

Attività anti-microbica di oli essenziali estratti da piante aromatiche

A. Deriu, L.A. Sechi, S. Zanetti

*Dipartimento di Scienze Biomediche, Sezione di Microbiologia Sperimentale e Clinica,
Università degli Studi di Sassari*

Riassunto. L'attività antimicrobica di molte piante aromatiche e dei loro estratti è conosciuta da secoli. Gli oli essenziali, estratti in genere dalle parti non legnose della pianta con il metodo della distillazione in corrente di vapore, sono costituiti da una miscela di idrocarburi complessi. Scopo del lavoro è stato quello di valutare la attività antimicrobica di oli essenziali estratti da piante rustiche e coltivate nell'area del nord-est Sardegna. I risultati mostrano, in particolare per il rosmarino, una attività antimicrobica tale da suggerirne il possibile uso alternativo agli antibiotici.

Summary. The antimicrobial properties of many aromatic plants and their extracts have been empirically recognized for centuries. Essential oils are generally extracted from nonwoody plant material, usually by a method of distillation and they are composed of a mixture of complex hydrocarbons. Many studies on plant essential oils have been carried out in order to understand their antimicrobial and anti-inflammatory properties. The aim of this work were to assess the antimicrobial activities of some essential oils from wild and cultivated plants growth on North-East Sardinia. Results suggest that essential oils tested, especially *Rosmarinus officinalis*, may offer a natural alternative to the use of antibiotics.

Introduzione

La fitoterapia è la disciplina medica che utilizza a scopo curativo piante medicinali e loro derivati. Il ricorso alle cure con elementi naturali provenienti dal Regno Vegetale accompagna la storia dell'uomo da qualche millennio! Gli Egizi distillavano piante aromatiche per ottenere oli essenziali utilizzati per preparare cosmetici, per la mummificazione dei cadaveri, per la terapia di alcune malattie. Piante quali la digitale, l'aglio, la camomilla, la salvia, l'assenzio, erano conosciute per le loro proprietà già ai Romani ed ai Greci. L'Organizzazione Mondiale della Sanità definisce pianta medicinale ogni pianta che

contiene sostanze che possono essere utilizzate a fini terapeutici o preventivi (11). Nel passato i composti di origine vegetale erano distinti in metaboliti primari, indispensabili al metabolismo della cellula (carboidrati, proteine, lipidi) e metaboliti secondari, sostanze non essenziali al metabolismo della pianta. Al gruppo dei metaboliti secondari appartengono gli oli essenziali. Questi sono rappresentati dall'insieme dei costituenti chimici volatili e lipofili presenti nelle piante aromatiche, in speciali organuli, ed estratti dalla pianta con diverse tecniche (4). Le piante aromatiche trovano impiego come condimento dei cibi, per la produzione dei liquori, profumi, sciroppi, molte hanno virtù medicinali ed appartengono so-

prattutto alla Famiglia delle Umbelliferae, delle Lamiaceae e delle Lauraceae. Le proprietà antimicrobiche degli oli essenziali di alcune piante sono state valutate e pubblicate in diversi lavori (2, 3, 5, 6, 7, 8, 10). Numerosi estratti di piante dell'area mediterranea contengono principi attivi che manifestano attività biologica tale da giustificare il loro utilizzo in medicina e nell'industria agroalimentare (1, 2). Scopo del nostro lavoro è stato quello di effettuare un primo screening sull'attività antimicrobica di oli essenziali estratti da piante officinali appartenenti alla Famiglia Mirtaceae, Lamiaceae, Lauraceae e Compositae.

Materiali e Metodi

Sono stati effettuati saggi microbici sugli oli essenziali estratti dalle seguenti piante:

lavanda (*Lavandula angustifolia* Miller), rosmarino (*Rosmarinus officinalis*), salvia (*Salvia officinalis*), menta (*Mentha piperita*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia* Cheel), chiodi di garofano (*Syzygium aromaticum*), cannella (*Cinnamomum zeylanicum*), elicriso (*Helichrysum italicum*). L'estrazione degli oli essenziali è stata effettuata con la tecnica in corrente di vapore. La valutazione della attività antimicrobica è stata effettuata con la tecnica della diffusione in agar, che, nel caso del saggio di sensibilità agli oli essenziali è definito aromatogramma. Sono state utilizzate sospensioni batteriche di 0.5 MacFarland, seminate su Muller Hinton agar. Dischetti sterili del diametro di 6 mm sono stati depositi sulle piastre seminate, imbibiti con 15 microlitri di soluzione in esame ed incubati 24-72 ore a 25°C. È stato inoltre determinato il valore delle M.I.C. (Minimum Inhibitory Concentration) e delle M.B.C. (Minimum Bactericidal Concentration) dopo aggiunta di Tween 80 alla concentrazione finale dello 0,5% e diluizioni seriali (dal 10 allo 0,01%) I saggi sono stati effettuati su 6 ceppi batterici ATCC (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella tiphimurium*), 3 ceppi di origine clinica (*Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*), 2 ceppi di origine ambientale (*Vibrio vulnificus*, *Vibrio alginolyticus*). L'attività degli oli essenziali è stata valutata anche su 3 lieviti di provenienza clinica: *Rodotorula rubra*, *Candida albicans* e *Candida glabrata*. La tossicità degli oli essenziali è stata saggiata su cellule Hep-2 (cellule epiteliali di carcinoma umano della laringe), poste a contatto con gli oli essenziali (sterilizzati con filtri da 0,22 µm) a concentrazioni di 10%, 1%, 0,1% e 0,01% (v/v) e l'effetto sulle cellule valutato fino alle 24 ore.

Risultati

Per quanto riguarda i risultati degli aromatogrammi, gli oli essenziali di melaleuca e rosmarino (fig.1) evidenziano il maggiore spettro d'azione agendo sul 92% dei ceppi microbici saggiati, seguono cannella, chiodi di garofano e menta con inibizione dell'83% dei microrganismi, salvia con inibizione del 75% ed infine lavanda ed elicriso inibiscono la crescita del 67% dei ceppi microbici testati. L'attività antimicrobica di *Melaleuca alternifolia* è nota ed oggetto di diversi lavori scientifici (7), i nostri risultati sono, in generale, in accordo con quanto già pubblicato.

Riguardo l'olio essenziale di rosmarino, ha agito su candide, *A. sobria*, *A. hydrophila* e *V. vulnificus*, diluito fino al 6% (v/v) determinando su agar aloni di inibizione della crescita di 20-25 mm di diametro.

Gli oli di cannella e menta agiscono inibendo la crescita delle candide, diluiti fino a concentrazioni del 6% (v/v); la cannella agisce diluita al 12% (v/v) su *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. hydrophila* e *V. vulnificus*, mentre la menta agisce solo su *E. coli*, infatti l'azione antibatterica su tutti gli altri ceppi è limitata all'estratto puro. Anche i risultati ottenuti con olio essenziale di chiodi di garofano sono, in generale, in accordo con quanto già pubblicato (3).

Per quanto riguarda la salvia, agisce a diluizioni fino al 50% (v/v) su *E. coli*, *A. sobria*, *A. hydrophila* e *V. vulnificus* con dimensioni degli aloni di inibizione della crescita inferiori a 16 mm.

Riguardo lavanda ed elicriso, di un certo interesse potrebbe essere l'azione inibente che hanno dimostrato su *C. albicans*, , seppure alla diluizione del 12% (v/v), hanno formato aloni di soli 12 mm di diametro.

Per una migliore valutazione della attività antimicrobica di alcuni oli essenziali è stata valutata la minima concentrazione inibente (M.I.C.) e la minima concentrazione battericida (M.C.B.) mantenendo le stesse condizioni di temperatura di incubazione (25°C).

La tabella I mostra l'attività antimicrobica espressa dagli oli essenziali con valori di MIC ed MBC (% v/v).

Come si osserva dalla tabella, oltre il 50% dei ceppi testati ha mostrato valori di M.I.C. equivalenti alle M.B.C. dimostrando azione battericida degli oli. L'estratto di mirto ha mostrato maggiore attività antimicrobica, su tutti i ceppi testati, con valori di M.B.C. tra 0.01 e 2.5% (v/v).

Per quanto riguarda la valutazione di tossicità, effettuata su cellule Hep-2, già dopo 1 h erano evidenti segni di sofferenza cellulare in presenza degli oli essenziali di menta, salvia, elicriso e rosmarino diluiti al 10%. Dopo 4h di contatto, tutti i suddetti oli essenziali già alla diluizione dell'1% mostravano effetto tossico. Dopo 24 h le cellule a contatto con gli oli essenziali diluiti allo 0.01% di rosmari-

Tabella I. MIC ed MCB degli oli essenziali sui diversi microrganismi.

Ceppi microbici	<i>Melaleuca alternifolia</i>		<i>Lavandula angustifolia</i>		<i>Rosmarinus officinalis</i>		<i>Salvia officinalis</i>		<i>Mentha piperita</i>		<i>Helichrysum italicum</i>		<i>Syzygium aromaticum</i>		<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	
	MIC	MCB	MIC	MCB	MIC	MCB	MIC	MCB	MIC	MCB	MIC	MCB	MIC	MCB	MIC	MCB
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	2.5	2.5	10	>10	2.5	2.5	5	10	2.5	2.5	5	10	5	10	2.5	2.5
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 24212	n.d.		n.d.		5	10	5	10	2.5	2.5	5	5	n.d.		n.d.	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2.5	2.5	n.d.		1	1	2.5	10	2.5	2.5	2.5	10	2.5	2.5	n.d.	
<i>Salmonella tiphimurium</i> ATCC 14028	2.5	2.5	2.5	2.5	1	2.5	2.5	10	1	10?	2.5	10	1	2.5	n.d.	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (clinical)	2.5	2.5	2.5	>10	1	1	2.5	10	1	10?	2.5	10	2.5	2.5	n.d.	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	2.5	10	10	>10	5	5	5	10	10	10	2.5	5	2.5	5	n.d.	
<i>Aeromonas sobria</i> (clinical)	2.5	10	10	>10	5	5	5	10	10	>10	2.5	5	2.5	5	n.d.	
<i>Aeromonas hydrophila</i> (clinical)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	5	2.5	5	2.5	5	2.5	5	n.d.	
<i>Vibrio vulnificus</i> (environmental)	0.01	1	1	1	0.01	0.01	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	0.1	1
<i>Vibrio alginolyticus</i> (environmental)	2.5	2.5	5	5	2.5	2.5	5	5	>10	>10	2.5	2.5	1	2.5	2.5	2.5
<i>Candida albicans</i> (clinical)	>10	>10	>10	>10	2.5	2.5	5	5	1	2.5	2.5	2.5	n.d.		1.6	1.6
<i>Candida glabrata</i> (clinical)	n.d.		n.d.		5	5	5	10	1	1	5	10	n.d.		n.d.	
<i>Rodotorula rubra</i> (clinical)	>10	>10	>10	>10	5	10	10	10	10	10	10	10	2.5	2.5	2.5	2.5

Legenda: M.I.C. Minimum Inhibitory Concentration M.C.B. Minimum Bactericidal Concentration
n.d. non determinato

no erano completamente distrutte, lo stesso effetto lo manifestano gli oli essenziali di salvia ed elicriso alla diluizione dello 0,1%, mentre la menta solo all'1%

Conclusioni

L'attività biologica degli oli essenziali è correlata alla composizione e configurazione strutturale dei singoli costituenti, alle caratteristiche dei loro gruppi funzionali e probabilmente alla interazione sinergica dei loro singoli componenti. I costituenti chimici di queste piante sono in continuo rapporto dinamico tra di loro e risentono di numerosi fattori endogeni ed esogeni. L'estrema variabilità quali-quantitativa dei

Figura 1. Aromatogramma di Rosmarinus officinalis.



principi attivi può influire sulla attività biologica, quindi sulla efficacia terapeutica ed anche sulla eventuale tossicità. E' fondamentale delineare esattamente la specie botanica, ma anche il chemiotipo, valutato in relazione al costituente preponderante dell'essenza. Il timo ha sette diversi chemiotipi, a seconda della prevalenza del timolo, carvacrolo, linalolo, 1,8-cineolo etc.; il rosmarino ha tre differenti chemiotipi, il chemiotipo a canfora, a bornil-acetato e ad 1,8-cineolo. Quindi non solo è importante valutare quale parte della pianta si utilizza, la natura pedologica e le caratteristiche climatiche del territorio, il periodo migliore di raccolta, cosiddetto tempo balsamico, ma anche la composizione qualitativa dell'estratto stesso. Questo potrebbe spiegare le differenze tra i nostri risultati e quelli di altri ricercatori, tenuto conto anche dei diversi sistemi di saggio impiegati.

Alcuni olii essenziali quali il rosmarino, meritano una particolare attenzione. La loro attività antimicrobica, nei confronti di ceppi di origine clinica ed ambientale, che hanno espresso numerosi fattori di patogenicità e resistenza a diversi farmaci, merita certamente studi più approfonditi (9, 12). Per quanto gli oli essenziali non siano mai utilizzati puri, occorre comunque valutare i rischi derivati da sovradosaggio: il mirto può provocare nausea, cefalea e depressione, il rosmarino determina disturbi gastrointestinali, delle vie urinarie e convulsioni (1). Per quanto riguarda le nostre essenze in particolare, saranno necessari ulteriori accertamenti sulla tossicità, sui meccanismi di penetrazione all'interno della cellula e sugli effetti cellulari, allo scopo di poter formulare prodotti terapeutici contenenti oli essenziali come alternativa naturale alla cura di alcune patologie.

Bibliografia

1. Campanini E. Dizionario di fitoterapia e piante medicinali. Lalitotipo, Settimo Milanese, pp. 602, 2000.
2. Cosentino S., Tuberoso C.I.G., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E., Palmas F. *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*. 29, 130-135, 1999.
3. Dorman H.J.D., Deans S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88, 308-316, 2000.
4. Firenzuoli F. Fitoterapia. Guida all'uso clinico delle piante medicinali. Masson s.p.a. Milano, III edizione, pp. 411, 2002.
5. Hayes A.J., Markovic B. Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citriodora* (Lemon myrtle). Part 1. Antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity. *Food and Chemical Toxicology*. 40, 535-543, 2002.
6. Juteau F., Masotti V., Bessière J.M., Dherbomez M., Viano J. Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil. *Fitoterapia*. 73, 532-535, 2002.
7. May J., Chan C.H., King A., Williams L., French G.L. Time-kill studies of the tea tree oils on clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 45, 639-643, 2000.
8. Schwob I., Bessiere J.M., Dherbomez M., Viano J. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hypericum coris*. *Fitoterapia*. 73, 511-513, 2002.
9. Sechi L.A., Deriu A., Falchi M.P., Fadda G., Zanetti S. Distribution of virulence genes in *Aeromonas* spp. isolated from Sardinian waters and from patients with diarrhoea. *Journal of Applied Microbiology*. 92 (2), 221-227, 2001.
10. Wan J., Wilcock A., Coventry M.J. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology*. 84, 152-158, 1998.
11. WHO "Natural" medicines: a Pandora's box. *WHO Drug Information*. 9 (3), 147-1995.
12. Zanetti S., Spanu T., Deriu A., Romano L., Sechi L.A., Fadda G. "In vitro" susceptibility of *Vibrio* spp. isolated from the environment. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 17 (5), 407-409, 2001.