

Presenza di additivi chimici e capacità di inibizione microbica in estratti di semi di pompelmo utilizzati in apicoltura

Valerio Spinosi, Primula Semprini, Vincenzo Langella, Giampiero Scortichini & Silvano Calvarese

Riassunto

La peste americana, sostenuta da *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (White 1906) è una grave malattia delle api, che pone l'apicoltore e l'operatore sanitario di fronte a scelte difficili e complesse che portano a sviluppare presidi terapeutici "di tipo biologico", come gli estratti di semi di pompelmo, con scarsi problemi di residui nel prodotto finale. Il presente studio si propone di valutare la composizione chimica di estratti di semi di pompelmo utilizzando la gas cromatografia/spettrometria di massa per la ricerca di benzetonio cloruro, cetrimonio bromuro e trimetil-decanamonio cloruro. I risultati ottenuti ipotizzano una stretta correlazione tra l'effetto antimicrobico e la presenza di additivi chimici nei campioni analizzati.

Parole chiave

Additivi, Capacità di inibizione, Estratti di semi di pompelmo, *Paenibacillus larvae*, Peste americana.

Introduzione

La peste americana, sostenuta dal *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* (White 1906) è una grave malattia delle api, che pone l'apicoltore e l'operatore sanitario di fronte a scelte complesse quali la necessità di fronteggiare la malattia con appropriati presidi terapeutici e l'esigenza di ridurre al minimo i residui nel miele al fine di tutelare il consumatore finale.

L'utilizzo, a volte indiscriminato, di antibiotici per combattere la forma vegetativa del batterio può portare alla commercializzazione di prodotti dell'alveare contenenti residui di sostanze inibenti (tetraciclina, ossitetraciclina e sulfatiazolo). I dati pubblicati recentemente da ricercatori del settore, mostrano la presenza di antibiotici in campioni di miele e pappa reale (2).

A partire da queste problematiche, sono stati sviluppati, negli ultimi anni, numerosi presidi terapeutici "di tipo biologico", tra questi l'estratto di semi di pompelmo (ESP) che propongono minor impatto ambientale e scarsi problemi di residui nei prodotti finali dell'alveare, soprattutto nel miele (1, 3, 4, 6, 10).

In un nostro precedente lavoro (9), è stata testata la capacità di inibizione dell'ESP in relazione alla crescita *in vitro* del *P. larvae* subsp. *larvae* oltre a quello di batteri solitamente utilizzati nei test microbiologici. L'efficacia in campo dell'estratto è stata testata in un lavoro sperimentale (5). La prova ha evidenziato un'ottima capacità del prodotto di inibire lo sviluppo della malattia: a distanza di due anni, gli alveari non hanno mostrato segni di peste americana.

Alcuni ricercatori hanno analizzato campioni commerciali di estratti di semi di pompelmo, partendo dal presupposto che, ad alcuni di questi, fossero stati aggiunti conservanti sintetici. I risultati hanno indicato la presenza

di una serie di composti sintetici (methyl paraben, triclosan, benzetonio cloruro e cetrimonio bromuro) in concentrazioni variabili dal 1,25% al 19% (7, 8, 12, 14). Ulteriori studi hanno ipotizzato la relazione tra attività antimicrobica e presenza di composti sintetici; dimostrando come gli ESP non contenenti additivi fossero privi di inibizione microbica (11, 13). Il presente lavoro si propone di valutare la composizione chimica di estratti di semi di pompelmo utilizzando la gas cromatografia ad alta risoluzione/spettrometria di massa a bassa risoluzione (HRGC-LRMS) per la ricerca di benzetonio cloruro, cetrimonio bromuro e trimetil-decanamonio cloruro, correlando la presenza di tali composti all'attività antimicrobica *in vitro*.

Materiali e metodi

Campionamento e disegno sperimentale

Diciassette campioni di ESP (4 in polvere e 13 in formulazione liquida) sono stati analizzati per la ricerca di benzetonio cloruro, cetrimonio bromuro e trimetil-decanamonio cloruro utilizzando HRGC-LRMS.

Gli estratti di semi di pompelmo testati, di origine nazionale ed europea, sono stati forniti da apicoltori e/o da aziende commerciali.

Gli stessi campioni sono stati sottoposti alle prove di inibizione *in vitro* nei confronti dei seguenti batteri: *Bacillus subtilis* BGA, *Bacillus cereus* K250, *Bacillus cereus* 11778, *Micrococcus luteus* 9341.a e, quindi, nei confronti del *P. larvae*. Le procedure utilizzate per tali prove sono quelle indicate in un lavoro precedente svolto dagli autori (9).

Preparazione dei campioni

Da ogni campione di ESP sono stati prelevati 25 mg per le formulazioni in polvere e 50 µl per le forme liquide, sciogliendo o diluendo a 20 ml con acetone/metanolo 50:50 v/v. I campioni sono stati filtrati su carta da 25 mm, 0,2 µm (Whatman, Clifton, New Jersey). Le soluzioni sono state iniettate direttamente in HRGC-LRMS. Le concentrazioni degli analiti in esame sono state calcolate tramite

calibrazione con curve concentrazione-risposta ottenute da standard diluiti a varie concentrazioni.

Standard di riferimento e reagenti

Gli standard di riferimento utilizzati sono stati benzetonio cloruro (Sigma-Aldrich, Toufkirchen), cetrimonio bromuro (Dr Ehrenstorfer-Schafer, Augsburg) e trimetil-decanamonio cloruro (Anatrace, Inc. Maumee, Ohio). Sono stati utilizzati acetone e metanolo con grado di purezza per analisi pesticidi (Carlo Erba, Milano).

Le soluzioni madre dei tre standard a 1000 mg/l sono state ottenute sciogliendo, in acetone/metanolo (80:20 v/v), 50 mg di standard puro in matracci tarati da 50 ml. Le soluzioni di lavoro 1, 10, 100 e 250 mg/l sono state ottenute diluendo le soluzioni madre in isottano.

Condizioni cromatografiche

È stato utilizzato un gas-cromatografo Trace GC ad alta risoluzione con rivelatore a spettrometria di massa a bassa risoluzione Trace DSQ 70 (Thermo Finnigan, San Jose, California). Tale strumentazione è stata equipaggiata con un iniettore di tipo split-splitless, termostato a 270°C con tempo di splittaggio di 1 min e con uno flusso di splittaggio di 40 ml/min. Per la separazione è stata utilizzata una colonna cromatografica capillare DB-5, 60 m × 0,25 mm, 0,25 µm (J&W Scientific, Folsom, California). La rampa termica utilizzata per la termostatazione della colonna è stata: 98°C isoterma 2 min, 25°C/min fino a 160°C, isoterma 2 min, 4°C/min fino a 210°C, isoterma 8 min, 10°C/min fino a temperatura finale 320°C, isoterma 10 min (totale 40 min). Le temperature della transfer line e della sorgente sono state impostate, rispettivamente, a 260°C e 240°C. La ionizzazione elettronica è stata ottenuta fissando il voltaggio della sorgente a 70 eV. L'acquisizione dello spettro di massa è stata condotta in full scan da 50 a 450 m/z. L'analisi quantitativa è stata effettuata monitorando il frammento ionico con m/z =58. Il volume d'iniezione è stato 1 µl.

Risultati e discussione

Presenza di additivi chimici

All'analisi HRGC-LRMS è stata rilevata la presenza di benzetonio cloruro (Fig. 1), cetrimonio bromuro (Fig. 2) e trimetil-decanammonio cloruro (Fig. 3). Le percentuali delle concentrazioni riscontrate sono sintetizzate in Tabella I.

Su 17 campioni analizzati, 14 hanno mostrato positività per benzetonio cloruro, 5 per cetrimonio bromuro e 1 per trimetil-decanammonio cloruro. Tutti i campioni contenenti cetrimonio bromuro hanno presentato anche bassa concentrazione di benzetonio cloruro. Solo 2 campioni (n. 2 e n. 3) sono risultate privi dei tre conservanti.

Il benzetonio cloruro è risultato presente sia nei campioni in polvere sia in quelli liquidi, mentre in nessun campione in polvere è stato dimostrata la presenza di cetrimonio bromuro.

La concentrazione percentuale di benzetonio cloruro ha presentato un range di variazione più elevato, da un minimo di 0,003% del campione n. 8 a un massimo del 21,500% del campione n. 4. Il cetrimonio bromuro ha presentato il valore minimo di 3,202% (campione n. 5) e massimo di 11,656% (campione n. 1).

La Figura 4 mostra, per ogni singolo campione di estratto di semi di pompelmo, le percentuali degli additivi analizzati.

Capacità di inibizione microbica

Nel precedente lavoro svolto dagli autori (9), sono stati effettuati test di inibizione microbica nei confronti di vari ceppi batterici. I risultati sono stati di seguito sintetizzati:

- non tutti gli estratti di semi di pompelmo hanno inibito *P. larvae* e i batteri test
- la capacità di inibizione è risultata variare da campione a campione: alcuni hanno presentato un alone di inibizione molto accentuato, altri quasi al limite della rilevabilità
- non si è osservata correlazione diretta tra il fattore di diluizione dell'estratto e l'alone di inibizione.

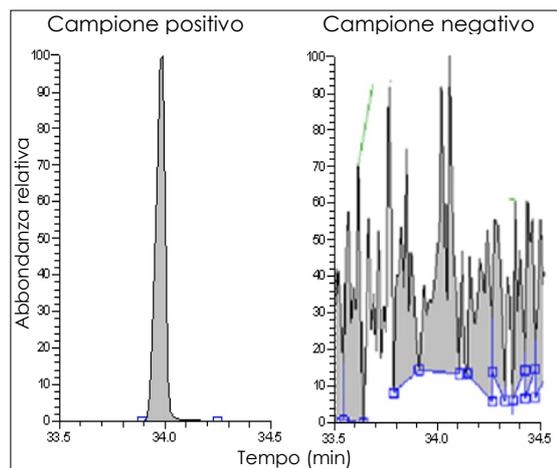


Figura 1
Benzetonio cloruro
Cromatogramma di massa (m/z 58) per un campione positivo e uno negativo

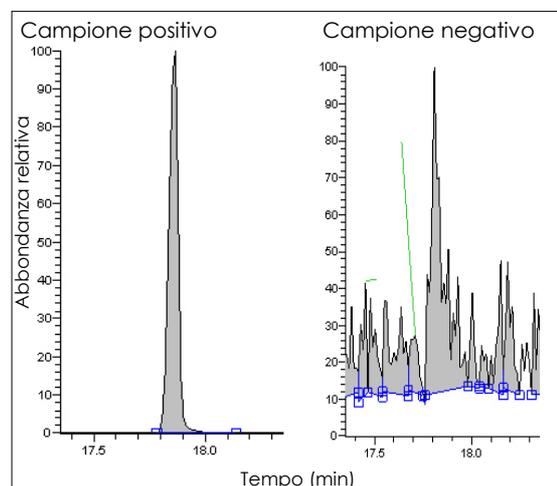


Figura 2
Cetrimonio bromuro
Cromatogramma di massa (m/z 58) per un campione positivo e uno negativo

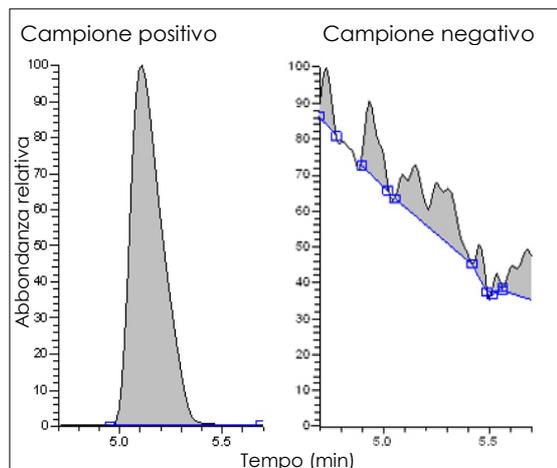


Figura 3
Trimetil-decanammonio cloruro
Cromatogramma di massa (m/z 58) per un campione positivo e uno negativo

Tabella I
Percentuale di conservanti e capacità inibente dei campioni di estratti di semi di pompelmo

Campione n.	Benzetonio cloruro (%)	Cetrimonio bromuro (%)	Trimetil-decanamionio cloruro (%)	Capacità inibente (<i>Paenibacillus larvae</i>)	Capacità inibente (batteri test) ^(a)
1	0,564	11,656	NR	+	+
2	NR	NR	NR	-	-
3	NR	NR	NR	-	-
4 ^(b)	21,500	NR	NR	+	+
5	0,013	3,202	NR	+	+
6 ^(b)	13,774	NR	NR	+	+
7	0,066	NR	NR	+	+
8	0,003	NR	NR	+	+
9 ^(b)	12,541	NR	NR	+	+
10	8,318	NR	NR	+	+
11	5,206	NR	NR	+	+
12	12,522	NR	NR	+	+
13 ^(b)	7,273	NR	NR	+	+
14	0,066	8,050	NR	+	+
15	0,013	4,602	NR	+	+
16	0,014	9,977	NR	+	+
17	NR	NR	10,320	+	+

a) batteri test: *Bacillus subtilis* BGA, *Bacillus cereus* K250, *Bacillus cereus* 11778, *Micrococcus luteus* 9341.a

b) i campioni contrassegnati sono prodotti commercializzati sotto forma di polvere mentre gli altri sono liquidi

NR non rilevato

In Tabella I sono riportate le concentrazioni di benzetonio cloruro, cetrimonio bromuro e trimetil-decanamionio cloruro presenti negli ESP analizzati con la loro capacità di inibizione *in vitro*: gli unici campioni senza conservanti (campioni n. 2 e n. 3) sono stati anche quelli che non hanno presentato aloni di inibizione.

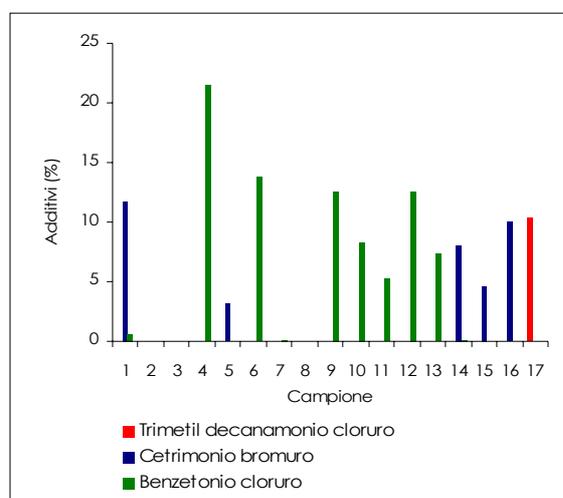


Figura 4
Percentuale di additivi nei campioni analizzati

Conclusioni

I risultati hanno messo in evidenza che solo i campioni contenenti uno o più conservanti hanno presentato attività di inibizione nei confronti dei batteri. Infatti, gli unici campioni di ESP che non hanno inibito né i batteri test né *Paenibacillus larvae* sono quelli non contenenti i tre composti.

E' possibile ipotizzare che la capacità inibente degli estratti di semi di pompelmo, relativamente ai campioni analizzati, è stata causata dalla presenza dei tre conservanti analizzati e non dalle molecole contenute naturalmente negli estratti stessi.

Si può concludere che la capacità di inibizione microbica è presente soltanto in quelle formulazioni di estratti di semi di pompelmo ai quali sono stati aggiunti additivi chimici durante i processi di lavorazione industriale del prodotto.

Bibliografia

1. Cremasco S., Mutinelli F. & Irsara A. 1994. Attività degli oli essenziali nelle malattie delle api. *Ape nostra amica*, **16** (2), 4-10.
2. European Commission (EC) 2004. Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) annual report on the functioning of the RASFF 2004. EC, Health & Consumer Protection Directorate-General, Directorate D, Food Safety: production and distribution chain, Brussels, 38 pp (ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2004_en.pdf ultimo accesso 16 dicembre 2006).
3. Fiorentini L. & Castello M.C. 2002. Proprietà antibatteriche di alcuni oli essenziali. *Large Anim Rev*, **8** (6), 87-88.
4. Hegggers J.P., Cottingham J., Gusman J., Reagor L., McCoy L., Carino E., Cox R., Zhao J.G. & Reagor L. 2002. The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent. II. Mechanism of action and *in vitro* toxicity. *J Altern Compl Med*, **8** (3), 333-340.
5. Langella V., Semprini P., Di Fabio F., Calvarese S., Pasini B., Falda M.T. & Panella F. 2003. Indagine preliminare sull'efficacia dell'estratto di semi di pompelmo nella lotta contro la peste americana. *Vet Ital*, **XXXIX** (47), 49-54.
6. Lee Reagor B.S., Jean Gusman B.S., Lana McCoy M.T., Ekith Carino M.T. & Hegggers J.P. 2002. The effectiveness of processed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent. I. An *in vitro* agar assay. *J Altern Compl Med*, **8** (3), 325-332.
7. Okayama A., Sadogawa T., Nadajima C. & Hayama T. 1996. Biological properties and antibiotic susceptibility of *Bacillus larvae* originated from American foulbrood of honeybee in Japan. *J Vet Med Sci/Jap Soc Vet Sci*, **58** (5), 439-441
8. Sakamoto S., Sato K., Maitani T. & Yamada T. 1996. Analysis of components in natural food additive grapefruit seed extract by HPLC and LC/MS. *Bull Natl Inst Health Sci*, **114**, 38-42.
9. Semprini P., Langella V. & Calvarese S. 2004. Proprietà antibatteriche dell'estratto di semi di pompelmo nei confronti di *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. *Vet Ital*, **40** (2), 39-45.
10. Sharamon S. & Baginski B.J. 1998. Le virtù terapeutiche dei semi di pompelmo. *Tecniche Nuove*, Milano .
11. Shimanuki H. & Knox D.A. 1997. Bee health and international trade. *Rev Sci Tech*, **16** (1), 172-176.
12. Takeoka G., Dao L., Wong R.Y., Lundin R. & Mahoney N. 2001. Identification of benzethonium chloride in commercial grapefruit seed extracts *J Agric Food Chem*, **49**, 3316-3320.
13. Tirillini B. 2000. Grapefruit: the last decade acquisitions. *Fitoterapia*, Suppl. 1, S 29-37.
14. von Woedtke T., Schlüter B., Pfliegel P., Lindequist U. & Jülich W.D. 1999 Aspects of the antimicrobial efficacy of grapefruit seed extract and its relation to preservative substances contained. *Pharmazie*, **54**, 452-456.

