against *Clostridium botulinum*. *Food Control*, 21, 1030-1036
- Daglia M 2012 Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 174-181.
- Efenberger-Szmechtyk M., Nowak A., Czyzowska A. 2021. Plant extracts rich in polyphenols: antibacterial agents and natural preservatives for meat and meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61, 149-178.
- EFSA 2017 La valutazione del rischio spiegata dall'EFSA. Nitriti e nitrati aggiunti agli alimenti https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/nitrates-nitrites-170614_it.pdf
- Ferysiuk K, Wójciak K. M. 2020 Reduction of Nitrite in Meat Products Through the Application of Various Plant-Based Ingredients *Antioxidants* 9, 711
- Gutierrez-del-Rio I., Fernandez J., Lombo F. 2018 Plant nutraceuticals as antimicrobial agents in food preservation: terpenoids, polyphenols and thiols. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52, 309-315
- Howell A.B., D'Souza D.H. 2013 The pomegranate: effects on bacteria and viruses that influence human health. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, art. ID 606212
- Martuscelli M. (2005-2007) Carni crude fermentate e stagionate: salami, Università Teramo
- Ministero della Salute DGISAN 0036275 – P del 14/09/2017
- Pateiro M., Munekata P.E.S., Sant'Ana A.S., Dominguez R., Rodriguez-Lazaro D., Lorenzo J.M. 2021 Application of essential oils as antimicrobial agents against spoilage and pathogenic microorganisms in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 337, 108966
- Phytome, co-ordinator prof Theo M.C.M. de Kock, 2012-2015 Phytochemicals to reduce nitrite in meat products
- Regolamento CE 1333/2008 e s.m.i. <https://eur-lex.europa.eu/homepage.html>
- Regolamento UE 1169/2011

- Rezaei M.A., Razavilar V., Anvar A., Mashak Z. 2020 Modeling the effects of *Citrus sinensis* essential oil and nitrite on growth probability of *Clostridium botulinum* type A in broth media. *Current Nutritional and Food Science*, 16, 1064-1071
- Roila R., Branciari R., Staccini B., Ranucci D., Miraglia D., Altissimi M.S., Mercuri M.L., Haouet N.M. 2018 Contribution of vegetables and cured meat to dietary nitrate and nitrite intake in Italian population: Safe level for cured meat and controversial role of vegetables. *Italian Journal Food Safety* 26 7(3): 7692
- Shah M.A., Don Bosco S.J., Mir S.A. 2014 Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat Science* 98: 21-33
- Sindelar J. J., Milkowski, A.L. 2011 Sodium nitrite in processed meat and poultry meats: A review of curing and examining the risk/benefit of its use. *AMSA WHITE PAPER SERIES*, Illinois, USA American Meat Science Association
- Szymandera-Buszka K. , Waszkowiak K., Jędrusek-Golińska A., Hęć M. 2020 Sensory Analysis in Assessing the Possibility of Using Ethanol Extracts of Spices to Develop New Meat Products *Foods* 2020, 9, 209; doi:10.3390/foods9020209
- Tomović V., Jokanović M., Šojić B., Škaljac S., Ivić M 2017 Plants as natural antioxidants for meat products *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 85 012030
- UNI/PdR 57:2019 Linee guida per Prodotti alimentari e bevande senza additivi
- Wilkstrom F., Verghese K., Auras R., et al. 2018 Packaging Strategies That Save Food: A Research Agenda for 2030, *Journal of Industrial Ecology* 23(3): 532-540
- Wójciak K. M., Stasiak D.M., Kęska 2019 The Influence of Different Levels of Sodium Nitrite on the Safety, Oxidative Stability, and Color of Minced Roasted Beef *Sustainability* 11,3795
- Zeppa G. 2013 Appunti di tecnologia dei salumi
<https://www.istitutoagrariosartor.edu.it/.../uploads/2013/11/salumi.pdf>