

RAFFAELE ROMANO^{1*}, ANELLA GIORDANO¹, JOSÈ MALVISI², EMANUELA
TESEI², SALVATORE SPAGNA MUSSO¹

DETERMINAZIONE DEL CARVACROLO MEDIANTE HRGC-MS/FID NELL'ORATA (*SPARUS AURATA*) DI ACQUACOLTURA

¹Università degli Studi di Napoli Federico II, Dipartimento di Scienza degli Alimenti

²Università degli Studi di Perugia, Istituto di Semeiotica Medica e Metodologia Clinica
Veterinaria

*raffaele.romano@unina.it

INTRODUZIONE

Le proprietà antimicrobiche del carvacrolo sono state ampiamente descritte soprattutto sulla base di osservazioni *in vitro* operate attraverso metodi di diffusione semiquantitativa o di analisi su piastra (Michiels *et al.*, 2007).

L'ampia diffusione "zootecnica" di *Sparus aurata* e, in contemporanea, di molte altre specie eurialine nel Mediterraneo ha determinato in questi ultimi decenni il diffondersi di patologie batteriche, ad essa più o meno direttamente legate, tanto da far diventare alcune aree del "Mare Nostrum" endemiche per malattie come la pasteurellosi e la vibriosi.

Per cercare di ridurre l'impatto ambientale, legato all'utilizzo incontrollato di antibatterici di sintesi, la ricerca vuole promuovere l'utilizzo di molecole alternative che, attraverso un'azione sinergica di inibizione della crescita batterica e di immuno-stimolazione, possano ad essi sostituirsi. L'obiettivo dello studio è stato quello di mettere a punto un metodo analitico, semplice e rapido, per rilevare la quantità di carvacrolo presente nelle orate di acquacoltura sottoposte a un regime alimentare arricchito.

Le prime prove della ricerca hanno compreso una valutazione dell'appetibilità dell'olio essenziale di carvacrolo ed il grado di assorbimento dello stesso a livello ematico e tissutale dopo cinque giorni di somministrazione (Mulero *et al.*, 1994; Vergara *et al.*, 1999; Sanchez-Muros *et al.*, 2003).

Allo scopo è stato utilizzato olio essenziale aggiunto tal quale a percentuali scelte in base alla capacità di assorbimento da parte del mangime e alle sue proprietà antimicrobiche dimostrate e riportate in bibliografia.

Pertanto, in riferimento all'elevato potere antimicrobico dimostrato *in vitro* dagli oli essenziali, in generale, e dal carvacrolo, in particolare, (Burt, 2004; Yanishlieva *et al.*, 1999) su numerosi microrganismi ancorché non di stretta pertinenza delle patologie ittiche è stato deciso su basi bibliografiche di valutarne l'attività alla concentrazione dell'1% (nel mangime) come supplemento alla dieta.

MATERIALI E METODI

La dieta arricchita è stata valutata su gruppi di 5 soggetti, in duplice replicazione. Ai fini di una corretta valutazione è stato previsto un gruppo di controllo, a cui è stata somministrata un'identica razione di mangime (standard) non addizionata di alcun tipo di olio essenziale.

La sperimentazione è stata eseguita presso l'avannotteria della Cooperativa dei pescatori di Orbetello (GR) interamente al "chiuso", in modo tale che la temperatura dell'acqua non presentasse ampie oscillazioni durante l'arco della giornata e permettesse agli animali di alimentarsi costantemente per almeno 8 ore al giorno. Le orate (*Sparus aurata*) utilizzate avevano un peso medio di 150 g e provenivano dalla laguna di Orbetello.

La preparazione del mangime medicato è stata effettuata per incorporazione e miscelazione del carvacrolo al mangime manualmente in azienda quattro giorni prima dell'inizio della somministrazione per ottenere un buon adsorbimento nel mangime, che veniva conservato per tutta la durata della prova in frigorifero a 4°C.

La somministrazione manuale alle orate era alla dose di 10 g/vasca/die. A fine sperimentazione le orate sono state anestetizzate aggiungendo ghiaccio direttamente in vasca, per raggiungere la temperatura di 4°C nel tempo di un'ora. Gli animali anestetizzati sono stati immediatamente congelati in pozzetto frigo a -20°C e successivamente sottoposti ad analisi. I risultati evidenziati di seguito rappresentano la media di tre determinazioni.

Determinazione Carvacrolo

Estrazione del grasso

La procedura di estrazione è stata eseguita secondo il metodo di Folch *et al.* (1957) modificato. In breve, 10 grammi di muscolo di pesce prelevati in punti diversi sono stati tritati con 15 mL di soluzione metanolo/cloroformio (2:1). All'omogenato trasferito in beuta sono stati aggiunti ulteriori 15 mL di soluzione metanolo-cloroformio. Dopo agitazione per 10 minuti sono stati aggiunti 10 mL di cloroformio e 18 mL di acqua. L'estrazione è stata prolungata per altri 10 minuti. La soluzione, separata per centrifugazione a 2.000 giri per 10 minuti, è stata filtrata successivamente su solfato di sodio anidro. Il grasso estratto dopo allontanamento del solvente è stato utilizzato per preparare una soluzione all'1,5% (p/v) con 100 ppm di standard interno.

Analisi gascromatografica del carvacrolo

L'identificazione del carvacrolo è stata effettuata via GC-MS confrontando il tempo di ritenzione con lo standard puro e lo spettro di massa con quello riportato dalla libreria NIST 2002. Gli spettri sono stati generati a 70 eV tra 35 e 200 UMA. Per l'analisi quantitativa gascromatografica è stato utilizzato un gascromatografo DANI 1000 equipaggiato con: vaporizzatore a temperatura programmata (PTV); colonna capillare RTX 65 TG (35% dimethyl-65% diphenyl polysiloxane), 30 m, 0,25 mm. ID, 0,10 µm ft; detector a ionizzazione di fiamma (FID).

Condizioni operative

PTV: temperatura iniziale 60°C per 0,1 min, incremento di 500°C/min fino a 380° per 7 min.
OVEN: temperatura iniziale 120°C per 4 min, incremento 30°C/min fino a 360° per 5 min.
Split: 1/25. FID 370.

Analisi quantitativa

L'analisi quantitativa è stata effettuata secondo la metodologia dello standard interno. Sono state preparate soluzioni di carvacrolo a diverse concentrazioni (0,5, 1, 5, 10, 50, 100, 200, 500 ppm) con standard interno (S.I.) *n*-dodecanolo (100 ppm). Limite di rilevabilità 0,5 ppm. L'intervallo di linearità è risultato tra 0-500 ppm.

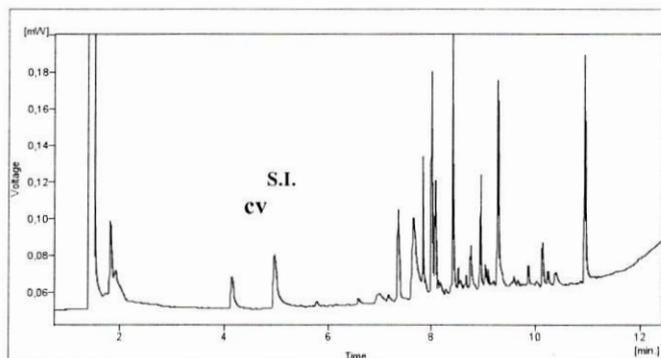


Fig. 1 - Tipico profilo HRGC-FID del grasso estratto da orata aggiunto di standard interno.

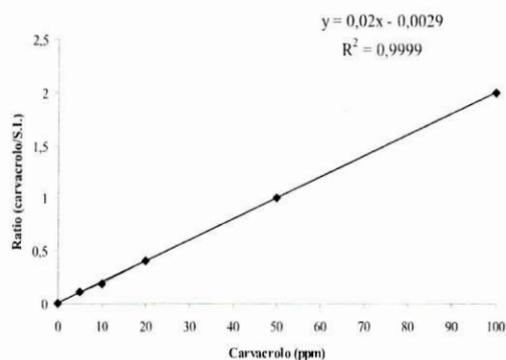


Fig. 2 - Retta di calibrazione per la determinazione del carvacrolo.

Tabella 1 - Recupero del carvacrolo.

Aggiunta nota (50 ppm carvacrolo)	R(Area CV/Area S.I.)	Recupero (%)
1	0.976	97.90
2	0.967	96.98
3	1.012	101.50
4	0.967	96.98
5	0.993	99.60
6	0.969	97.20
7	1.015	101.80
8	1.017	102.00
9	0.991	99.40
10	0.960	96.30

n=30 (10x3)

Tabella 2 - Concentrazione del carvacrolo.

Campione	Carvacrolo (ppm)	
	1	6.5
	2	9.1
	3	36.4
Orate alimentate	4	27.3
con una dieta arricchita	5	7.8
in Carvacrolo (1% p/p)	6	5.2
	7	13.0
	8	41.6
	9	15.6
	10	22.1

RISULTATI E DISCUSSIONE

Allo stato attuale, ridotti sono i lavori riportati in letteratura che propongono il carvacrolo come supplemento nella dieta dei pesci. Di conseguenza è stato necessario mettere a punto un metodo di riferimento per determinare la concentrazione del composto nei tessuti degli animali.

In Fig. 1 viene mostrato un tipico profilo HRGC/FID del grasso estratto dal muscolo di orata aggiunto di S.I. I tempi di analisi, nelle nostre condizioni sperimentali, sono stati di circa 13 minuti e nel tempo di 6 minuti i picchi di interesse (Cv e S.I.) sono risolti. In Fig. 2 viene riportata la curva di taratura del carvacrolo per l'intervallo 0-100 ppm dove è possibile osservare l'interpolazione lineare dei dati ($r^2=0,999$).

La procedura di estrazione del grasso dal muscolo di orata ha evidenziato una percentuale media di recupero del 98,9% (Tab. 1), con un'accuratezza del 99% circa. I risultati ottenuti per le orate alimentate con una dieta arricchita in carvacrolo sono mostrati in Tab. 2. I valori calcolati presentavano un minimo di 5,2 ppm e un massimo di 41,6 ppm.

RINGRAZIAMENTI

Ricerca innovativa nell'ambito dell'allevamento ittico previsto da DOCUP Pesca (2000-2006) finanziata dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali.

BIBLIOGRAFIA

- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, 223-253, 2004.
- Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.
- Michiels J., Missotten J., Fremaut D., De Smet S., Dierick N. *In vitro* dose-response of carvacrol, thymol, eugenol and *trans*-cinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora. *Livestock Science* 109, 157-160, 2007.

Mulero V., Esteban M.A., Munxoz J., Meseguer J. Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 8, 49-62, 1998.

Vergara J.M., Lopez-Calero G., Robaina L., Caballero M.J., Montero D., Izquierdo M.S., Aksnes A. Growth, feed utilization and body lipid content of gilthead seabream *Sparus aurata* fed increasing lipid levels and fish meals of different quality. *Aquaculture* 179, 35-44, 1999.

Sanchez-Muros M.J., Corcheteb V., Suarez M.D., Cardenete G., Gomez-Milan E., de la Higuera M. Effect of feeding method and protein source on *Sparus aurata* feeding patterns. *Aquaculture* 224, 89-103, 2003.

Yanishlieva N.V., Marinovaa E.M., Gordonb M.H., Ranevaa V.G. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry* 64, 59-66, 1999.

RIASSUNTO

Le proprietà antimicrobiche del carvacrolo sono state ampiamente descritte soprattutto sulla base di osservazioni *in vitro*. L'ampia diffusione "zootecnica" di *Sparus aurata* ha determinato in questi ultimi decenni il diffondersi di patologie batteriche come la pasteurellosi e la vibriosi. La sperimentazione è stata condotta per 45 giorni su orate (*Sparus aurata*) del peso medio di 150 g la cui razione alimentare giornaliera è stata incorporata con l'1% di carvacrolo, e su orate alimentate con il mangime base nello stesso periodo (gruppo controllo). La frazione lipidica è stata estratta dal muscolo mediante metodo di Folch modificato. L'identificazione del carvacrolo è stata effettuata via HRGC-MS. L'analisi quantitativa è stata valutata nelle stesse condizioni cromatografiche ma con detector a ionizzazione di fiamma (FID) in presenza di standard interno (*n*-dodecanolo). La procedura ha consentito il recupero del 98,97% circa del carvacrolo con un limite di rilevabilità pari a 0,5 ppm.

SUMMARY

CARVACROL DETERMINATION BY HRGC/MS-FID IN GILTHEAD SEABREAM (SPARUS AURATA)

An example of an antimicrobial compound present in the essential oil fraction of oreganum and thyme is carvacrol. Its property has been widely described on observations in vitro. The wide spread "livestock" in Sparus aurata has led, in recent years, the spread of bacterial diseases such as Pasteurella and vibriosis. The experimentation was conducted for 45 days on gilthead bream (Sparus aurata average weight 150 g) fed with diet enriched with 1% of carvacrol and on control group. The lipid fraction was extracted from muscle using modified Folch method. The carvacrol identification was carried out by HRGC-MS. The quantitative analysis was evaluated under the same conditions with FID detector in the presence of internal standard (n-dodecanol). The procedure allowed the carvacrol recovery about 98.97% with a limit of detection equal to 0.5 ppm.