



SAPIENZA  
UNIVERSITÀ DI ROMA



Dipartimento di Ingegneria Chimica, Materiali & Ambiente  
Via Eudossiana 18, Roma (Italy)

# *Sviluppo di preparati a base di miele con attività antibatterica potenziata*

M. Fidaleo, R. Lavecchia, A. Zuorro

[antonio.zuorro@uniroma1.it](mailto:antonio.zuorro@uniroma1.it)

Roma, 21 gennaio 2022

## Obiettivo della ricerca

Sviluppo di miscele di mieli con elevata attività antibatterica nei confronti di batteri **Gram-positivi** e **Gram-negativi**, anche **antibiotico-resistenti**, a partire da quattro tipologie di miele precedentemente studiate

## Mieli studiati

- Metcalfa (Met)
- Abete (Ab)
- Eucalipto (Eu)
- Timo (Ti)

Miscele: **Met–Ab–Eu** e **Met–Ab–Ti**

## Metodologie utilizzate

Utilizzo del "**mixture design**" per la definizione delle miscele da testare e per l'analisi dei risultati

Misura dell'attività antibatterica, mediante **test di diffusione in agar**, dei diversi preparati nei confronti di:

1. *Escherichia coli* (ATCC 25922), Gram-positivo
2. *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), Gram-negativo
3. *Proteus mirabilis* (ATCC 25933)
4. *Staphylococcus epidermidis* meticillino-resistente (ATCC 25923)
5. *Staphylococcus aureus* meticillino- e oxacillino resistente (ATCC 25923)

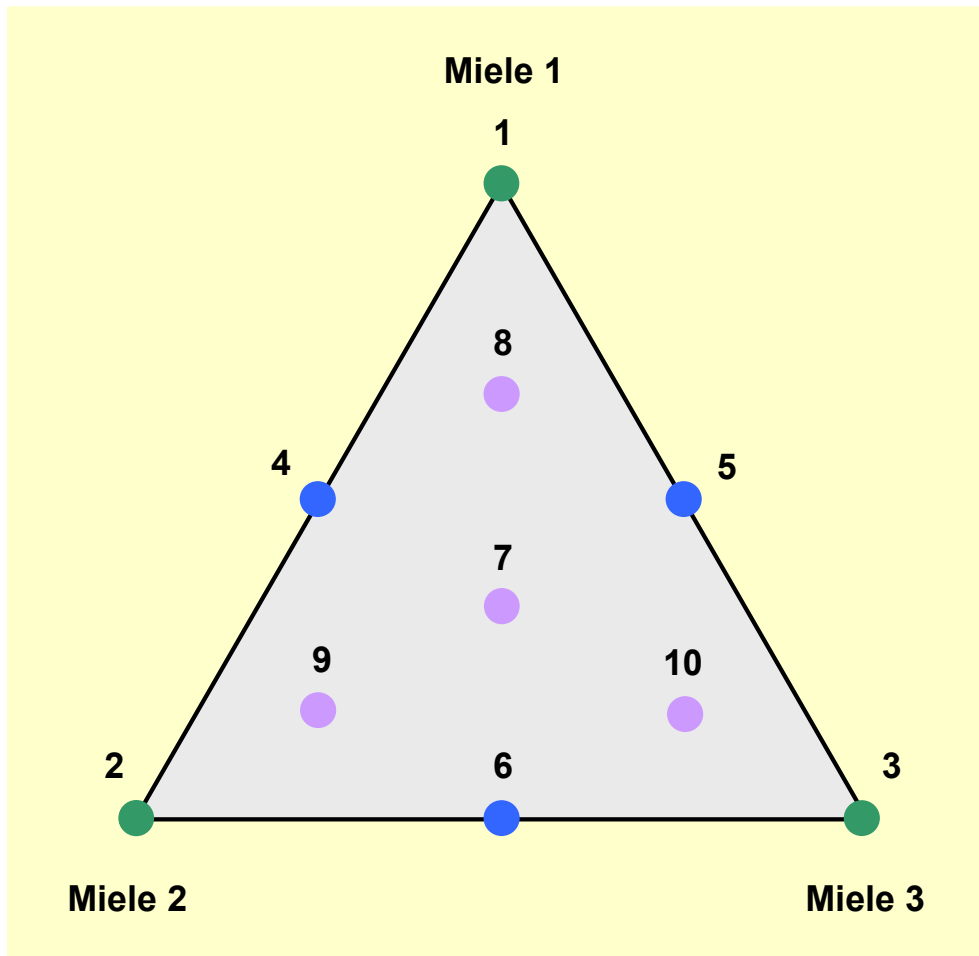
Prove sistematiche: 1, 2

Prove di validazione: 3, 4, 5

# Mixture Design

## Definizione dei sistemi da testare

Per ciascuna terna di mieli si considerano 10 sistemi  
(3 componenti puri + 3 miscele binarie + 4 ternarie)



	Composizione (% in peso)		
	Miele 1	Miele 2	Miele 3
1	100	0	0
2	0	100	0
3	0	0	100
4	50	50	0
5	50	0	50
6	0	50	50
7	33.3	33.3	33.3
8	66.6	16.7	16.7
9	16.7	66.7	16.7
10	16.7	16.7	66.7

# Risultati delle prove sistematiche di diffusione in agar

Diametro di inibizione (VM  $\pm$  DS)

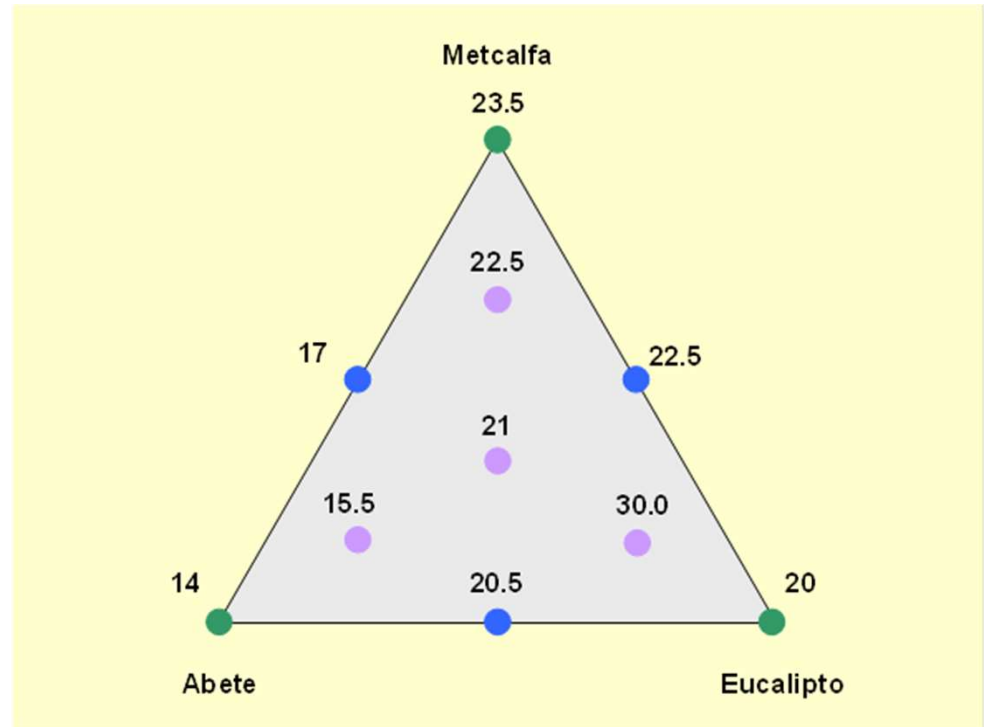
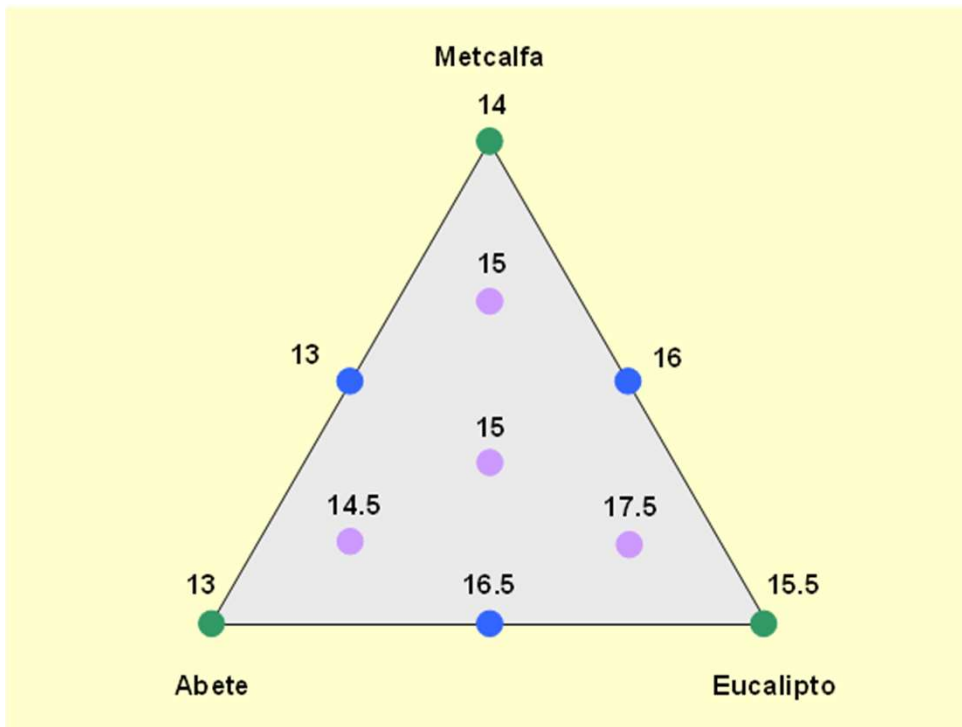
<b>SISTEMA</b>	<b>TIPO DI MIELE</b>	<b><i>E. coli</i> ATCC 25922</b>	<b><i>S. aureus</i> ATCC 25923</b>
E1	Metcalfa	14.0 $\pm$ 1.4	23.5 $\pm$ 0.7
E2	Abete	13.0 $\pm$ 1.4	14.0 $\pm$ 1.4
E3	Eucalipto	15.5 $\pm$ 0.7	20.0 $\pm$ 1.4
E4	Met-Ab 50:50	13.0 $\pm$ 0.0	17.0 $\pm$ 1.4
E5	Met-Eu 50:50	16.0 $\pm$ 0.0	22.5 $\pm$ 0.7
E6	Ab-Eu 50:50	16.5 $\pm$ 0.7	20.5 $\pm$ 0.7
E7	Met-Ab-Eu 1/3:1/3:1/3	15.0 $\pm$ 0.0	21.0 $\pm$ 0.0
E8	Met-Ab-Eu 2/3:1/6:1/6	15.0 $\pm$ 1.4	22.5 $\pm$ 0.7
E9	Met-Ab-Eu 1/6:2/3:1/6	14.5 $\pm$ 0.7	15.5 $\pm$ 0.7
E10	Met-Ab-Eu 1/6:1/6:2/3	17.5 $\pm$ 0.7	30.0 $\pm$ 1.4
T1	Metcalfa	14.0 $\pm$ 1.4	23.5 $\pm$ 0.7
T2	Abete	13.0 $\pm$ 1.4	14.0 $\pm$ 1.4
T3	Timo	18.0 $\pm$ 0.0	20.0 $\pm$ 1.4
T4	Met-Ab 50:50	13.0 $\pm$ 0.0	17.0 $\pm$ 1.4
T5	Met-Ti 50:50	18.0 $\pm$ 1.4	30.0 $\pm$ 1.4
T6	Ab-Ti 50:50	17.5 $\pm$ 0.7	17.0 $\pm$ 1.4
T7	Met-Ab-Ti 1/3:1/3:1/3	18.0 $\pm$ 0.0	21.5 $\pm$ 0.7
T8	Met-Ab-Ti 2/3:1/6:1/6	15.5 $\pm$ 0.7	24.0 $\pm$ 0.0
T9	Met-Ab-Ti 1/6:2/3:1/6	16.0 $\pm$ 0.0	24.5 $\pm$ 0.7
T10	Met-Ab-Ti 1/6:1/6:2/3	19.5 $\pm$ 0.7	28.5 $\pm$ 0.7

# Metcalfa – Abete – Eucalipto

Diametri degli aloni di inibizione

Ceppo batterico: *E. coli*

Ceppo batterico: *S. aureus*

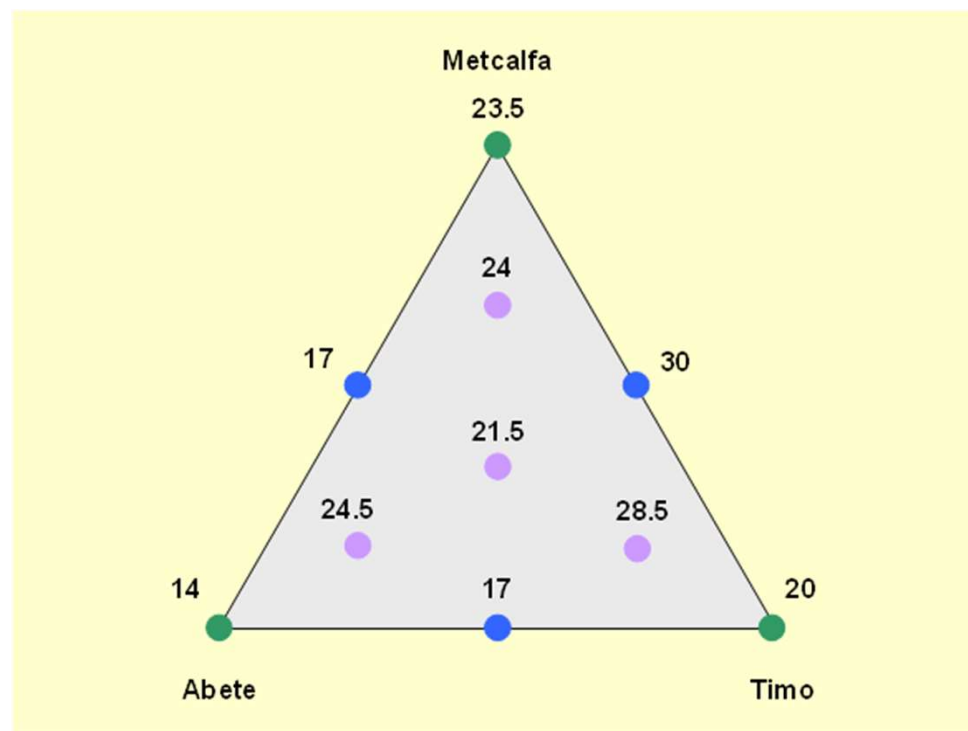
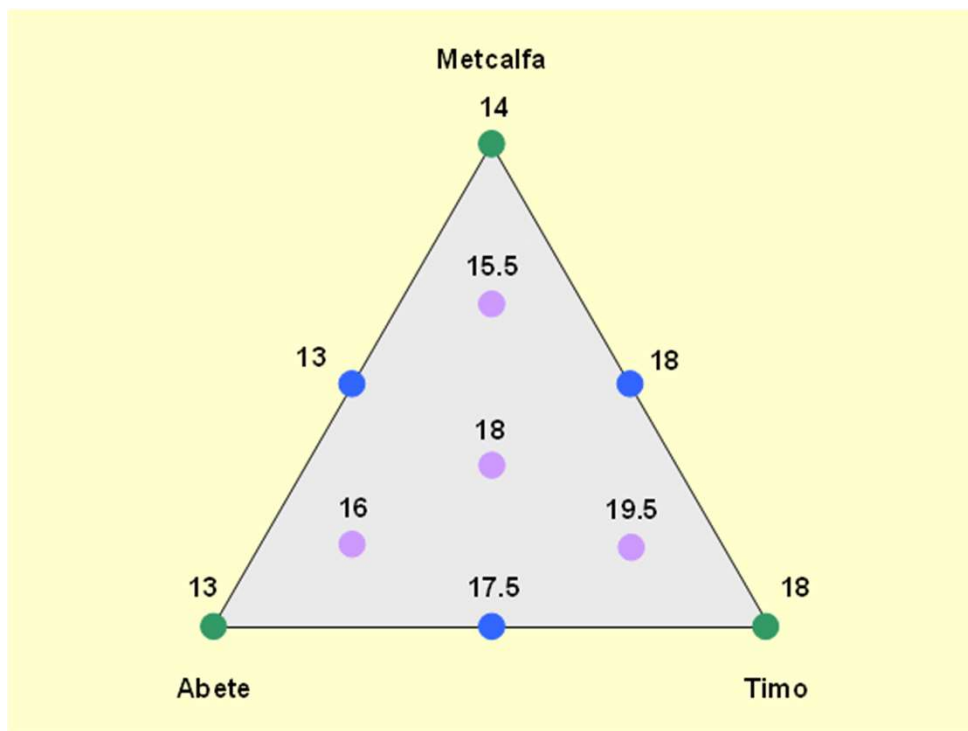


# Metcalfa – Abete – Timo

Diametri degli aloni di inibizione

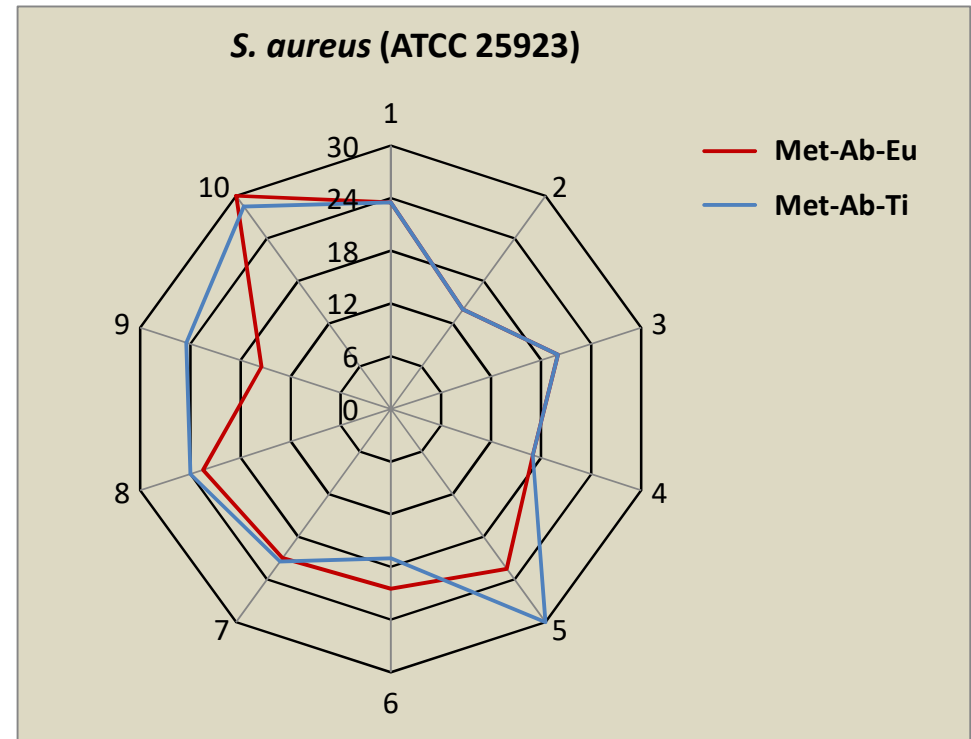
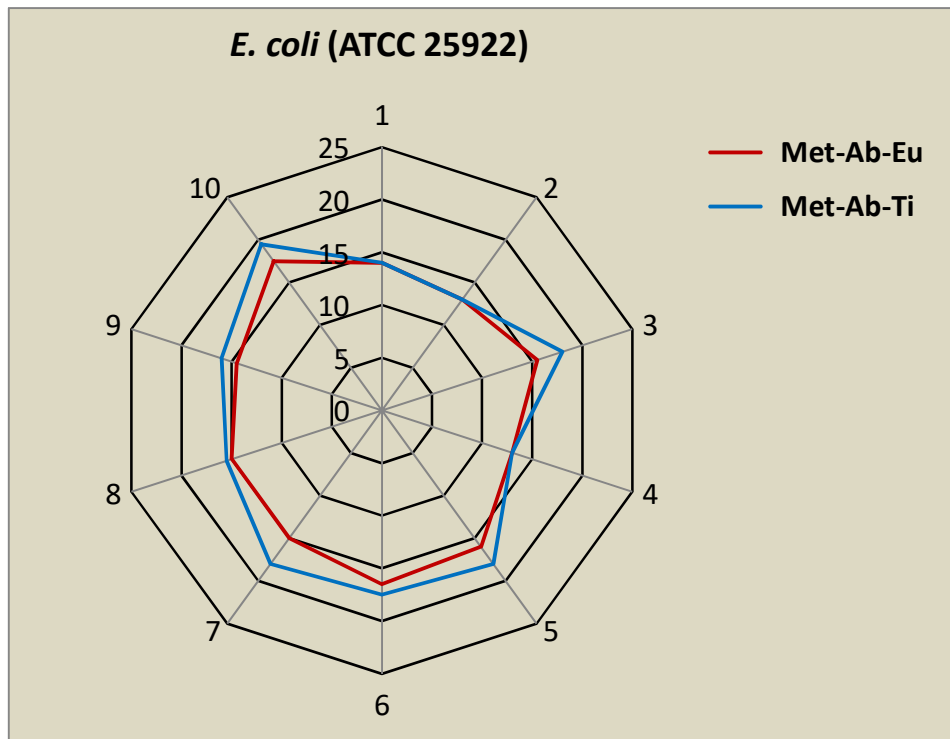
Ceppo batterico: *E. coli*

Ceppo batterico: *S. aureus*



# Attività antibatterica

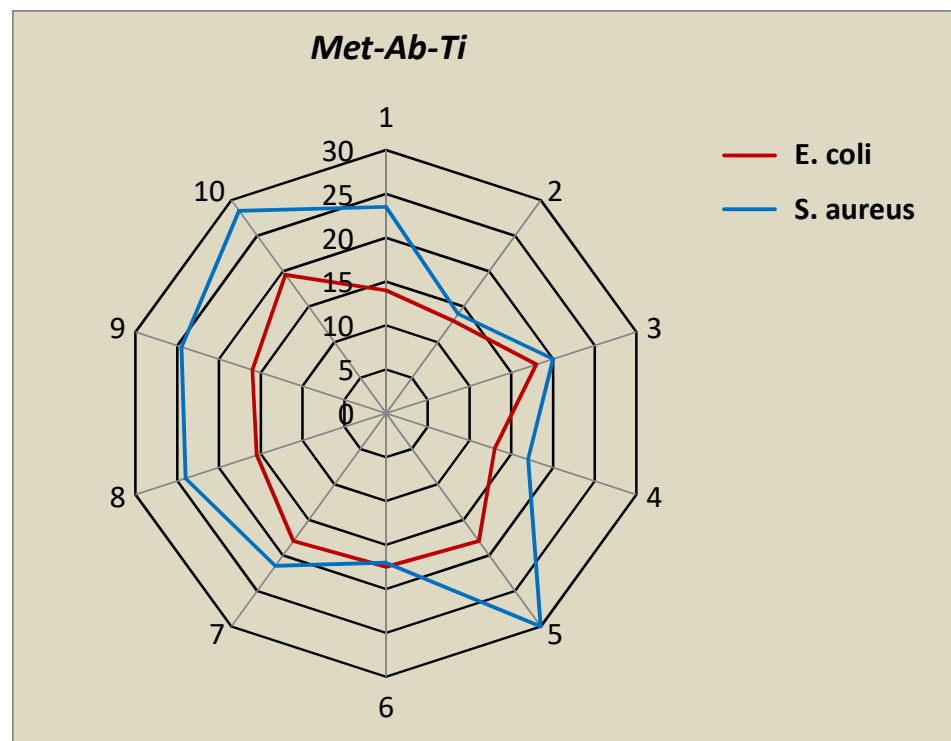
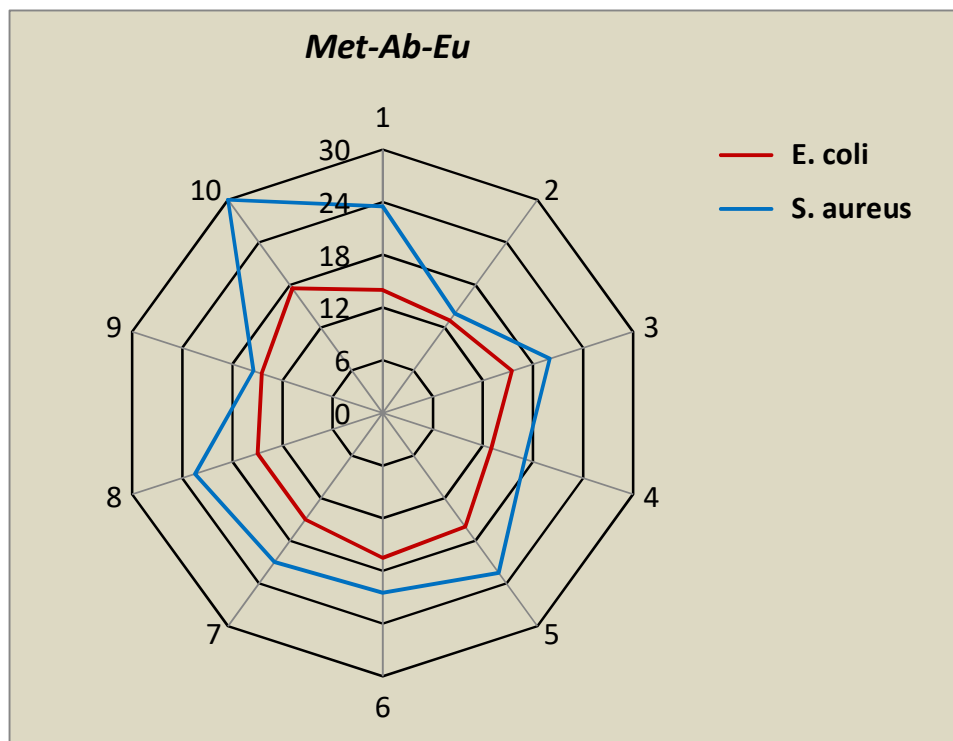
Confronto per specie batterica





# Attività antibatterica

Confronto per terna di mieli



# Analisi delle superfici di risposta

## Modello utilizzato e stima dei coefficienti

Modello cubico ridotto a 7 coefficienti

$$y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{123} x_1 x_2 x_3$$

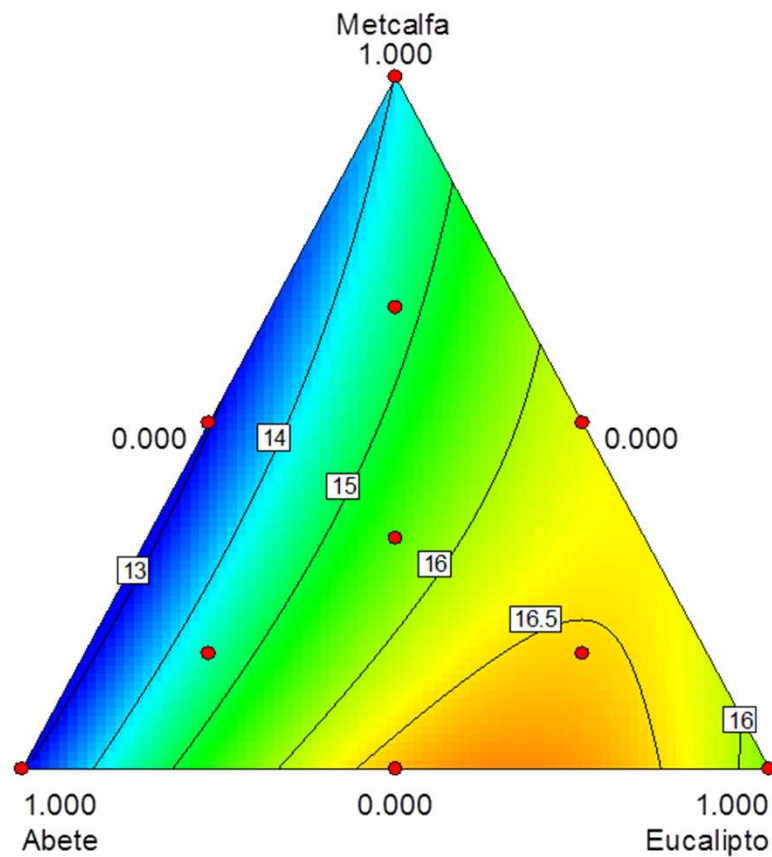
- y – Diametro alone di inibizione (mm)
- $x_i$  – Frazione ponderale dei mieli in miscela
- $\beta_i$  – Coefficienti di regressione singoli componenti
- $\beta_{ij}$  – Coefficienti di regressione miscele binarie
- $\beta_{123}$  – Coefficiente di regressione miscela ternaria

Coefficienti	Miscela Met-Ab-Eu		Miscela Met-Ab-Ti	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
$\beta_1$	14.02	23.31	13.81	22.66
$\beta_2$	12.93	12.95	13.09	15.35
$\beta_3$	15.75	21.85	18.13	20.71
$\beta_{12}$	-2.10	-9.49	-2.20	-5.98
$\beta_{13}$	5.54	6.33	7.89	32.75
$\beta_{23}$	9.36	15.60	8.43	4.11
$\beta_{123}$	-1.59	56.12	40.76	58.24

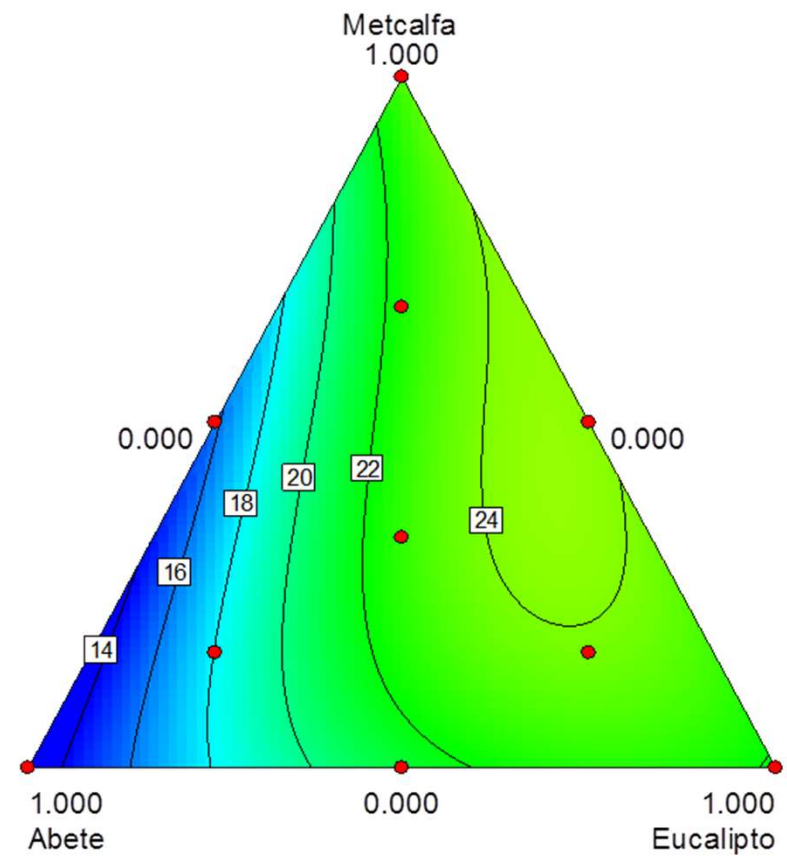
# Metcalfa – Abete – Eucalipto

## Contour Plots

Ceppo batterico: *E. coli*



Ceppo batterico: *S. aureus*



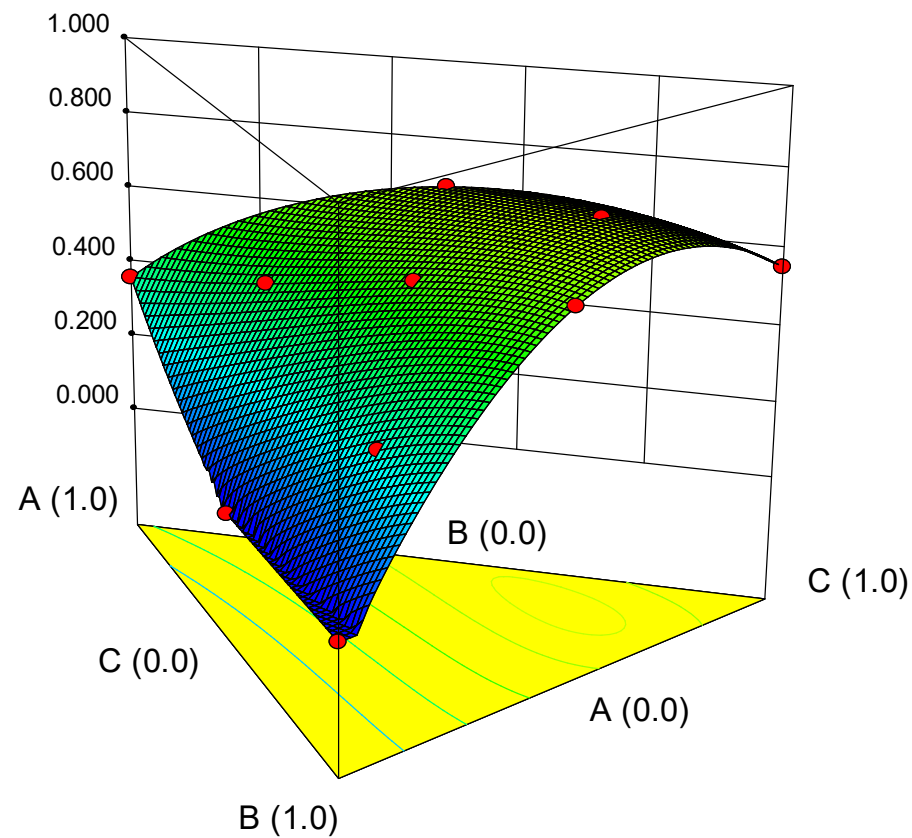
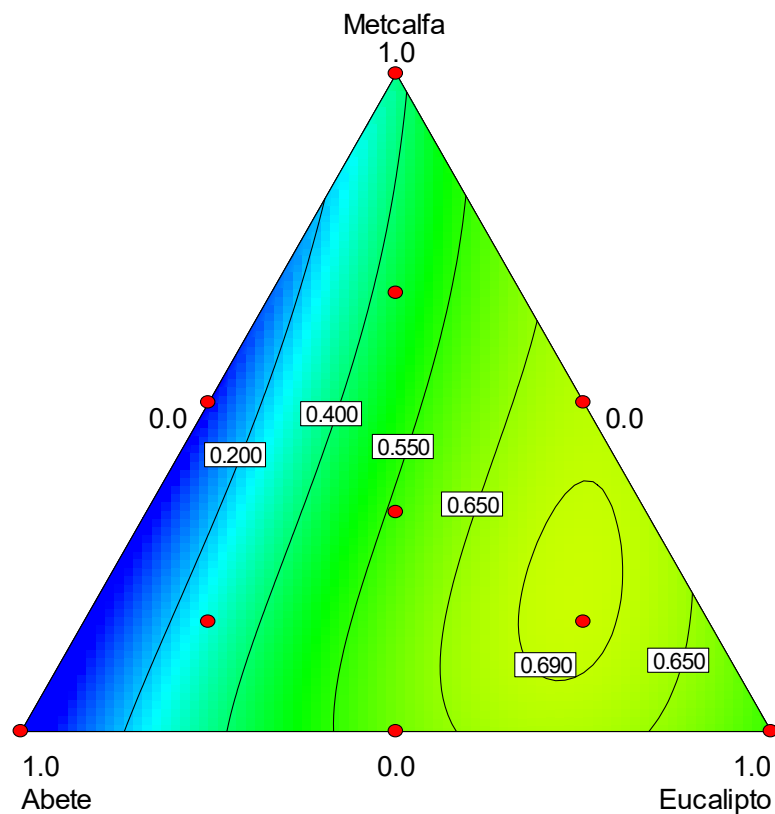
# Metcalfa – Abete – Eucalipto

## Desirability Function

**Soluzione ottimale** (Desirability: 0.698)

Met-Ab-Eu **20.9:16.2:62.9**

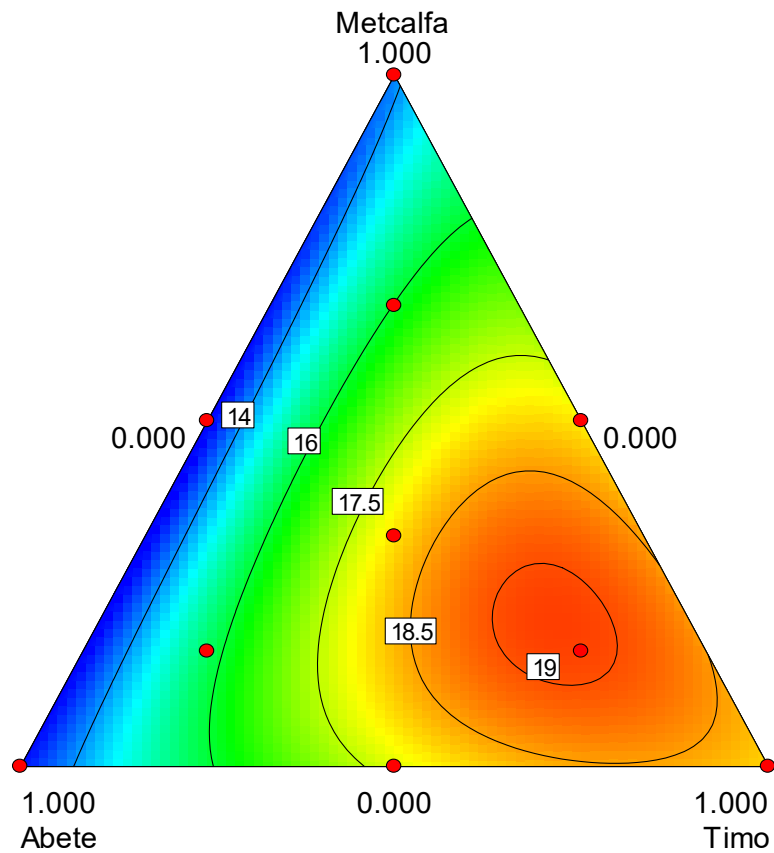
Attività *E.coli*: 16.5 - *S. aureus*: 24



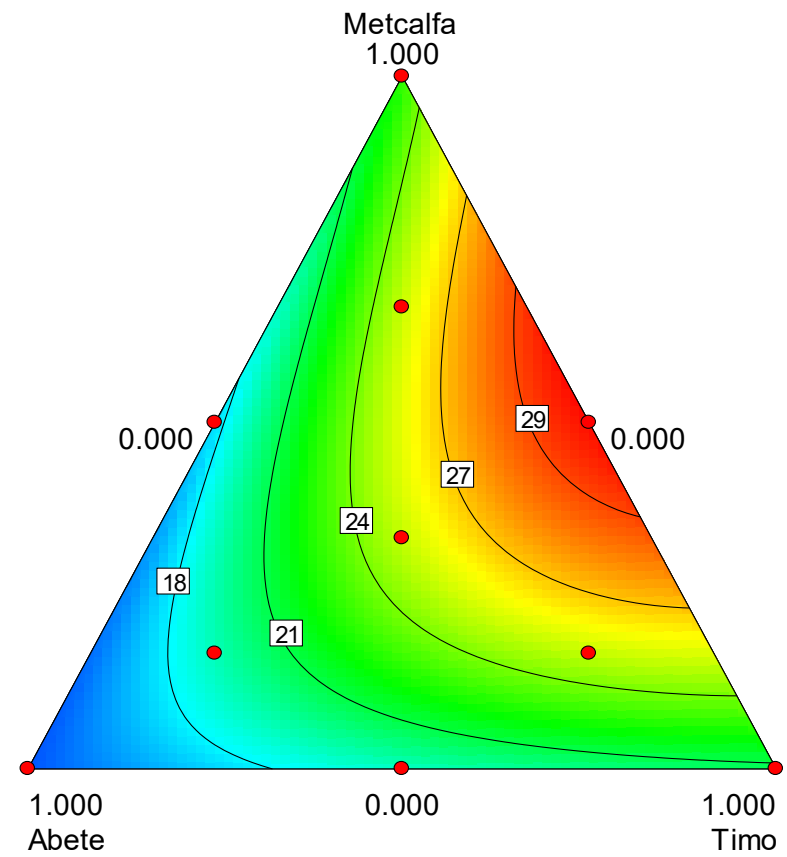
# Metcalfa – Abete – Timo

## Contour Plots

Ceppo batterico: *E. coli*



Ceppo batterico: *S. aureus*



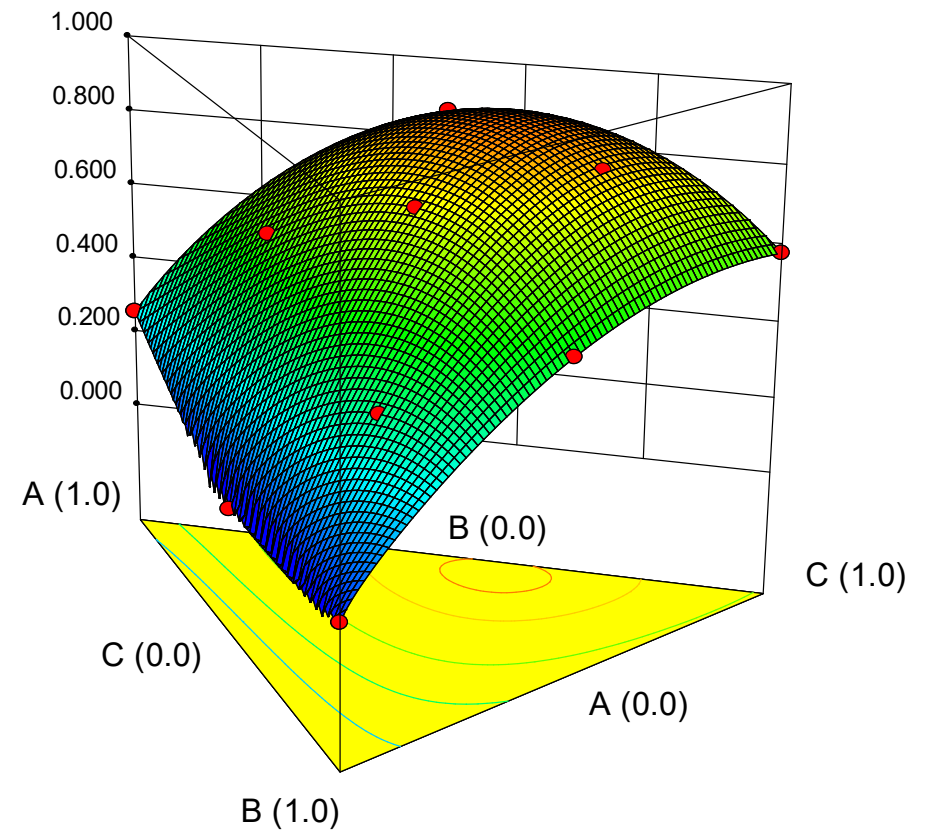
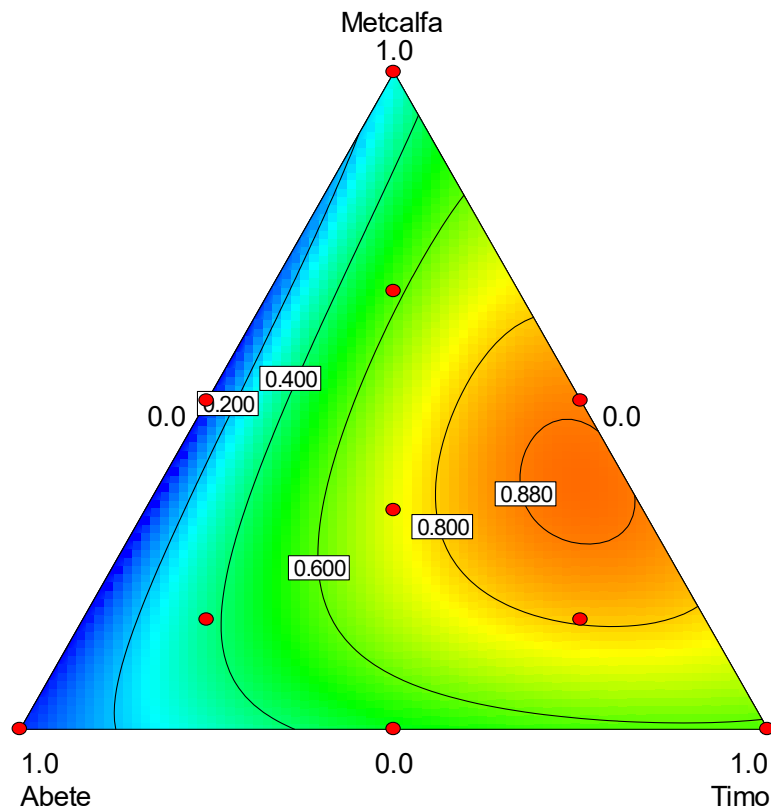
# Metcalfa – Abete – Timo

## Desirability Function

**Soluzione ottimale** (Desirability: 0.896)

Met-Ab-Ti **37.4:6.9:55.7**

Attività *E.coli*: 18.7 - *S. aureus*: 28.7



# Risultati delle prove di validazione

Diametro di inibizione (VM  $\pm$  DS)

<b>E7</b>	Met-Ab-Eu 1/3:1/3:1/3
<b>E8</b>	Met-Ab-Eu 2/3:1/6:1/6
<b>E9</b>	Met-Ab-Eu 1/6:2/3:1/6
<b>E10</b>	Met-Ab-Eu 1/6:1/6:2/3

<b>T7</b>	Met-Ab-Ti 1/3:1/3:1/3
<b>T8</b>	Met-Ab-Ti 2/3:1/6:1/6
<b>T9</b>	Met-Ab-Ti 1/6:2/3:1/6
<b>T10</b>	Met-Ab-Ti 1/6:1/6:2/3

<b>SISTEMA</b>	<b>TIPO DI MIELE</b>	<b><i>P. mirabilis</i> ATCC 25933</b>	<b><i>S. epidermidis</i><sup>a</sup> ATCC 29887</b>	<b><i>S. aureus</i><sup>b</sup> ATCC 43300</b>
E7	Met-Ab-Eu 1/3:1/3:1/3	17.0 $\pm$ 0.0	20.5 $\pm$ 0.7	19.5 $\pm$ 0.7
E8	Met-Ab-Eu 2/3:1/6:1/6	16.5 $\pm$ 0.7	21.0 $\pm$ 0.0	20.5 $\pm$ 0.7
E9	Met-Ab-Eu 1/6:2/3:1/6	16.5 $\pm$ 0.7	19.0 $\pm$ 0.0	17.5 $\pm$ 0.7
E10	Met-Ab-Eu 1/6:1/6:2/3	19.5 $\pm$ 0.7	21.0 $\pm$ 1.4	25.5 $\pm$ 0.7
T7	Met-Ab-Ti 1/3:1/3:1/3	17.0 $\pm$ 1.4	25.0 $\pm$ 1.4	19.5 $\pm$ 0.7
T8	Met-Ab-Ti 2/3:1/6:1/6	16.0 $\pm$ 0.0	22.5 $\pm$ 0.7	23.5 $\pm$ 0.7
T9	Met-Ab-Ti 1/6:2/3:1/6	18.5 $\pm$ 0.7	21.0 $\pm$ 0.0	17.0 $\pm$ 0.0
T10	Met-Ab-Ti 1/6:1/6:2/3	18.0 $\pm$ 1.4	24.5 $\pm$ 0.7	23.0 $\pm$ 1.4

*a* – ceppo batterico resistente alla meticillina (MRSE)

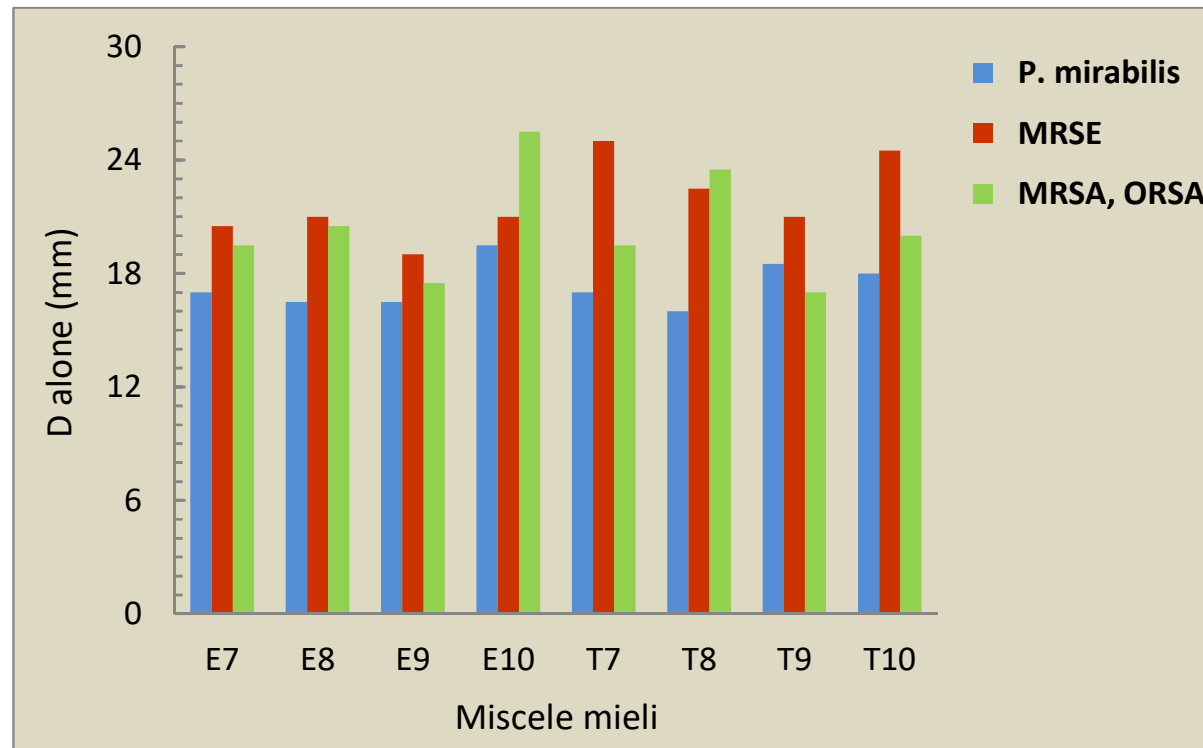
*b* – ceppo batterico resistente alla meticillina (MRSA) e oxacillina (ORSA)

# Risultati delle prove di validazione

Diametro di inibizione (VM  $\pm$  DS)

<b>E7</b>	Met-Ab-Eu 1/3:1/3:1/3
<b>E8</b>	Met-Ab-Eu 2/3:1/6:1/6
<b>E9</b>	Met-Ab-Eu 1/6:2/3:1/6
<b>E10</b>	Met-Ab-Eu 1/6:1/6:2/3

<b>T7</b>	Met-Ab-Ti 1/3:1/3:1/3
<b>T8</b>	Met-Ab-Ti 2/3:1/6:1/6
<b>T9</b>	Met-Ab-Ti 1/6:2/3:1/6
<b>T10</b>	Met-Ab-Ti 1/6:1/6:2/3





## Attività antibatterica delle miscele di mieli

Sviluppo di medicazioni avanzate

Tampone di garza sterile 25 x 25 mm  
con 0.6 mL di miele



Specie batterica: *MRSA*

Miscela T10

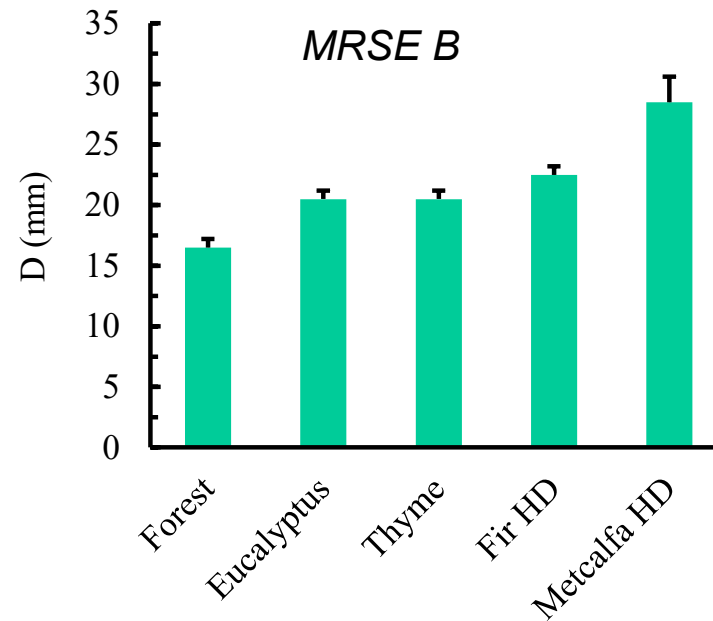
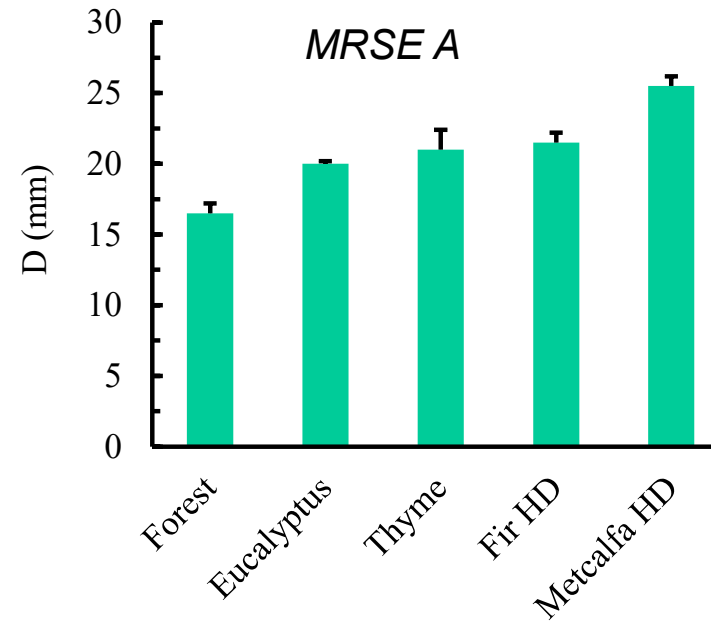
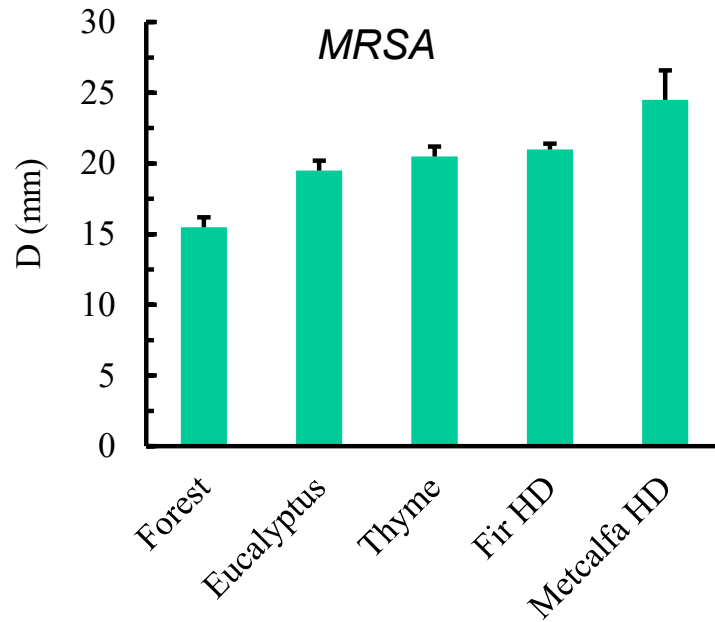


Specie batterica: *MRSE*

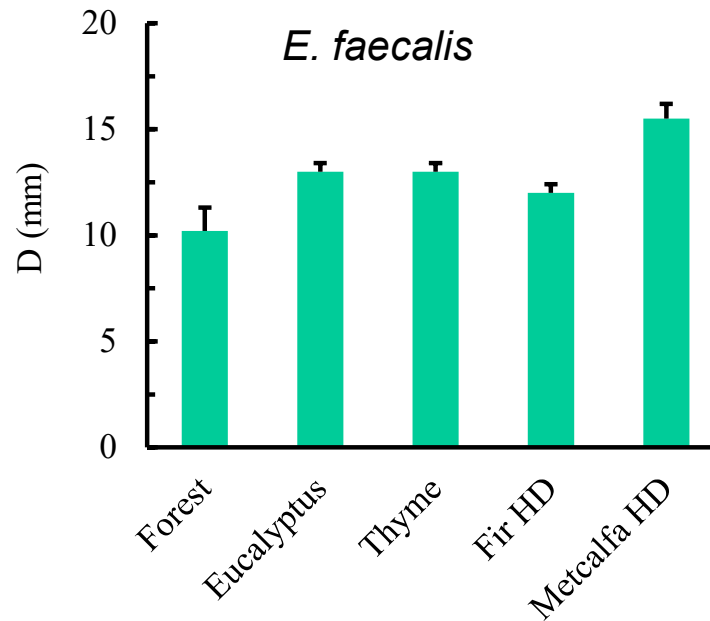
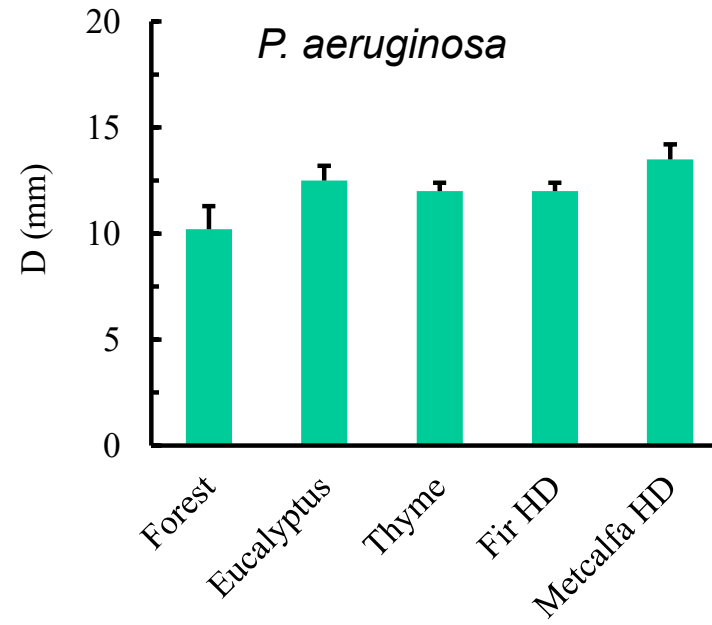
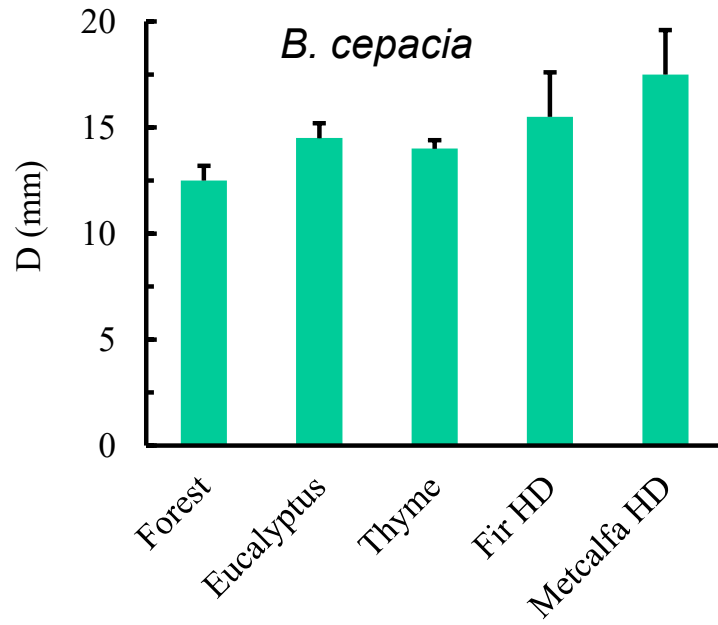
Miscela T10



# Nuove evidenze su batteri antibiotico-resistenti

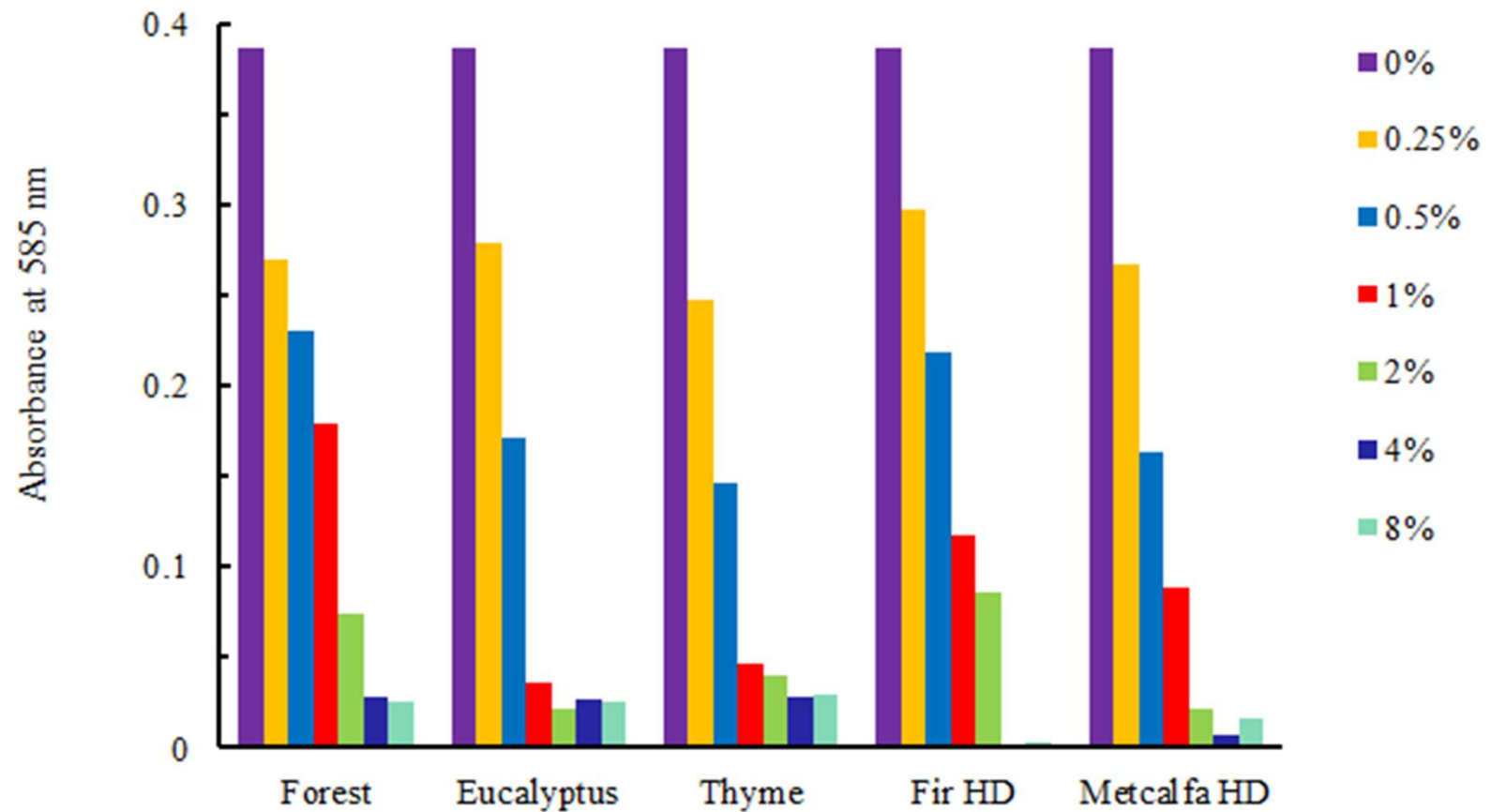


# Nuove evidenze su batteri antibiotico-resistenti



## Attività anti-quorum sensing

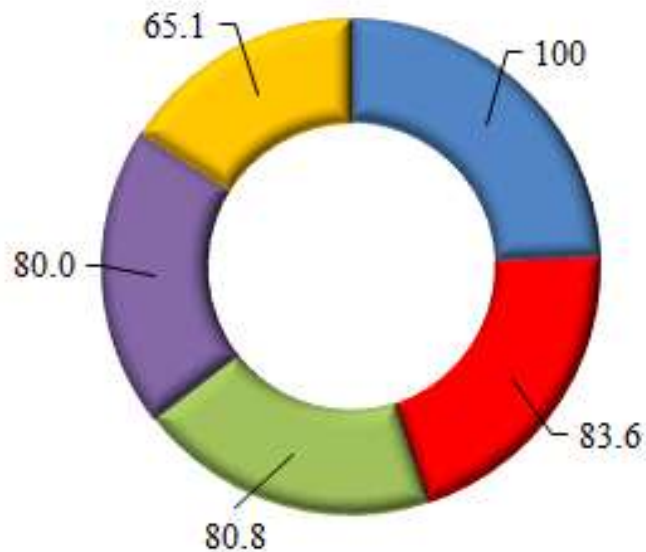
Inibizione della produzione di violaceina in *Chromobacterium violaceum*



## L'ultima frontiera

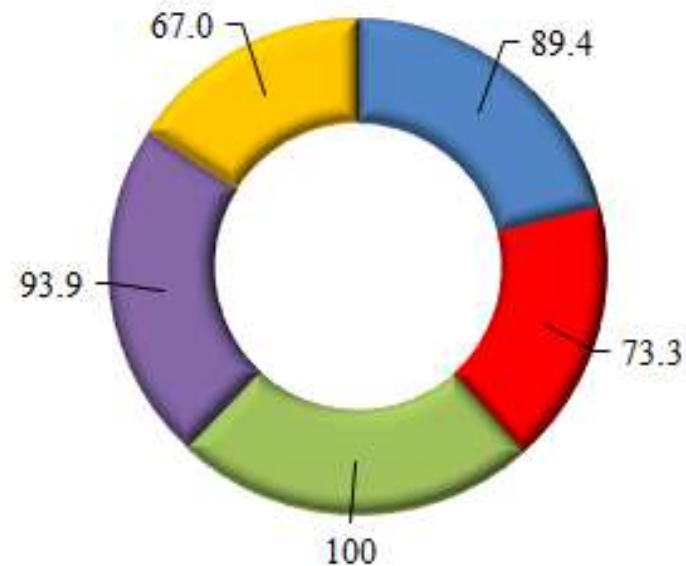
Sviluppo di miscele di mieli dotate di **attività antibatterica** nei confronti di **microorganismi antibiotico-resistenti** Gram-positivi e Gram-negativi e **anti-quorum sensing**

### Antibacterial activity

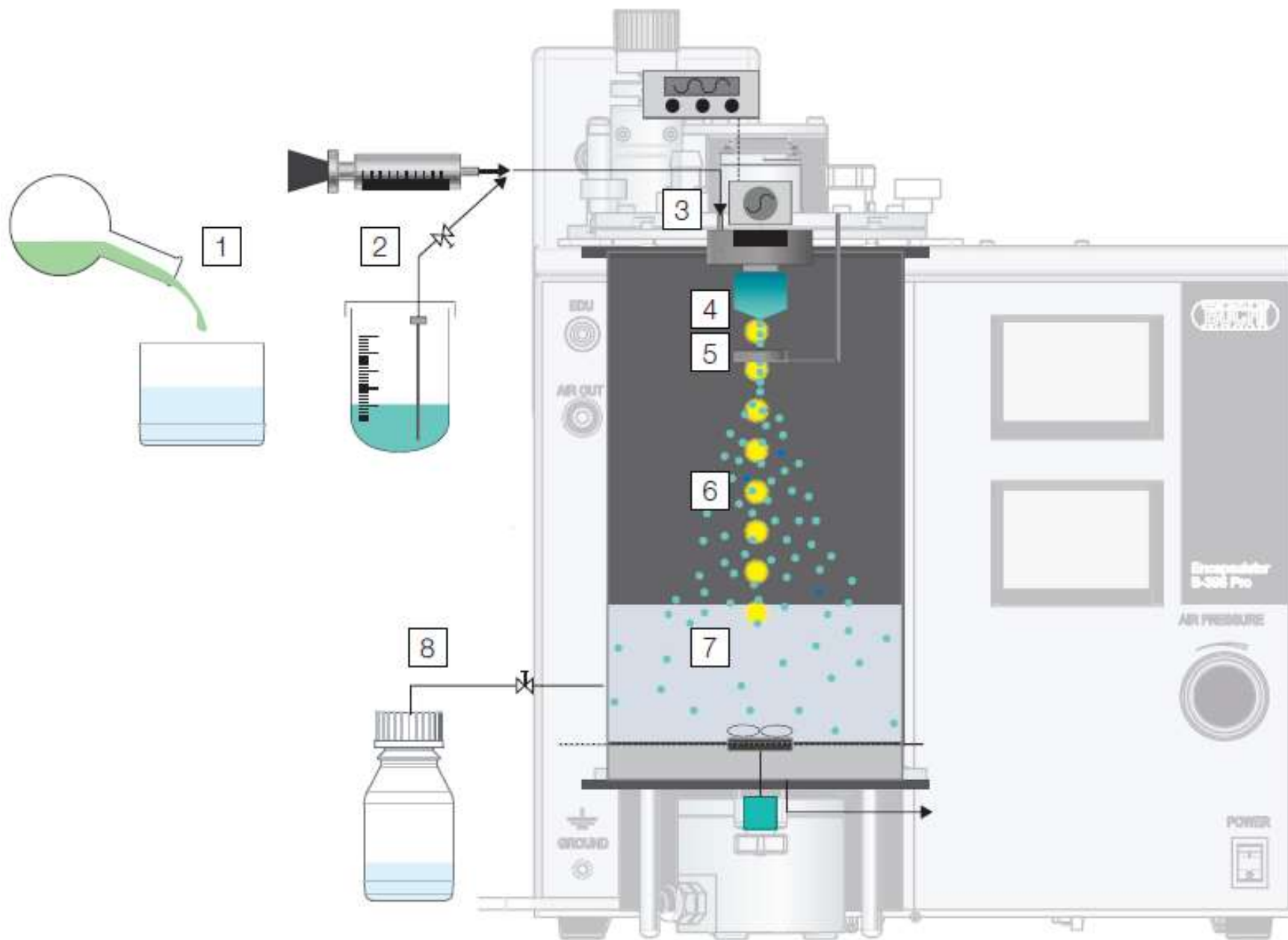


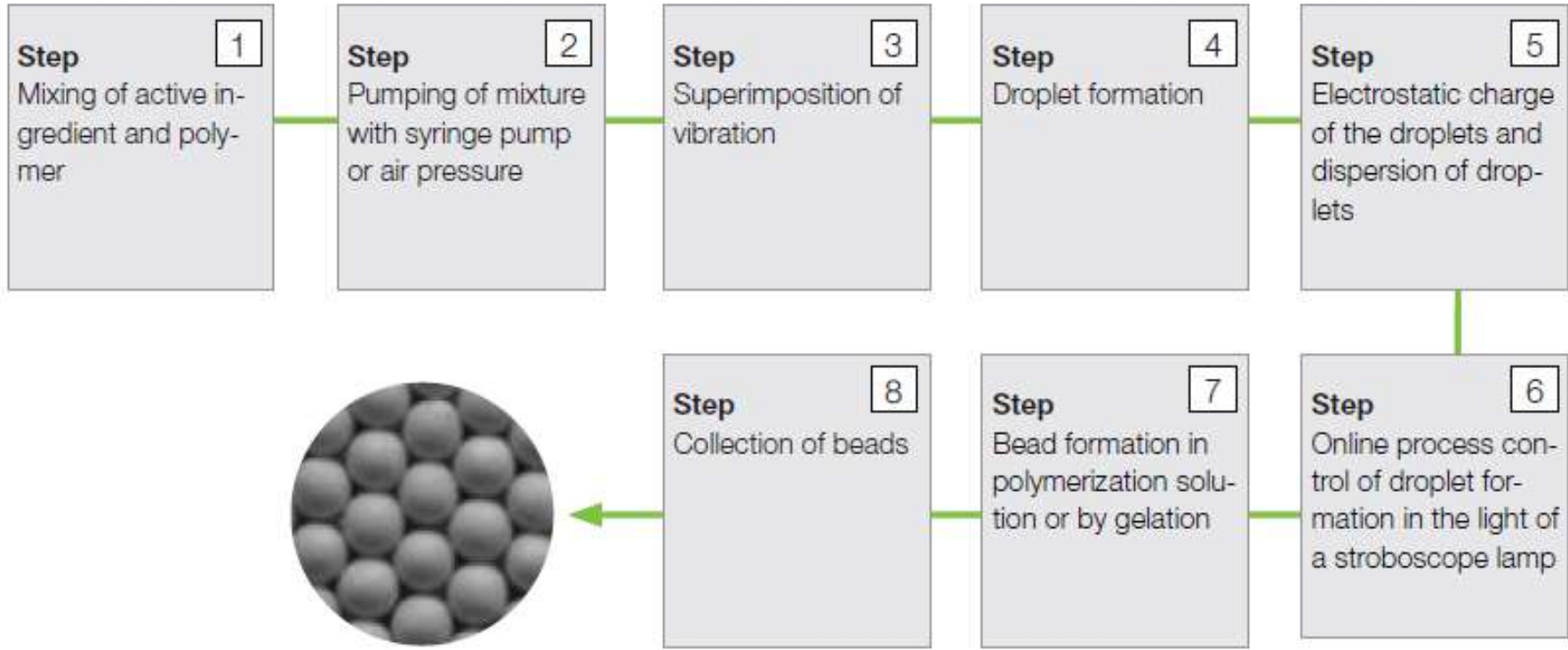
- Metcalfa HD
- Fir HD
- Thyme
- Eucalyptus
- Forest

### Anti-quorum sensing activity

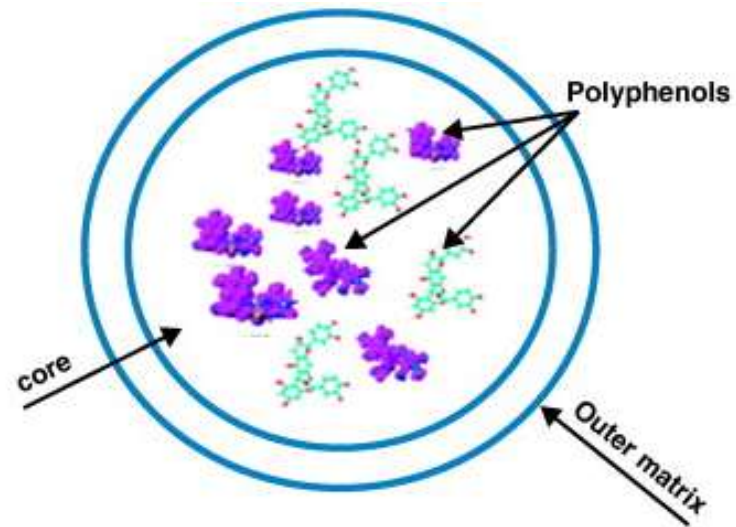
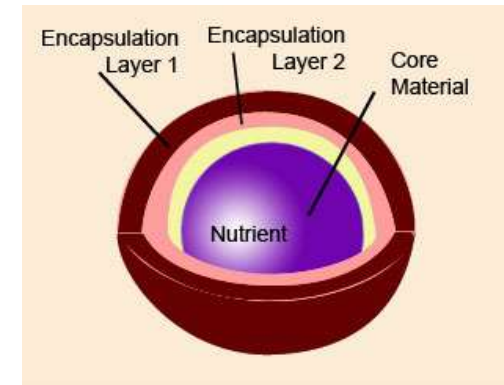
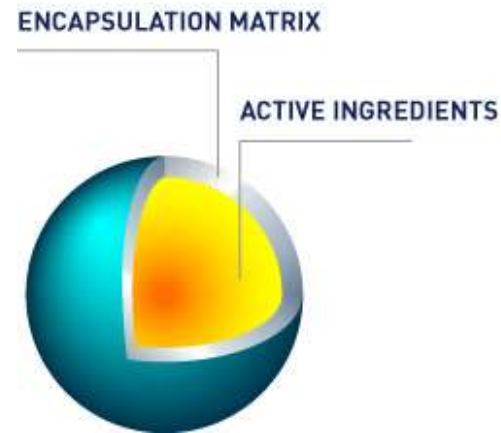
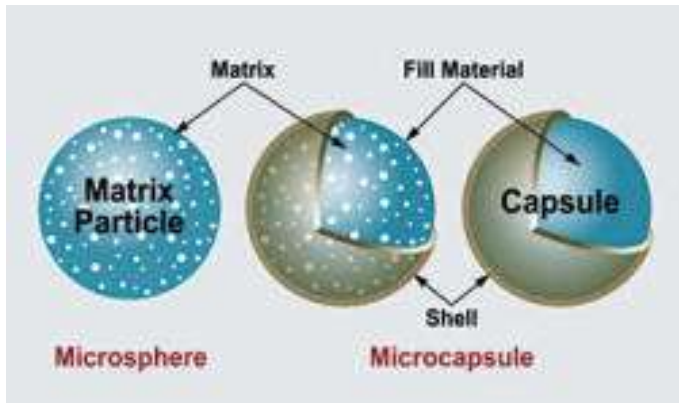


- Metcalfa HD
- Fir HD
- Thyme
- Eucalyptus
- Forest













**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA



**Dipartimento di Ingegneria Chimica, Materiali & Ambiente**  
**Via Eudossiana 18, Roma (Italy)**

# ***Sviluppo di preparati a base di miele con attività antibatterica potenziata***

**M. Fidaleo, R. Lavecchia, A. Zuorro**

**[antonio.zuorro@uniroma1.it](mailto:antonio.zuorro@uniroma1.it)**

**Roma, 21 gennaio 2022**