

Relazione redatta dalla Dott.ssa Rosaria Francolino selezionata mediante bando di concorso indetto con Decreto Rep. n. 930/2021 Prot. n. 333091 del 10/11/2021. Responsabile Scientifico: Prof.ssa Laura DE MARTINO. In merito al progetto “**Valorizzazione dei FORMaggi irpini da latte di alta qualità attraverso l’aumento della shelf-LIFE e la tracciabilità del prodotto - FORMLIFE**”. Attività svolta a partire dal 16/12/2021 al 15/03/2022 continuativa dell’attività svolta dal Dott. Giuseppe Amato dal 01/07/21 al 30/09/2021, finalizzata all’impiego di specie officinali nella formulazione di formaggi al fine di aumentarne la conservazione nonché la gradevolezza del sapore.

## Relazione Progetto FORMLIFE

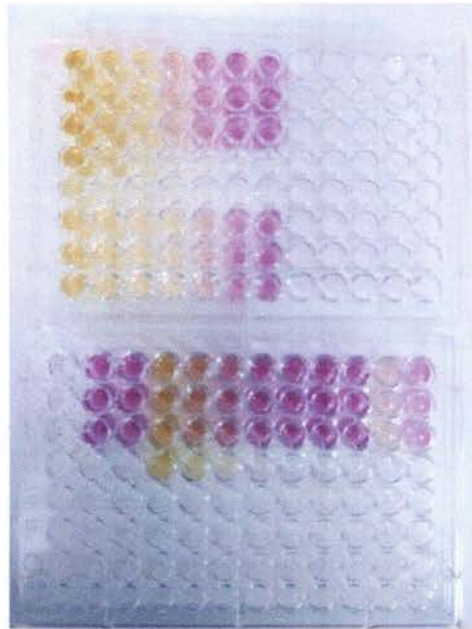
### Attività Antiossidante

L’attività antiossidante degli oli essenziali e degli estratti idroalcolici di *Mentha pulegium*, *Rosmarinus officinalis* e *Foeniculum vulgare* è stata studiata principalmente con due tipi di saggi: il saggio del DPPH e il saggio del FRAP. Inoltre, per gli estratti idroalcolici è stata determinata la quantità di polifenoli totali usando il reattivo di Folin-Ciocalteu.

### DPPH

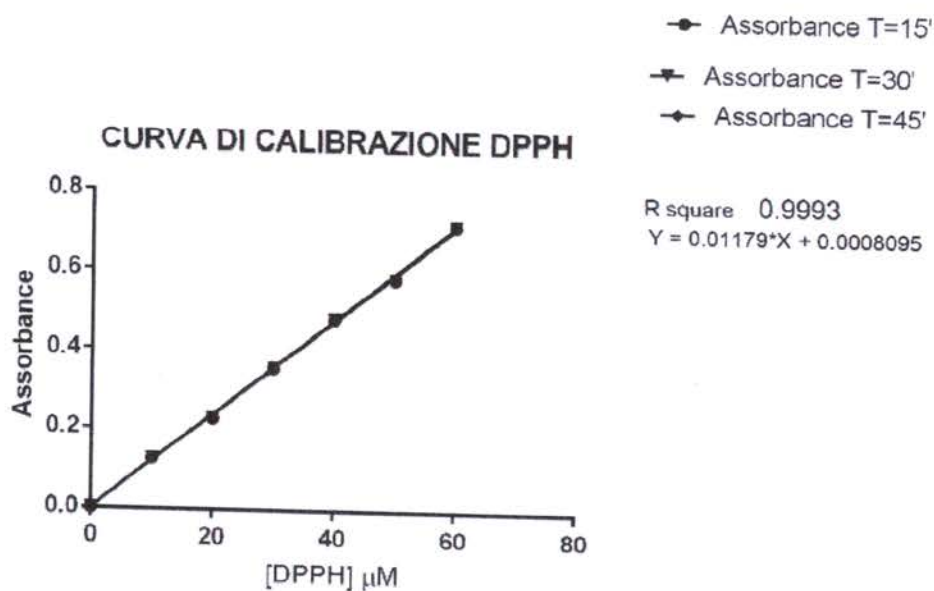
Il DPPH è un radicale libero stabile che in metanolo assorbe a 515nm (color viola); in presenza di un antiossidante anti-radicalico in grado di donare un atomo di idrogeno (H) si trasforma nella molecola DPPH-H che non assorbe a 515 nm (color giallo).

In particolare, la soluzione di DPPH (60 $\mu$ M) è stata preparata quotidianamente in metanolo per HPLC, a riparo della luce, pesando 2,4 mg sciolti in 100 mL di metanolo. Nella valutazione dell’attività antiossidante è stato usato come controllo negativo la vitamina C. Le prove sono state effettuate in piastre multiwell di polisterene da 96 pozzetti, come mostrato in figura.



Sono state testate le seguenti dosi per gli oli essenziali: 4 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,05 mg/mL, 0,025 mg/mL e 0,0125 mg/mL; mentre per gli estratti idroalcolici sono state testate le dosi 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,05mg/mL, 0,025 e 0,0125 mg/mL.

I dati sono stati analizzati sulla base della curva di calibrazione del DPPH ottenuta effettuando letture spettrofotometriche a 515 nm delle seguenti concentrazioni: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60  $\mu$ M al tempo 15 min, 30 min e 45 min.

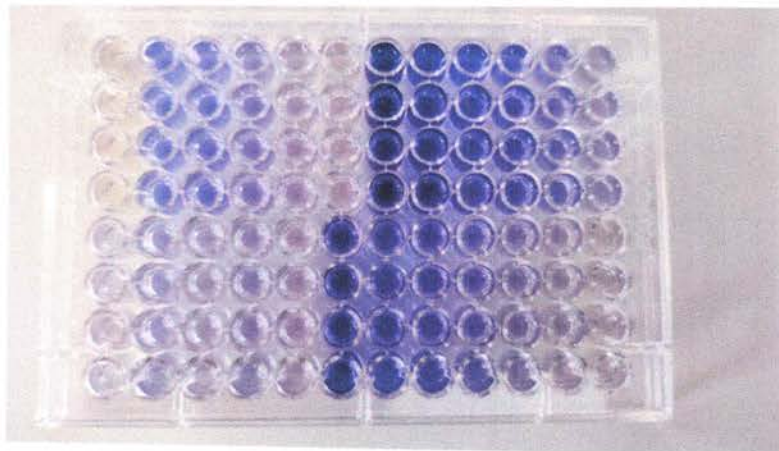


Dai dati ottenuti si evince che gli oli essenziali non hanno una significativa attività antiossidante, infatti, mostrano un  $IC_{50} > 4 \text{ mg/mL}$ .

Gli estratti idroalcolici, invece, hanno una maggiore attività antiossidante. In particolare, gli estratti di menta e rosmarino presentano una buona attività con un  $IC_{50}$  di circa  $16 \text{ }\mu\text{g/mL}$  (Tabella riportata in seguito).

## FRAP

Il saggio FRAP, acronimo di “Ferric Ion Reducing Antioxidant Power”, si basa sulla capacità dei composti antiossidanti di ridurre il complesso di  $[\text{Fe (III)} \square (\text{TPTZ})^2 ]^{3+}$  a  $[\text{Fe (II)} \square (\text{TPTZ})^2 ]^{2+}$  a pH acido; il complesso ridotto è colorato (blu navy).



Il FRAP è stato preparato giornalmente ed è costituito da:

- 10 mL di 23 mM di buffer acetato (pH 3,6),
- 1 mL di 10 mM di tripiridil triazina (TPTZ) in 400 mM di HCl
- 1 mL di 20 mM di  $\text{FeCl}_3$

I tre componenti sono miscelati in un rapporto 10:1:1.

Al fine di poter analizzare i dati, è stata costruita una retta di calibrazione utilizzando come standard il solfato ferroso eptaidrato,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : dello standard sono state testate diverse concentrazioni in un range che va da 1 mM a 0,1 mM.

Sono state analizzate dosi di estratti e di oli essenziali in un range compreso tra 2,5 mg/mL e 0,039 mg/mL.



Il saggio è stato effettuato in multiwell da 96 pozzetti. Gli standard utilizzati come antiossidanti di riferimento sono stati la vitamina C e il Trolox.

La miscela di reazione è stata incubata a 37°C per 30 minuti, successivamente è stata eseguita la lettura spettrofotometrica a 593nm.

L'analisi dell'attività antiossidante mediante il saggio FRAP rivela che gli oli essenziali ottenuti non presentano una significativa attività rispetto allo standard di riferimento. Al contrario, gli estratti testati mostrano una buona attività antiossidante, in particolare, la Menta risulta la più attiva.

Tali dati confermano i risultati ottenuti mediante il saggio del DPPH.

Nella tabella sono inseriti i dati riferiti ai due saggi antiossidanti: DPPH e FRAP.

		<i>Mentha pulegium</i>		<i>Rosmarinus officinalis L.</i>		<i>Foeniculum vulgare Mill.</i>		Vit. C	
		Estratto	Olio	Estratto	Olio	Estratto	Olio		
<b>FRAP</b>	mgFe <sup>2+</sup> equivalenti/g (MEDIA ±DS)	272,36 ±46,02	21,54 ±6,93	125,68 ±25,02	8,09 ±3,22	75,66 ±17,48	13,80 ±5,36	977,18 ±49,66	
	<b>DPPH</b>	EC50 dopo 15 minuti	20,84 ±2,16 µg/ml	>4 mg/ml	20,36 ±2,04 µg/ml	>4 mg/ml	55,63 ±14,51 µg/ml	>4 mg/ml	3,02 ±0,35 µg/ml
		EC50 dopo 30 minuti	17,51 ±2,16 µg/ml	>4 mg/ml	18,91 ±1,86 µg/ml	>4 mg/ml	50,24 ±11,27 µg/ml	>4 mg/ml	3,02 ±0,35 µg/ml
EC50 dopo 45 minuti		16,13 ±2,03 µg/ml	>4 mg/ml	17,58 ±1,78 µg/ml	>4 mg/ml	45,02 ±9,19 µg/ml	>4 mg/ml	3,02 ±0,35 µg/ml	

### Determinazioni dei Polifenoli

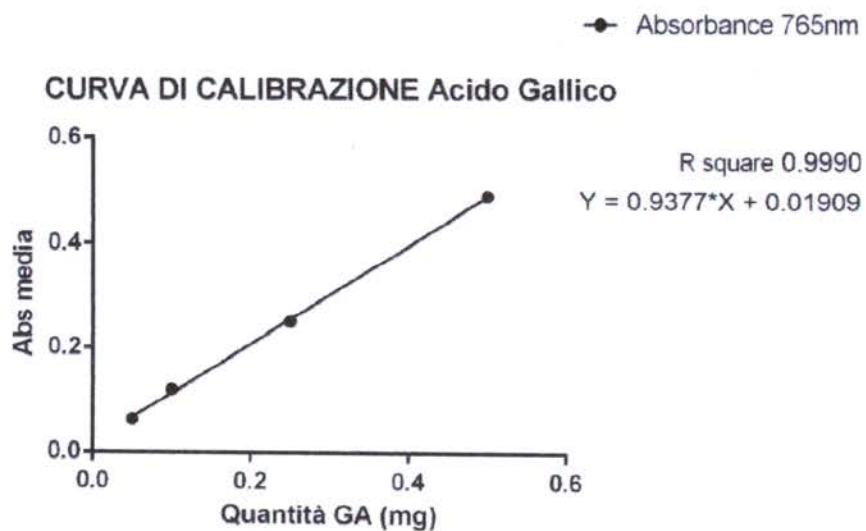
La determinazione dei polifenoli è stata effettuata per via spettrofotometrica a 765nm utilizzando il reattivo di Folin-Ciocalteu, un reattivo costituito da una miscela di ossidi di tungsteno e molibdeno.

Il metodo si basa su una reazione di ossido-riduzione del reattivo Folin-Ciocalteu.

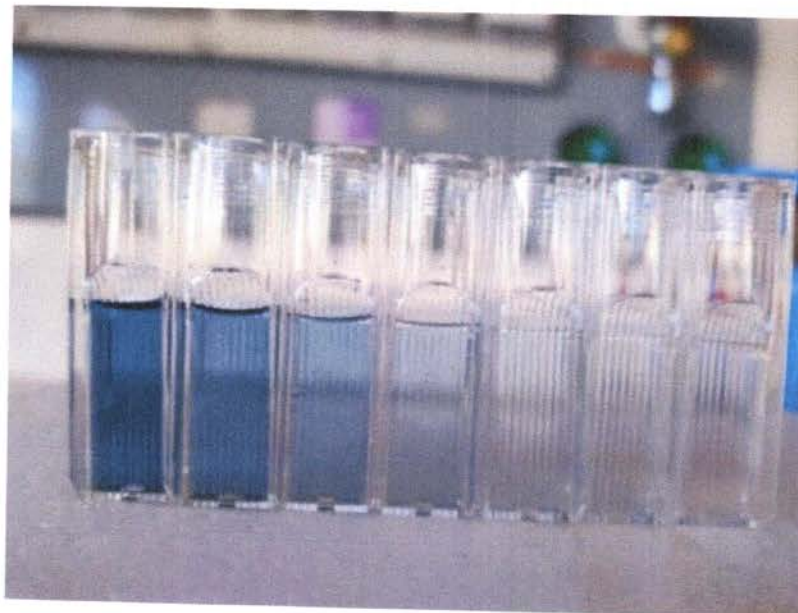
Per la realizzazione di questo saggio è stata preparata una soluzione di sodio carbonato (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), sciogliendo 200 g di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 800 mL di acqua e portando ad ebollizione. Dopo raffreddamento, è stato aggiunto qualche cristallo di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e lasciata riposare per 24h a temperatura ambiente. Successivamente la

soluzione è stata filtrata mediante un filtro di carta ed è stata portata al volume finale di un 1L, aggiungendo altra acqua.

L'acido gallico (GA) viene utilizzato come standard di riferimento per la costruzione di una retta di calibrazione, utilizzandone diverse concentrazioni (0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,1 mg/mL e 0,05 mg/mL). I risultati ottenuti dai test sui campioni vengono interpolati attraverso l'equazione della retta ed espressi come equivalenti di acido gallico per grammo di estratto (GAE/g).



Il saggio è stato eseguito in cuvette di polistirene, come in figura.



Stiamo analizzando i risultati.

## Attività antibatterica

L'attività antibatterica degli oli essenziali e degli estratti idroalcolici è stata studiata *in vitro*, mediante il test dell'alone di inibizione su piastra. Sono state testate le attività antibatteriche su batteri Gram negativi:

- *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606),
- *Pseudomonas aeruginosa* (DSM 50071)
- *Escherichia coli* (DSM 8579)

e batteri Gram positivi:

- *Listeria monocitogenes* (ATCC 7644)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Gli estratti non presentano una significativa attività antibatterica, ad eccezione dell'estratto di Menta e Finocchio che presentano, a 40 µg, un'azione antibatterica su *Staphylococcus aureus* con formazione dell'alone di inibizione di 6/7mm (la Tetracilina 7 µg determina un alone di inibizione per questo stesso batterio di 7/8 mm).

Per l'olio di Finocchio e per quello di Rosmarino l'attività antibatterica è superiore a 50 µg. Invece, l'olio essenziale di Menta ha una leggera attività antibatterica superiore, compresa tra 30 e 50 µg, con la formazione di aloni di inibizione che raggiungono al massimo i 5 mm (vs *Staphylococcus aureus*).

I tre oli sono stati testati anche su due ceppi di *Lactobacillus*:

- *L. rhamnosus*
- *L. casei*

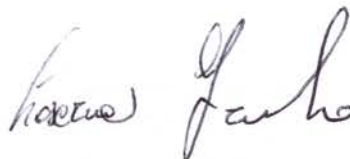
L'analisi ha evidenziato una leggera attività antibatterica (alone di inibizione di 6 mm con 30 mg vs *L. rhamnosus* e alone di 6.5 mm con 30 mg vs *L. casei*).

## Altri test

Sono in corso altri test, in particolare, gli estratti sono stati analizzati mediante LC-MS. Siamo in attesa dei risultati.

## Considerazioni finali

Il passo successivo sarà quello di utilizzare gli estratti e/o gli oli, che si sono dimostrati più attivi, sia come antiossidanti che come antibatterici, all'interno della formulazione di formaggi; facendo bene attenzione che non abbiamo, però, attività antibatterica su ceppi di *Lactobacillus* usati nella produzione degli stessi.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Laura De Martino'.

Il responsabile scientifico  
Laura De Martino