

ATTIVITÀ ANTIMICOTICA DELL'OLIO ESSENZIALE DI *MENTHA SUAVEOLENS*

Letizia Angiolella (a), Elisabetta Vavala (a), Rino Ragno (b), Annarita Stringaro (c), Marisa Colone (c), Silvia Sivric (b), Gianni Sartorelli (b), Felicia Diodata D'Auria (a), Anna Teresa Palamara (a).

(a) Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica "G. Sanarelli", Sapienza Università di Roma

(b) Dipartimento di Chimica e Tecnologia del Farmaco, Sapienza Università di Roma

(c) Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Tra i funghi di interesse medico *Candida albicans*, fungo dimorfo, ricopre un ruolo di rilievo in quanto normalmente presente come commensale a livello del tratto gastrointestinale nell'ospite sano, ma in condizioni di immunosoppressione diviene predominante e patogeno. Altri miceti di rilievo sono rappresentati dal *Cryptococcus neoformans*, lievito capsulato, la cui capsula costituisce il principale fattore di virulenza e dai generi *Microsporium* e *Tricophyton*, funghi filamentosi dermatofiti, generalmente trasmessi dagli animali all'uomo, invadendo i tessuti cutanei e si nutrendosi di cheratina.

Il trattamento spesso inappropriato e prolungato con farmaci di sintesi ha determinato in alcuni casi il fallimento terapeutico a causa dello sviluppo della farmaco-resistenza. Tutto ciò ha spostato l'interesse verso l'utilizzo di sostanze naturali come valida alternativa ai farmaci di sintesi, verso i quali è più difficile lo sviluppo di farmacoresistenza per la loro composizione più complessa.

Uno studio svolto precedentemente sull'olio essenziale di *Mentha suaveolens* proveniente dal Marocco, i cui principi attivi sono stati identificati come pulegone, piperitenone ossido (PEO) e piperitone ossido (PO) in concentrazioni differenti a seconda della sottospecie esaminata (1, 2), ha messo in evidenza l'attività antimicrobica di quest'olio essenziale. Poiché questa pianta cresce spontaneamente nell'area mediterranea, ne abbiamo voluto studiare in particolare l'attività antimicotica del suo olio essenziale.

Materiali e metodi

L'analisi chimica dell'olio essenziale di *M. suaveolens* da noi utilizzato è stata effettuata mediante gascromatografia e spettrometria di massa e da tale analisi è risultata una prevalenza di PEO maggiore del 90%. Per questo studio sono stati saggiati 12 ceppi di *C. albicans* di diversa origine, natura e sensibilità ai farmaci di sintesi, 4 ceppi clinici di *C. neoformans* e 7 ceppi di funghi filamentosi di cui 2 appartenenti al genere *Microsporium* e 5 al genere *Tricophyton*.

Per determinare la MIC (minima concentrazione inibente) dell'olio essenziale di *M. suaveolens* è stato utilizzato il metodo delle micro-diluizioni secondo le modifiche apportate per gli oli essenziali (3). L'olio essenziale è stato diluito in RPMI 1640 addizionato con 0,001% v/v di Tween 80. Le diluizioni di olio essenziale, comprese tra 0,000488 e 0,5 % v/v, sono state poste in piastre Costar a 96 pozzetti, inoculate con 2×10^3 cellule e incubate a 28 °C per 24 ore.

Per valutare l'inibizione della formazione del tubo germinativo a carico dell'olio essenziale di *M. suaveolens* è stato eseguito il test del tubo germinativo su un ceppo di *C. albicans*. A tale

scopo 1.4×10^7 cellule sono incubate in 5 mL di RPMI 1640 contenente siero al 10% e olio essenziale alle seguenti concentrazioni: 0,0156 e 0,031% v/v e poste in agitazione a 37 °C. Ai tempi 0, 90, 240 minuti e 24 ore le cellule sono state prelevate, osservate e fotografate al microscopio ottico con un ingrandimento 40x.

Infine i lieviti sono stati visualizzati mediante microscopio elettronico a scansione Cambridge Stereoscan 360 (SEM). Per l'osservazione al SEM i campioni sono stati fissati per 20 min a temperatura ambiente mediante una soluzione di glutaraldeide al 2,5% v/v in *buffer* di cacodilato 0,01M (pH 7.4) contenente saccarosio al 2% (p/v), successivamente sono stati post-fissati con OsO₄ al 1% v/v per 1 ora, deidratati con etanolo e infine ricoperti con un sottile strato di oro (*coating* o metallizzazione).

I risultati ottenuti evidenziano che la MIC dell'olio essenziale di *M. suaveolens* testato su tutti i dodici ceppi di *C. albicans* è dello 0,125% v/v, mentre la MFC (minima concentrazione fungicida) è dello 0,250% v/v. L'olio essenziale utilizzato come controllo è stato il TTO (*tea tree oil*) che presenta una MIC dello 0,250% v/v, e una MFC dello 0,500% v/v. In tutti i casi l'olio essenziale di *M. suaveolens* presenta un'attività antimicotica leggermente maggiore al TTO come riportato nella Tabella 1.

Tabella 1. Minima Concentrazione Inibente (MIC) dell'olio essenziale di *Mentha suaveolens* e TTO in diversi ceppi di *Candida albicans*

<i>Candida albicans</i>	MIC <i>Mentha</i> v/v%	MIC TTO v/v%	MFC <i>Mentha</i> v/v%	MFC TTO v/v%
CO23	0,125	0,250	0,125	0,250
CO23RFK	0,125	0,250	0,250	0,250
CO23RFLU	0,125	0,250	0,250	0,500
CA2	0,125	0,250	0,125	0,250
3153	0,125	0,250	0,250	0,500
GR5	0,125	0,250	0,250	0,250
AIDS 6	0,125	0,250	0,250	0,500
AIDS 37	0,125	0,250	0,125	0,250
AIDS 68	0,125	0,250	0,250	0,250
AIDS 126	0,125	0,250	0,250	0,250
ATCC10231	0,125	0,250	0,125	0,250
ATCC20891	0,125	0,250	0,250	0,250
ATCC24433	0,125	0,250	0,125	0,250

Per quanto riguarda l'attività antimicotica dell'olio essenziale di *M. suaveolens* sui diversi ceppi di *Cryptococcus neoformans*, *Microsporium* e *Tricophyton*, la MIC nella maggior parte risulta compresa tra 0,03-0,125% v/v come riportato nella Tabella 2, in alcuni casi anche inferiori alle MIC riportate per *C. albicans* dimostrando quindi una buona attività antimicotica di questo olio essenziale sulle diverse specie fungine.

Tabella 2. Minima Concentrazione Inibente (MIC) in diversi ceppi di *Cryptococcus neoformans* e dermatofiti del genere *Microsporium* e *Trichophyton*

Ceppi utilizzati	MIC100		
	48h	72h	7gg
<i>Crypt. neoformans</i> 23159	0,03	0,03	0,03
<i>Crypt. neoformans</i> Volpe	0,03	0,03	0,03
<i>Crypt. neoformans</i> 3	0,03	0,03	0,03
<i>Crypt. neoformans</i> 4	0,03	0,03	0,03
<i>Trychopyton mentagroph</i> 54	/	0,125	/
<i>T. mentagrophytes</i> 4	/	0,06	/
<i>T. mentagroph.</i> 297	/	0,125	/
<i>Microsporium gypseum</i> 314	/	0,125	/
<i>Trichoph. violaceum</i> 254	/	0,06	/
<i>Trichoph. rubrum</i>	/	0,5	/
<i>Microsporium canis</i> 250	/	0,125	/

Poiché in *C. albicans* il dimorfismo rappresenta uno dei più importanti fattori di virulenza, è stata indotta la morfogenesi e successivamente è stata valutata la capacità dell’olio essenziale di *M. suaveolens* di inibire la formazione del tubo germinativo. I risultati ottenuti hanno evidenziato che l’olio essenziale di *M. suaveolens* è in grado di inibire la formazione del tubo germinativo al 100% entro 240 minuti e del 90% circa nelle 24 h anche a concentrazioni subinibenti dello 0,0156% v/v come illustrato in Figura 1.

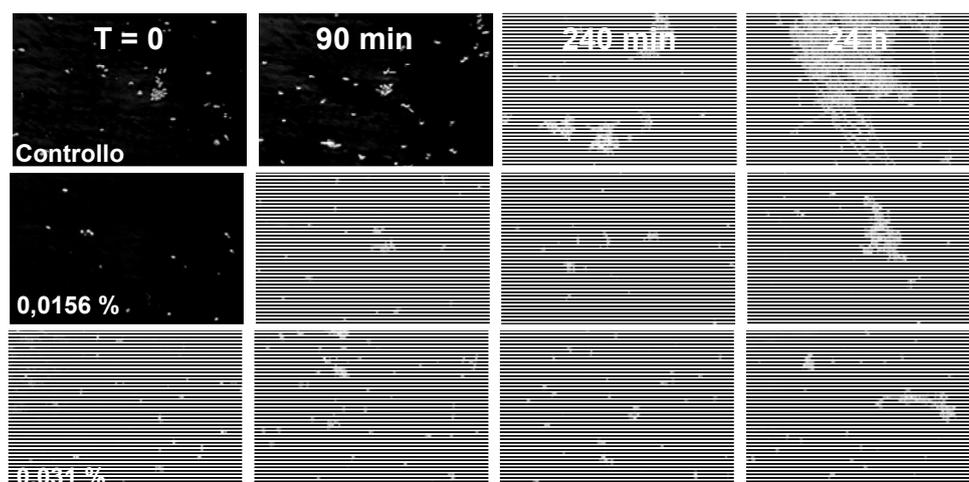


Figura 1. Inibizione del tubo germinativo in *Candida albicans* dopo contatto con l’olio essenziale di *M. suaveolens*

Allo scopo di studiare il meccanismo d’azione mediante il quale l’olio essenziale da noi studiato esercita la sua attività citotossica, sono state eseguite delle osservazioni al microscopio elettronico a scansione (SEM) che hanno messo in evidenza la presenza di significative alterazioni ultrastrutturali sulle cellule di *C. albicans*. Infatti, sulla superficie di numerose cellule di *Candida* è possibile osservare la presenza di “blebs” dopo trattamento con l’olio essenziale. Le “blebs” osservate quasi certamente interessano gli strati più superficiali della parete cellulare (Figura 2a, 1.5000x; Figura 2b, 12.500x).

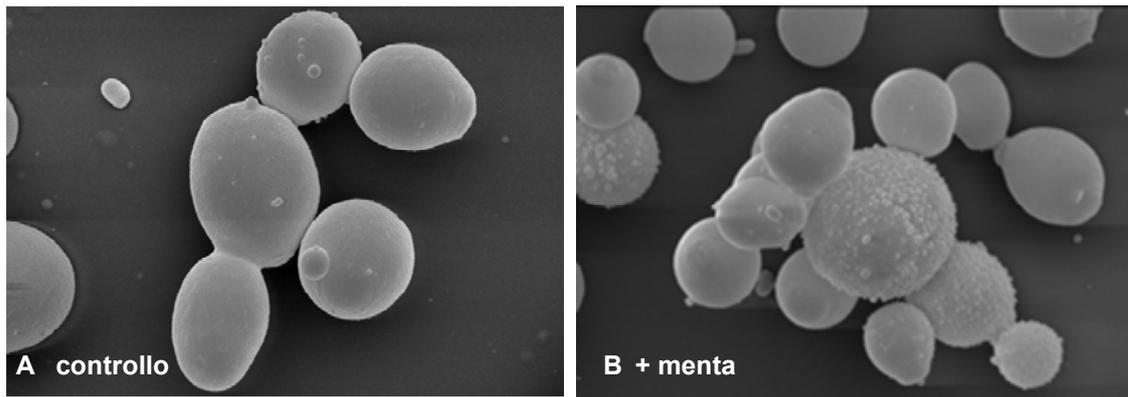


Figura 2. Osservazione al microscopio elettronico a scansione

In conclusione, i risultati ottenuti rivelano che l'olio essenziale di *M. suaveolens* possiede un'attività fungicida nei confronti di diversi tipi di miceti a concentrazioni molto basse. Inoltre, la sua capacità di inibire importanti fattori di virulenza di *C. albicans*, come la formazione del tubo germinativo e di provocare alterazioni a livello della parete cellulare anche in ceppi farmaco-resistenti, suggerisce l'impiego di questo olio essenziale come una valida alternativa ai farmaci di sintesi attualmente utilizzati nella terapia clinica.

Bibliografia

1. Ildrissi A, Bellakhdar J. Etude chimiotaxonomique de diverses populations de *Mentha suaveolens* EHRH. du Maroc: Nouvelles données. *AL BIRUNIYA, Rev Mar Phar* 1989;5:79-88.
2. Oumzil H, Ghouami S, Rhajaoui M, Ildrissi A, Fkih-Tetouani S, Faid M, Benjouad A. Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. *Phytother Res* 2002;16:727-31.
3. NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Second Edition: approved standard. NCCLS document M27-A2., Villanova, Pa., USA. 2002.