



# RAPPORTI ISTISAN 15|6

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

## Oli essenziali per la salute dell'uomo e la salvaguardia dell'ambiente

A cura di F. Mondello, A.M. Marella, M.G. Bellardi e M. Di Vito



FORMAZIONE  
E INFORMAZIONE



**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

**Oli essenziali per la salute dell'uomo  
e la salvaguardia dell'ambiente**

A cura di  
Francesca Mondello (a), Anna Maria Marella (a),  
Maria Grazia Bellardi (b) e Maura Di Vito (a)

*(a) Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate,  
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

*(b) Dipartimento di Scienze Agrarie, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, Bologna*

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

**Rapporti ISTISAN**  
**15/6**

Istituto Superiore di Sanità

**Oli essenziali per la salute dell'uomo e la salvaguardia dell'ambiente.**

A cura di Francesca Mondello, Anna Maria Marella, Maria Grazia Bellardi e Maura Di Vito  
2015, ii, 85 p. Rapporti ISTISAN 15/6

L'importante accordo Stato-Regioni, sancito il 7 febbraio 2013, demanda alle Regioni la formazione nell'ambito delle medicine complementari quali l'agopuntura, la fitoterapia e l'omeopatia. Inoltre, diversi studi scientifici hanno ormai evidenziato le potenzialità biologiche degli oli essenziali, parte integrante della fitoterapia, specialmente nella prevenzione e/o il trattamento di alcune patologie infettive. Per tali motivazioni l'Istituto Superiore di Sanità, con il supporto dell'associazione scientifica SIROE (Società Italiana per la Ricerca sugli Oli Essenziali), dell'ospedale San Filippo Neri e del Policlinico di Tor Vergata di Roma, ha proposto questo volume per riportare le attuali evidenze scientifiche relative alle varie proprietà biologiche degli oli essenziali, mettendo in particolare risalto l'attività citotossica e antimicrobica di quest'ultimi, quale alternativa potenziale contro la farmacoresistenza agli antibiotici. Questo documento, avvalendosi delle competenze di ricercatori e di docenti appartenenti a diverse realtà scientifiche italiane, si pone come valido strumento formativo per un approccio complementare in linea con le normative vigenti.

*Parole chiave:* Sostanze naturali; Oli essenziali; Fitoterapia; Malattie infettive; Medicina integrativa; Salute pubblica; Ambiente

Istituto Superiore di Sanità

**Essential oils for human health and the environment.**

Edited by Francesca Mondello, Anna Maria Marella, Maria Grazia Bellardi and Maura Di Vito  
2015, ii, 85 p. Rapporti ISTISAN 15/6 (in Italian)

The important State-Regions Agreement ratified on February 7<sup>th</sup> 2013 entrusts to the Regions the training in complementary medicine such as acupuncture, herbal medicine and homeopathy. Moreover, several scientific studies have shown the potential of natural essential oils, as an integral part of herbal medicine, especially in the prevention and/or treatment of some infectious diseases. For these reasons, the Istituto Superiore di Sanità, with the support of the scientific association SIROE (Società Italiana per la Ricerca sugli Oli Essenziali), San Filippo Neri Hospital and the Policlinico Tor Vergata of Rome, proposed this document to report the current scientific evidence relating to the various biological properties of essential oils, with special emphasis on the antimicrobial and cytotoxic activity of the latter, as a potential alternative to antibiotics against drug resistance. Drawing on the expertise of researchers and teachers from different Italian scientific institutions, this report stands as a valid training tool for a complementary approach in line with current regulations.

*Key words:* Natural products; Essential oils; Herbal medicine; Infectious diseases; Integrative medicine; Public health; Environment

Per informazioni su questo documento scrivere a: francesca.mondello@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it).

Citare questo documento come segue:

Mondello F, Marella AM, Bellardi MG, Di Vito M. (Ed.). *Oli essenziali per la salute dell'uomo e la salvaguardia dell'ambiente*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2015. (Rapporti ISTISAN 15/6).

---

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Gualtiero Ricciardi*  
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*  
Redazione: *Paola De Castro* e *Sandra Salinetti*  
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.



# INDICE

<b>Introduzione</b> <i>Francesca Mondello, Maria Grazia Bellardi, Paolo Campagna</i> .....	1
<b>Medicina aromatica in clinica umana</b> <i>Paolo Campagna</i> .....	3
<b>Aromatogramma</b> <i>Maura Di Vito, Antonietta Girolamo, Francesca Mondello</i> .....	7
<b>Oli essenziali nel trattamento delle infezioni fungine mucocutanee in oncologia</b> <i>Francesca Mondello, Antonietta Girolamo, Maura Di Vito</i> .....	12
<b>Profilassi per funghi invasivi con <i>Tea Tree Oil</i> e probiotici: studio <i>in vitro</i></b> <i>Maura Di Vito, Paola Mattarelli, Monica Modesto, Antonietta Girolamo, Milva Ballardini, Annunziata Tamburro, Marcello Meledandri, Francesca Mondello</i> .....	17
<b>Uso degli oli essenziali in endocrinologia</b> <i>Giacomo Tirabassi, Andrea Biagioli, Giancarlo Balercia</i> .....	20
<b>Oli essenziali: interazione con i farmaci <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i></b> <i>Filomena Corbo, Antonio Rosato</i> .....	23
<b>Ruoli ecofisiologici di oli essenziali e variabilità nella composizione chimica: caratterizzazione di chemotipi di pregio per l'industria agro-alimentare e la difesa ecosostenibile delle piante</b> <i>Marco Michelozzi</i> .....	27
<b>Profilo fitochimico degli oli essenziali</b> <i>Stefania Benvenuti</i> .....	31
<b>Potenzialità degli oli essenziali nelle malattie infettive</b> <i>Mondello Francesca, Antonietta Girolamo, Maura Di Vito</i> .....	33
<b>Microbiologia degli oli essenziali nelle infezioni fungine</b> <i>Vivian Tullio, Daniela Scalas, Narcisa Mandras</i> .....	40
<b>Attività antimicrobica dell'olio essenziale di <i>Myrtus communis</i> su <i>Mycobacterium</i> spp.</b> <i>Stefania Zanetti, Paola Molicotti, Sara Cannas</i> .....	44

<b>Efficacia strutturale e funzionale di una sinergia di oli essenziali e vegetali nell'anti-age cutaneo</b>	
<i>Mara Ramploud</i> .....	50
<b>Stress e oli essenziali</b>	
<i>Leonardo Paoluzzi, Paolo Campagna</i> .....	55
<b>Oli essenziali in prospettiva chirurgica nei pazienti nosocomiali</b>	
<i>Antonio Scafuri</i> .....	60
<b>Oli essenziali: controllo di qualità</b>	
<i>Carlo Bicchi, Patrizia Rubiolo</i> .....	62
<b>Oli essenziali in oncologia clinica</b>	
<i>Massimo Bonucci</i> .....	64
<b>Oli essenziali in oncologia</b>	
<i>Marisa Colone, Annarita Stringaro</i> .....	66
<b>Tecnica colturale e resa di piante officinali</b>	
<i>Sebastiano Delfine, Gabriella Stefania Scippa</i> .....	70
<b>Oli essenziali nella conservazione degli alimenti</b>	
<i>Annalisa Serio, Clemencia Chaves López, Giovanni Mazzarrino, Antonello Paparella</i> .....	73
<b>Possibili applicazioni degli oli essenziali in medicina veterinaria</b>	
<i>Maurizio Scozzoli</i> .....	76
<b>Oli essenziali in dermatologia veterinaria</b>	
<i>Francesca Pisseri</i> .....	81

## INTRODUZIONE

Francesca Mondello (a), Maria Grazia Bellardi (b), Paolo Campagna (c)

(a) *Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Dipartimento di Scienze Agrarie, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, Bologna*

(c) *Società Italiana per la Ricerca sugli Oli Essenziali, Roma*

Nell'ultimo ventennio abbiamo assistito ad una generale diffusione dell'uso delle Medicine Non Convenzionali (MNC), metodi di cura alternativi e complementari alle terapie classiche sanitarie, soprattutto nei Paesi industrializzati (oltre 11 milioni di cittadini italiani secondo Eurispes, e 150 milioni in Europa) che, come sistema di cura primario, utilizzano un modello scientifico biomedico. I motivi di tale diffusione, in base ai dati statistici, sono dovuti ad una richiesta sociale di umanizzazione della medicina, con minori effetti iatrogeni, con una informazione più sicura e con il rispetto del diritto di libera scelta terapeutica.

Nonostante alcune Risoluzioni europee dove si invitano gli Stati membri a regolamentare lo status delle MNC inserendole nei Servizi Sanitari Nazionali (SSN), in Italia, a tutt'oggi, non esiste una regolamentazione definita su questa materia. In mancanza di tale regolamentazione, da un lato i cittadini non sono tutelati sul piano della sicurezza e della qualità delle cure che ricevono e, dall'altro gli operatori qualificati non sono riconosciuti e certificati nella loro figura professionale. Inoltre, gli operatori sanitari non medici stanno occupando spazi professionali a loro non dovuti, con il rischio di incorrere nell'abuso di professione medica e di commettere atti nocivi ai cittadini per la mancanza delle fondamentali competenze mediche. Nell'ambito della formazione le Università sono anch'esse in difficoltà ad aprirsi a percorsi culturali e professionali diversificati.

In generale, la diffusione delle medicine complementari che si integrano con la medicina ufficiale è già attiva in diverse realtà della nostra penisola. Si possono, infatti, menzionare valide esperienze di integrazione nel Servizio Sanitario Nazionale (SSN) in diverse regioni: la Toscana ospita circa 100 ambulatori pubblici in cui le medicine complementari fanno a tutti gli effetti parte del sistema sanitario toscano e anche l'Emilia Romagna porta avanti un lavoro importante sulla ricerca e sulla valutazione di efficacia. Altre esperienze significative si ritrovano in Piemonte, Valle d'Aosta, Lombardia, Umbria e Campania.

Nell'importante accordo, sancito il 7 febbraio 2013 dalla Conferenza permanente per i rapporti tra lo Stato, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano, lo Stato demanda a quest'ultime la formazione nell'ambito delle medicine complementari, quali l'agopuntura, la fitoterapia e l'omeopatia.

Ultimamente, la ricerca scientifica ha avuto un discreto sviluppo nell'evidenziare le potenzialità biologiche degli oli essenziali, sostanze aromatiche di origine vegetale, che sono parte integrante della fitoterapia, raccogliendo prove di efficacia dei trattamenti complementari in diverse patologie (come ad esempio quelle dermatologiche, uro-ginecologiche, gastro-intestinali, respiratorie, neurologiche) e specialmente nella prevenzione e/o nel trattamento di alcune patologie infettive, anche farmaco-resistenti.

Per rispondere alle esigenze formative richieste, il Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), in collaborazione con la Società Italiana per la Ricerca sugli Oli Essenziali (SIROE), l'Ospedale San Filippo Neri e il Policlinico Tor Vergata di Roma ha realizzato un percorso formativo di quattro giornate per favorire la comprensione di questi particolari estratti fitoterapici, gli oli essenziali, in un approccio terapeutico complementare in diversi contesti correlati alla salute umana e alla

salvaguardia dell'ambiente, tramite l'apporto scientifico di ricercatori e docenti, membri SIROE, appartenenti a diverse Università italiane e ad importanti centri di ricerca quali l'ISS, il Centro Nazionale delle Ricerche (CNR) e il Consiglio per la sperimentazione e Ricerca in Agricoltura (CRA).

Obiettivi dell'evento formativo sono stati quelli di fornire ai partecipanti la capacità di individuare i criteri fondamentali per garantire qualità, sicurezza ed efficacia dei singoli oli essenziali, le modalità di applicazione e somministrazione per interventi preventivi e/o terapeutici, nonché le controindicazioni e gli effetti collaterali degli stessi. Per quanto riguarda la qualità, vista l'enorme variabilità e diversificazione che contraddistingue il Regno Vegetale da cui gli oli essenziali stessi hanno origine, è stata messa in evidenza la necessità primaria, in prospettiva di una tracciabilità e di una definizione chiara dell'olio essenziale tramite metodiche standard, di una caratterizzazione completa della pianta, ad iniziare dall'inquadramento botanico, comprendente il *fingerprinting* fitochimico, genetico-molecolare, fino all'indicazione delle ottimali condizioni agronomico-ambientali di crescita e lo status fitosanitario.

In particolare, sono state discusse e impartite nozioni relative ai potenziali usi, in termini di efficacia e sicurezza, degli oli essenziali in ambito medico, specie in dermatologia, gastroenterologia, endocrinologia, nelle patologie del sistema nervoso centrale, oltre che in ambito chirurgico generale, in oncologia e in traumatologia. Notevole rilevanza è stata riservata all'approccio delle malattie infettive, anche in alcune forme cliniche resistenti e recidivanti, non solo in ambito medico, ma anche in quello veterinario. Infine, è stato messo in luce l'uso agronomico degli oli essenziali finalizzato alla produzione e conservazione degli alimenti destinati all'uso umano e veterinario. Per sintetizzare il significato di questo evento formativo abbiamo cercato di realizzare un'operazione culturale multidisciplinare, rigorosamente scientifica, sempre nell'ottica di garantire e promuovere la tutela della salute pubblica e la salvaguardia dell'ambiente.

## MEDICINA AROMATICA IN CLINICA UMANA

Paolo Campagna

*Società Italiana per la Ricerca sugli Oli Essenziali, Roma*

Le basi razionali di un completo sviluppo clinico degli oli essenziali trovano oggi riscontro nell'aromaterapia francese (denominata appunto clinica), che considera la somministrazione degli oli essenziali anche oltre all'utilizzo topico o inalatorio, tramite enteroclistmi o preparazioni orali, sotto la scrupolosa supervisione di medici e all'interno di una molteplice strategia terapeutica rigorosamente allineata ai criteri della medicina accademica (a tale aromaterapia si ispira anche l'indirizzo normativo accordato dalla Commissione Europea di Bruxelles).

Lo straordinario potere di penetrazione e diffusibilità degli oli essenziali all'interno del corpo umano (risaputa almeno dai tempi di Teofrasto), ne ha comunque da tempo consolidato l'applicazione esterna che assume un suo distinto significato, permettendo tra l'altro di trarre benefici non irrilevanti anche tra alcuni oli essenziali che difficilmente potrebbero trovare impiego (per tossicità o causticità) per via interna (1).

L'uso degli oli essenziali in medicina trova oggi un razionale impiego nelle affezioni dermatologiche di varia eziologia, in ferite più o meno infette, in affezioni delle vie respiratorie batteriche e virali, nelle malattie dell'apparato gastro-intestinale, nelle patologie batteriche urinarie, nel trattamento dei parassiti intestinali e in genere anche in altre malattie infettive microbiche. L'aromaterapia trova poi spunto anche in patologie di ambito specialistico, come in neuropsichiatria e in ambito ginecologico, con interessi clinici di notevole prospettiva attribuiti rispettivamente a oli essenziali di *Lavandula officinalis*, *Citrus aurantium* var. amara fiori (neroli) e *Melaleuca alternifolia* (*Tea Tree Oil*, TTO) (1).

L'uso di questi preziosi estratti (distillazione in corrente di vapore, spremitura, CO<sub>2</sub> supercritica) può essere altresì proposto a integrazione della terapia medica convenzionale, secondo criteri di sinergia farmacologica ed efficacia. Il complesso meccanismo di azione, ostacolando la sopravvivenza dei microrganismi e rinforzando le difese immunitarie, non deteriorando la flora batterica intestinale e riducendo al minimo le resistenze, fa sì che alcuni oli essenziali possano essere usati come rimedi topici, inalatori o, in certi casi per uso interno, anche per la decolonizzazione di MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) (2) o per il trattamento integrativo di altre infezioni microbiche resistenti ai comuni antibiotici. La letteratura, infatti, ci propone ormai una miriade di lavori *in vitro*, significativi in fase preclinica, con risultati positivi, che avvalorano l'ipotesi di un potenziale impiego clinico degli oli essenziali in affezioni "difficili" umane come quelle da *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (3), *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niger* (4, 5) fino al *Clostridium difficile* e la stessa *Candida albicans* (4-7). Tra i componenti più attivi del TTO sembra proprio che il terpinen-4-olo sia il responsabile dell'attività *in vivo* anche su ceppi umani resistenti (7).

Gli oli essenziali che sembrano avere maggiore potenziale sinergico in tal caso sono proprio quelli più ricchi di alcoli e fenoli, ma anche di aldeidi, per cui si richiedono maggiore cautela e particolare esperienza e conoscenza nelle modalità di somministrazione e posologia, per evitare fenomeni di sensibilità, tossicità e accumulo.

Nelle infezioni batteriche con o senza sovrapposizioni fungine, ecco quindi gli oli essenziali puri e tipizzati di *M. alternifolia*, varie specie di timo tra cui *Thymus vulgaris*, *Corydanthum*

*capitatus*, *Origanum vulgare* e *Origanum compactum*, *Cinnamomum zeylanicum*, supportati da tante evidenze laboratoristiche e precliniche.

Si consigliano spesso gli oli essenziali puri tipizzati (a chemotipo), disciolti nella propoli nei pazienti con flogosi di interesse otorinolaringoiatrico e del cavo orale (gengivo-stomatiti anche aftose, mugugno, candidosi), sia nelle forme virali (molto frequenti) che in quelle batteriche, talvolta in associazione agli antibiotici di sintesi nelle forme miste di un certo impegno.

In altre situazioni ci si può avvalere invece di preparazioni come capsule molli oleose o opercoli di gelatina (gélules), con il vantaggio di moderarne la lesività gastrica, ridurre il contatto diretto con la mucosa e favorirne l'assorbimento tramite oli vegetali o altri eccipienti. Ciò avviene ad esempio nei casi di colon irritabile (*Irritable Bowel Syndrome*, IBS) laddove molto valida risulta la terapia *per os* con opercoli gastroresistenti di oli essenziali di *Mentha piperita*, efficaci almeno quanto la trimebutina, ma con alcune controindicazioni e avvertenze. L'uso topico comunque appare generalmente più sicuro, se vengono rispettate le norme di buona preparazione tramite veicoli adeguati e percentuali razionali. Ciò vale sia per le ferite chirurgiche che per le infezioni fungine, laddove i comuni antibiotici/antimicotici possono essere potenziati con l'aggiunta di particolari oli essenziali puri e tipizzati, a sostegno persino delle medicazioni usuali che si praticano in ambiente ospedaliero (8, 9). Uno studio clinico controllato ha recentemente valutato l'efficacia e la tollerabilità di un prodotto topico al 5% in oli essenziali di *M. alternifolia* vs placebo in pazienti con *tinea capitis* da *Pityrosporum ovale*. L'azione si manifesta a concentrazioni medie o medio-alte; data la sua notevole liposolubilità questo olio essenziale viene ben assorbito anche se utilizzato per via topica.

Uno studio *in vitro* ha esaminato l'effetto dell'olio essenziale di *Melaleuca* su germi prelevati dalla bocca. Si è visto che le MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) e le MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) variavano tra lo 0,003 e il 2%. Le MIC più alte si avevano per i ceppi di *Actinomyces* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguis*, mentre quelle più basse si riferivano ai ceppi *Prevotella* spp., isolati di *Porphyromonas*, *Prevotella* e *Veillonella*. I germi più resistenti erano specie di *Streptococcus*, *Fusobacterium* e *Lactobacillus*. Si è visto che l'olio essenziale di *M. alternifolia* allo 0,5% causava una riduzione significativa della crescita delle colonie di *Streptococcus mutans* e di *Lactobacillus rhamnosus*, con attività citocida sui batteri suddetti piuttosto evidente. I dati di questo studio indicano che il TTO può essere utile per il mantenimento dell'igiene orale (10).

Uno studio clinico controllato ha valutato se il prurito oculare associato alla demodicosi, rara parassitosi trasmessa dal cane, potesse essere trattato con un massaggio con un unguento contenente il 5% di TTO. Sono stati arruolati 24 pazienti trattati con la clorotetraciclina, che dovevano applicare l'unguento suddetto o un unguento placebo per 1 mese. Si esaminava ogni 2 settimane l'intensità del prurito. Si notava che l'unguento a base di TTO riduceva significativamente l'intensità del prurito ( $p < 0,05$ ) e che al termine del mese di trattamento 16 pazienti non avevano più prurito (11).

Recentemente si è assistito a inaspettate e interessanti verifiche antimicrobiche anche per oli essenziali tradizionalmente utilizzati in altri campi, come ad esempio *Pimpinella anisum*, nella chemotipizzazione a trans-anetolo, che ha mostrato *in vitro* un ampio spettro antimicrobico di medio grado se utilizzato da solo, se invece esso è combinato a sostanze naturali come polygodiale e nagilactone, grazie alla prevalenza di anetolo, ha dimostrato di possedere una significativa attività antifungina sinergica contro un lievito come *Saccharomyces cerevisiae* e un diffusissimo lievito patogeno opportunistico umano, la *Candida albicans* (12, 13); e così per la sinergia di oli essenziali di cannella con amfotericina B e clindamicina per particolari patologie e con vari disinfettanti per il trattamento di infezioni da *Staphylococcus epidermidis*, come confermato da esperienze *in vitro* su isolati clinici (14).

E ancora uno studio *in vitro* ha valutato se vi fosse un'azione sinergica antibatterica tra l'olio essenziale di *M. alternifolia*, di origano, di *Aniba rosaeodora* e di *Pelargonium graveolens* e la gentamicina. Si utilizzavano batteri sia Gram positivi sia Gram negativi. Si è visto che tutti questi oli essenziali avevano un'azione antibatterica sinergica con quella della gentamicina, con effetto migliore per la combinazione aniba + gentamicina e per quella pelargonium + gentamicina. Questa azione sinergica era molto marcata contro l'*Acinetobacter baumannii* ATCC19606. Lo studio indica che questi oli essenziali possono migliorare l'azione antibatterica della gentamicina (15).

Altra considerazione degna di nota nel campo microbiologico è poi che, dai risultati ottenuti in letteratura, è emerso che molti degli oli essenziali ritenuti più attivi (e tra essi l'immaneccabile TTO) che vengono normalmente testati, hanno in qualche modo un effetto sull'inibizione o sul rallentamento della produzione del biofilm. Tale inibizione è però molto variabile e influenzata da diversi fattori quali il ceppo testato, il metodo d'analisi utilizzato, l'olio essenziale e la sua concentrazione, oltre che il tempo di contatto (16).

Recenti problematiche inoltre li coinvolgono in interazioni farmacologiche con altri farmaci, in relazione alla metabolizzazione epatica (citocromo P450).

In conclusione, per una equilibrata somministrazione ambulatoriale medica degli oli essenziali, qualità e appropriatezza degli oli essenziali, posologia e durata dei cicli terapeutici, controllo di esami ematochimici, esperienza farmacologico-clinica e conoscenza del paziente, rappresentano senza dubbio i capisaldi del protocollo aromaterapico (17).

## Bibliografia

1. Campagna P. *Farmaci vegetali*. Torino: Minerva Medica editore; 2008.
2. Thompson G, *et al*. A randomized controlled trial of tea tree oil (5%) body wash versus standard body wash to prevent colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in critically ill adults: research protocol. *BMC Infect Dis* 2008;8:161.
3. Bouhdid S, Abrini J, Zhiri A, Espuny MJ, Manresa A. Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil. *J Appl Microbiol* 2009;106:1558-68.
4. Pinto E, Pina-Vaz C, Salgueiro L, Gonçalves MJ, Costa-de-Oliveira S, Cavaleiro C, Palmeira A, Rodrigues A, Martinez-de-Oliveira J. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J. Med Microbiol* 2006;55:1367-73.
5. Ribeiro Salgueiro L. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus capitellatus* against *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte strains. *Flavour and Fragrance Journal* 2006;5(21):749-53.
6. Chami F, Chami N, Bennis S, Trouillas J, Remmal A. Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:909-14.
7. Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Cassone A, Salvatore G. *In vivo* activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and resistant human pathogenic *Candida* species. *BMC Infect Dis* 2006;3(6):158.
8. Fadli M, Saad A, Chevalier J, Mezrioui NE, Pagès JM, Hassani L. Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine* 2012;19(5):464-71.
9. Stea S, Beraudi A, De Pasquale D. Essential oils for complementary treatment of surgical patients: state of the art. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014;2014:726341

10. Hammer KA, Dry L, Johnson M, Michalak EM, Carson CF, Riley TV. Susceptibility of oral bacteria to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil *in vitro*. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18(6):389-92.
11. Gao YY, Xu DL, Huang LJ, Wang R, Tseng SC. Treatment of ocular itching associated with ocular demodicosis by 5% Tea Tree Oil Ointment. *Cornea* 2012;31(1):14-7.
12. Kubo I, Himejima M. Anethole, a synergist of polygodial against filamentous microorganisms. *J Agric Food Chem* 1991;39(12):2290-2.
13. Kosalec I, Pepeljnjak S, Kustrak D. Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., Apiaceae). *Acta Pharmaceutica* 2006;55(4):377-85.
14. Langeveld WT, Veldhuizen EJ, Burt SA. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Crit Rev Microbiol* 2014;40(1):76-94.
15. Rosato A, Piarulli M, Corbo F, Muraglia M, Carone A, Vitali ME, Vitali C. *In vitro* synergistic antibacterial action of certain combinations of gentamicin and essential oils. *Curr Med Chem* 2010;17(28):3289-95.
16. Sudjana AN, Carson CF, Carson KC, Riley TV, Hammer KA. *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells and polystyrene and formation of biofilm is reduced by sub-inhibitory *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil. *Med Mycol* 2012;50(8):863-70.
17. Campagna P. *Lezioni di fitoaromaterapia, Corso triennale di Perfezionamento*. Viterbo: Università della Tuscia; 2014.

## AROMATOGRAMMA

Maura Di Vito, Antonietta Girolamo, Francesca Mondello  
 Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'aromatogramma è un test di suscettibilità *in vitro*, ispirato all'antibiogramma, che permette di determinare l'attività inibente che oli essenziali a nota attività antimicrobica e scelti secondo specifiche caratteristiche gascromatografiche esercitano sulla crescita microbica.

Fonti storiche riportano che il primo ad ideare la metodica fu, nel 1971, M. Girault; a questo ginecologo francese si deve lo sviluppo della tecnica con applicazione clinica anche se prima di lui altri studiosi, come Rideal, Walker, Schröder e Missing (1949) misero a punto un primo rudimentale metodo di misurazione del potere battericida degli oli essenziali; infine, alcune fonti fanno risalire a Gattefossé (1926), i primi usi empirici degli oli essenziali a scopo disinfettante (1).

Al fine di garantire un risultato di qualità è stato necessario, negli anni, standardizzare la metodica in modo da renderla ripetibile e in linea con quanto raccomandato dagli organi di controllo quali la *World Health Organization* (WHO) e il *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI).

L'aromatogramma è eseguito con le stesse modalità dell'antibiogramma, attraverso i metodi di diffusione su agar solido o di diluizione in brodo; ovvero seminando la specie batterica interessata in un terreno di coltura a contatto con concentrazioni scalari di oli essenziali e valutandone la crescita dopo un idoneo periodo di incubazione. L'azione inibente dell'olio essenziale viene quindi valutata misurando gli aloni di inibizione più o meno estesi, per i test eseguiti su agar solido, oppure mediante lettura della torbidità del terreno di crescita per i test eseguiti in brodo. Quest'ultimo è il metodo di riferimento per valutare la suscettibilità antimicrobica e, contestualmente, determinare la minima concentrazione inibente (*Minimum Inhibitory Concentration*, MIC), intesa come la più bassa concentrazione dell'agente antimicrobico in grado di inibire la crescita microbica *in vitro*.

Il metodo di diffusione su agar è il metodo qualitativo maggiormente usato per la realizzazione degli aromatogrammi ma, anche se apparentemente di facile esecuzione, presenta dei limiti quali la differente capacità di diffusione degli oli essenziali in agar e la variabilità operatore dipendente che, in un'analisi clinica di laboratorio, devono necessariamente essere superati. Inoltre, il metodo di diffusione in agar presenta il limite di essere un test solo di tipo qualitativo o al più semi-quantitativo cioè in grado di identificare la presenza o l'assenza di sensibilità del patogeno agli oli essenziali testati.

Secondo quanto delineato dalle linee guida dello *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) versioni 2.1 (2), 3.0 (3), 4.0 (4) dal 2012 in vigore presso tutti i laboratori di analisi italiani, per il test di diffusione in agar si usa un terreno nutritivo del tipo Mueller Hinton (MH), eventualmente modificato con l'aggiunta di sangue di montone per batteri più esigenti come ad esempio *Streptococcus* spp., *Haemophilus* spp. e *Listeria monocitogenes*. Questo terreno presenta un pH stabile tra 7,2-7,4 unità che permette non solo la crescita dei ceppi patogeni da analizzare ma anche la formazione di un alone di inibizione standard che potrebbe variare usando altri terreni caratterizzati sempre da carboidrati fermentabili ma con pH differenti. Differentemente, per gli aromatogrammi di lieviti è consigliabile l'uso di terreni del tipo Sabouraud Destrosio Agar.

Le linee guida internazionali definiscono non solo le condizioni di conservazione del terreno solido ma anche la quantità di terreno da usare nel test, e, nel particolare, circa 25 mL in piastra

circolare da 90 mm, 31 mL in piastra circolare da 100 mm, 71 mL in piastra circolare da 150 mm oppure 40 mL in una piastra quadrata da 100 millimetri (2-4).

La standardizzazione della quantità di terreno usata per l'esecuzione del test è importante perché, variazioni dello spessore, possono comportare una variazione degli aloni di inibizione causata da una diversa diffusione degli oli essenziali. Lo spessore ideale del gel, indicato nelle linee guida, è di 4 mm, in questo modo si garantisce una corretta e ripetibile diffusione dell'olio essenziale.

Di fondamentale importanza, per l'esecuzione di un buon test microbiologico, è la semina del germe patogeno. A questo proposito, nel caso di batteri, sarà preparato un inoculo del germe patogeno prelevando con un'ansa sterile circa 1-2 colonie di germi da risospendere in soluzione salina fino ad ottenere una torbidità al turbidimetro pari a 0,5 McFarland corrispondente a circa  $1-2 \times 10^8$  UFC (Unità Formanti Colonia)/mL.

Il brodo così ottenuto sarà seminato sul terreno di coltura imbevendo un tamponcino sterile nella soluzione e strisciandolo, nelle tre dimensioni, su tutta la superficie dell'agar. Dopo la semina di un'ideale quantità di sospensione batterica e con l'aiuto di pinzette sterili, saranno posti sull'agar uno o più dischi di carta assorbente (del tipo Whatman) del diametro di 6 mm precedentemente impregnati con oli essenziali a differenti diluizioni.

Considerata la natura idrofila dell'olio essenziale è necessario che quest'ultimo venga solubilizzato in un idoneo veicolo (dimetilsolfossido, DMSO, al 10%; o Tween 80 allo 0,5% in v/v) per facilitarne la diffusione in agar.

I dischi, così trattati e posizionati, dovranno distare tra loro e dal bordo della piastra non meno di 2 cm per evitare sovrapposizioni degli aloni di inibizione e, comunque, dovranno essere distinti per colore o per contrassegno dell'iniziale dell'olio essenziale o della sua diluizione. Inoltre, il disco di carta Whatman sarà posto sulla piastra Petri, applicando una leggera pressione, non prima di cinque minuti e non oltre i quindici minuti dall'inoculo del germe patogeno poiché ciò permette all'agar di asciugarsi senza però ottenere la pre-incubazione del germe antecedente l'apposizione dei dischi (2-5).

Alcuni autori riportano un ulteriore trattamento dei dischi, precedente alla fase impregnante, caratterizzato da immersione in alcol 90° e successiva sterilizzazione a 110°C (6); i dischi, così trattati, potranno essere conservati per periodi non superiori ai 3 mesi se posti in contenitori sterili e in idonee condizioni di conservazione.

Come è noto, gli oli essenziali sono caratterizzati sia da principi attivi in forma liquida che volatili. Pertanto, per evitare che alcuni principi attivi volatili interferiscano tra loro producendo risultati non ripetibili e compromettendo la corretta interpretazione del dato, non si dovranno posizionare, nella stessa piastra Petri, più dischi imbevuti ciascuno con un differente olio essenziale.

I primi ad ipotizzare un'azione delle componenti volatili sono stati Park *et al.* (7). Quest'ultimi dopo aver sperimentalmente osservato che le uniche componenti dell'olio essenziale in grado effettivamente di diffondere sul terreno solido erano quelle idrosolubili, mentre le altre evaporavano oppure permanevano sul dischetto di nitrocellulosa, conclusero che, con il test di agar diffusione, si poteva ottenere un'alterata stima delle reali potenzialità antibatteriche degli oli essenziali caratterizzati da componenti attivi volatili.

Successivamente, altri autori notarono come, in alcuni casi, le componenti volatili erano in grado di determinare l'aumento degli aloni di inibizione, poiché, dopo un'iniziale evaporazione dell'olio essenziale depositato in piastra, si poteva verificare una nuova deposizione di questo per condensazione. Per verificare quanto detto è stato necessario modificare il test classico di agar diffusione in modo da renderlo semi-quantitativo e in grado di quantificare realmente l'incidenza delle componenti volatili sulla formazione dell'alone di inibizione.

Per la modifica del test classico è stato sufficiente porre il disco imbevuto di olio essenziale in adesione al coperchio della Petri evitando il contatto diretto con l'agar seminato; in questo modo, solo le componenti volatili dell'olio essenziale, evaporando, potevano raggiungere le colonie ed esercitare la loro azione inibente. Misurando l'alone di inibizione così ottenuto e relativizzandolo a quello sviluppato con il test classico di agar diffusione, è possibile ottenere una stima semi-quantitativa della reale azione delle componenti volatili di un olio essenziale.

Dopo aver introdotto per ogni test una piastra di controllo, tutte le piastre seminate saranno incubate per 16-20 ore (24-48 ore per i lieviti) a  $35\pm 1^\circ\text{C}$  e, a seconda del germe da studiare, in presenza di  $\text{CO}_2$  alla concentrazione del 4-6%. (2, 3, 4, 8).

Al termine del tempo di incubazione sarà possibile valutare l'inibizione esercitata da ciascun olio essenziale misurando il diametro di inibizione della crescita batterica.

Riportando i valori rilevati su di un grafico avente per ascisse il nome degli oli essenziali testati e in ordinate la misura dei diametri espressa in mm, sarà possibile individuare gli oli essenziali che esercitano la maggiore azione inibente distinguendoli da quelli che ne esercitano una minore. Questo grafico rappresenterebbe il "profilo aromatico" del germe preso in considerazione.

È bene ricordare di eseguire il test con un olio essenziale titolato nel suo contenuto chimico mediante gascromatografia e appartenente allo stesso lotto che sarà poi usato *in vivo*; solo in questo modo sarà possibile evitare il fattore confondente della naturale variabilità chimico-fisica di ciascun olio essenziale che potrebbe risolversi con un effetto batteriostatico o battericida differente.

Sempre al fine di uniformare le metodiche e individuare parametri di riferimento comuni, Paul Belaiche ideò un "indice aromatico", attraverso il quale indicare il potere battericida di un dato olio essenziale relativamente ad uno "ideale". Tale indice si ottiene attraverso calcoli non del tutto immediati rapportando l'alone di inibizione dell'olio essenziale in esame espresso in mm, al nominatore, e quello di un olio essenziale "ideale" con elevato potere battericida, al denominatore. L'indice aromatico (secondo Belaiche) consente quindi al medico di poter individuare il potere germicida di un olio essenziale nei confronti di un germe, e tanto più l'indice aromatico ha valori prossimi ad 1 quanto più il suo potere battericida sarà elevato e prossimo a quello dell'olio essenziale "ideale" (9). L'olio essenziale di *Origanum vulgare* è tra gli oli essenziali noti quello ad oggi ancora più potente, presentando un indice aromatico prossimo al valore 1 (precisamente 0,87), e, proprio per questa caratteristica, l'indice aromatico viene anche indicato come "indice di origano".

Altri autori, tra cui Paul Belaiche, basandosi sulla sperimentazione di Allegrini hanno indentificato in un test quantitativo in fase liquida, il sistema più indaginoso ma certamente più affidabile per ottenere valori quantitativi di MIC e minime concentrazioni battericide (*Minimum Bactericidal Concentration*, MBC). Oggi, il test di diluizione in brodo, eseguito secondo linee guida internazionali, è considerato il test di riferimento per lo studio della sensibilità microbica verso un dato agente antimicrobico e, se eseguito con gli oli essenziali, rende i dati ottenuti dal test paragonabili a quelli ottenuti dagli antibiogrammi eseguiti con gli antibiotici di sintesi.

Il metodo di diluizione in brodo è un test di suscettibilità in cui una concentrazione standard dell'agente patogeno è messa a contatto, in terreno di coltura liquido, con diluizioni scalari (generalmente a raddoppio) di un agente antimicrobico. Quando il test di brodo diluizione è eseguito in micropiastre con pozzetti di capacità inferiore a  $300\ \mu\text{L}$ /pozzetto è denominato "test di microdiluizione in brodo".

Anche per questi test l'EUCAST ha individuato e descritto il metodo nei minimi dettagli sia per l'applicazione del test a ceppi batterici (10) che a ceppi fungini (11-13).

Il test che maggiormente si presta per l'automazione e l'esecuzione in un laboratorio di analisi è il test di microdiluizione in brodo. Questo test prevede l'uso di brodo liquido MH per

lo studio della sensibilità batterica e di brodo liquido RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) per lo studio della sensibilità di ceppi fungini.

Anche in questo caso per miscelare una fase idrofoba (olio essenziale) in una idrofila (brodo di coltura) è necessario usare un tensioattivo come veicolo che, nella nostra esperienza è da individuare nel Tween 80 alla concentrazione di 0,001% v/v (14).

Passato il tempo di incubazione sarà possibile individuare la diluizione dell'olio essenziale corrispondente alla MIC intesa come la concentrazione più bassa alla quale non si osserverà crescita batterica attraverso la lettura della piastra a 96 pozzetti visuale e spettrofotometrica con lettore di micropiastre.

Infine, per valutare se la MIC corrisponde anche alla MBC si procede seminando il contenuto dei pozzetti, senza crescita visibile, su agar nutritivo e incubando il tutto a  $35\pm 1$  °C per ulteriori 24 ore. Trascorso il tempo di incubazione sarà possibile valutare la MBC individuando la diluizione più bassa alla quale non si osserva crescita batterica, a questa diluizione corrisponderà la minima concentrazione dell'olio essenziale in grado di esercitare un'azione battericida.

Il test di microdiluizione in brodo è facilmente riproducibile se ripetuto con lo stesso germe, con lo stesso olio essenziale e se effettuato nelle stesse condizioni sperimentali. È possibile per eliminare la variabilità dovuta alla manualità dell'operatore e quindi per una maggiore riproducibilità della sperimentazione anche la congelazione delle micropiastre, contenenti le diluizioni scalari dell'olio essenziale, che si possono conservare in tal modo (a -80°C) per almeno un anno.

È però importante ricordare che le dosi degli oli essenziali ammesse per trattamenti *per os* raggiungono una concentrazione ematica che è sempre nettamente inferiore alle concentrazioni minime inibenti rilevate *in vitro* e che comunque, essendo gli oli essenziali estremamente dannosi se ingeriti ad alte dosi, diventa necessario per l'operatore individuare la minima concentrazione *in vitro*, che sia contestualmente efficace, sicura e non tossica *in vivo*. Quindi per questi ultimi aspetti è necessario considerare anche gli studi relativi alla farmacocinetica e alla farmacodinamica dei singoli oli essenziali, dati quest'ultimi, ad oggi ancora non ben delineati.

## Bibliografia

1. Firenzuoli F (Ed.). *Gli oli essenziali. Dai profumi all'aromaterapia*. Milano: Tecniche Nuove. 2002.
2. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Antimicrobial Susceptibility Testing—EUCAST Disc Diffusion Method: Version 2.1*. Växjö, Sweden: EUCAST; 2012.
3. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Reading guide. EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing. Version 3.0*. Växjö, Sweden: EUCAST; 2013.
4. Matuschek E, Brown DF J, Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: O255–O266.
5. Camporese A (Ed.). *Oli essenziali e malattie infettive. Terapia antimicrobica ragionata con gli oli essenziali*. Milano: Tecniche Nuove; 1998.
6. Duraffourd C, Lapraz JC, Valnet J (Ed.). *Cura delle malattie con piante e aromi*. Firenze-Milano: Giunti Editore; 2004.
7. Park CM, Taormina PJ, Beuchat LR. Efficacy of allyl isothiocyanate in killing enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. *Int J Food Microbiol* 2000;56(1):13-20.

8. Mondello F, Girolamo A, Scaturro M, Ricci ML. Determination of *Legionella pneumophila* susceptibility to *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil by an improved broth micro-dilution method under vapour controlled conditions. *J Microbiol Methods* 2009;77(2):243-8.
9. Campanini E (Ed.). *Ricettario medico di fitoterapia*. Milano: Tecniche Nuove. 2005.
10. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection* 2003;9:1-7.
11. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), Rodríguez-Tudela JL, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M, Denning D, Donnelly JP, Dupont B, Fegeler W, Moore C, Richardson M, Verweij PE. Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. *Clinical Microbiology and Infection* 2003;9:1-8.
12. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST Definitive Document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts *Clin Microbiol Infect* 2008;14:398-405.
13. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W and the EUCAST-AFST. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). *Clin Microbiol Infect* 2012; 8:E246-E247.
14. Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Cassone A, Salvatore G. *In vivo* activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. *BMC Infect Dis* 2006;6:158.

## OLI ESSENZIALI NEL TRATTAMENTO DELLE INFEZIONI FUNGINE MUCOCUTANEE IN ONCOLOGIA

Francesca Mondello, Antonietta Girolamo, Maura Di Vito

Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Le terapie anticancro possono favorire gravi infezioni microbiche a causa della tossicità e degli effetti immunodepressivi indotti dalle radiazioni o dai chemioterapici che vengono utilizzati per controllare la diffusione delle cellule neoplastiche (1, 2). Le infezioni fungine, causate principalmente da alcune specie opportunistiche del lievito *Candida*, sono molto comuni nei pazienti oncologici in tutte le fasi della malattia (3, 4). Queste infezioni sono in genere limitate ai siti mucocutanei, ma possono diffondere anche agli organi interni, se non controllate adeguatamente, portando ad infezioni invasive con alta mortalità nei soggetti debilitati. Infatti, l'uso improprio e l'abuso di farmaci antifungini può causare la comparsa di lieviti resistenti, in particolare la selezione di ceppi azolo-resistenti di *Candida albicans*, il principale agente di infezione fungina mucocutanea (5); la capacità, in particolare di quest'ultimo germe, di crescere sotto forma di denso biofilm ifale (6, 7) su mucose e protesi riduce ulteriormente l'efficacia della maggior parte degli agenti antifungini (8); infine la mancanza di cooperazione da parte del sistema immunitario, provoca una parziale efficacia terapeutica o la comparsa di resistenza ai farmaci impiegati.

È urgente quindi la necessità di identificare nuovi metodi di prevenzione e trattamenti integrativi e/o alternativi soprattutto per contrastare gli effetti tossici delle terapie antimicrobiche convenzionali, il galoppante fenomeno dell'antibiotico-resistenza e la stessa scarsità di nuovi antibiotici.

Nell'ultimo ventennio vi è stato un interesse crescente da parte degli enti scientifici per l'uso delle sostanze naturali nell'ambito delle malattie infettive, con l'obiettivo di sviluppare nuove classi di antimicrobici sicuri ed efficaci da poter usare in alternativa o a integrazione con le terapie convenzionali, per prevenire e/o migliorare il trattamento di alcune patologie infettive, specialmente farmacoresistenti in pazienti immunocompromessi. Tra le sostanze naturali la letteratura scientifica ha da tempo riportato ed evidenziato i vantaggi, in termini di ampio spettro di attività biologiche, di biodegradabilità e di esigua tossicità, degli oli essenziali, complesse misture di sostanze vegetali volatili estratte da piante medicinali aromatiche.

Il presente contributo ha lo scopo di evidenziare, secondo quanto riscontrato in letteratura, il potenziale preventivo e/o terapeutico degli oli essenziali e dei loro costituenti che vengono usati, spesso anche aneddoticamente, per il trattamento di infezioni fungine mucocutanee in oncologia.

Un grande numero di oli essenziali e di loro costituenti sono stati ben caratterizzati *in vitro* per la loro attività nei confronti di lieviti, di dermatofiti e di altri funghi filamentosi. Tuttavia i dati microbiologico-clinici promettenti sono spesso insufficienti, aneddotici e non basati sull'uso di metodologie validate e di modelli sperimentali con buona predittività per l'uso clinico. Inoltre spesso gli oli essenziali utilizzati nella ricerca non rispondono ai requisiti di buona qualità, in quanto si tratta di misture poco definite di vari composti.

Ci si focalizzerà quindi sulle proprietà preventive e/o terapeutiche dell'olio di *Melaleuca alternifolia* (*Tea Tree Oil*, TTO), miscela che merita particolare considerazione, sia perché la sua composizione è regolata dalla norma internazionale standard ISO 4730 per TTO (9) e dalla farmacopea europea (Tabella 1) (10), sia perché per tali requisiti è stato oggetto di molti studi

rigorosamente scientifici (11, 12), e infine perché si è dimostrato recentemente il minimo impatto sullo sviluppo di resistenza microbica (13).

**Tabella 1. Principali componenti di *Melaleuca alternifolia*, chemotipo terpinene-4-olo, secondo Farmacopea Europea e ISO 4730:2004**

Costituenti	Farmacopea Europea		ISO 4730:2004	
	minimo %	massimo %	minimo %	massimo %
Alfa-pinene	1,0	6,0	1	6
Sabinene	-	3,5	Tracce	3,5
Alfa-terpinene	5,0	13,0	5	13
Limonene	0,5	4,0	0,5	1,5
1,8-cineolo	-	15,0	Tracce	15
Gamma-terpinene	10,0	28,0	10	28
p-Cimene	0,5	12,0	0,5	8
Terpinolene	1,5	5,0	1,5	5
Terpinene-4-olo	30,0	-	30	48
Aromadendrene	-	7,0	Tracce	3
Alfa-terpineolo	1,5	8,0	1,5	8
Delta-cadinene	-	-	Tracce	3
Globulolo	-	-	Tracce	1
Viridoflorolo	-	-	Tracce	1
Viridoflorene	-	-	Tracce	3

Il TTO è una complessa miscela ottenuta tramite distillazione a vapore delle foglie della pianta australiana *Melaleuca alternifolia*, con circa 100 componenti (idrocarburi terpenici, principalmente monoterpeni, sesquiterpeni, con i loro alcoli associati). Sono 7 i componenti che costituiscono l'80-90% del TTO e i componenti, terpinene-4-olo (40% della miscela) (T-4-olo) insieme all' $\alpha$ -terpineolo (circa 3% della miscela) risultano i maggiori responsabili dell'attività antimicrobica.

Studi hanno dimostrato l'attività antinfiammatoria (14), e l'attività antimicrobica contro un ampio spettro di microrganismi, tra cui germi comunemente isolati, a livello orale, da pazienti oncologici, come lo *Staphylococcus aureus* (MRSA, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, incluso) (15, 16), germi coliformi (17), e il virus *Herpes simplex* (18), le cui gravi e continue riattivazioni, costituiscono un ulteriore importante problema clinico per i malati terminali.

Il TTO presenta anche una potente attività contro molti funghi, tra cui alcuni lieviti azolo-resistenti (19, 20), con evidenza di efficacia nel trattamento della candidosi orale refrattaria al fluconazolo in pazienti affetti da AIDS (22, 23). Gli studi preclinici di Mondello F. (19, 23, 24) hanno dato un sostanziale supporto a precedenti evidenze empiriche e scientifiche sull'efficacia del trattamento della candidosi vaginale con TTO, soprattutto quando l'infezione è causata da specie di *C. albicans* farmaco-resistenti. È stata dimostrata, per la prima volta *in vivo*, l'elevata attività antifungina del TTO al 5% v/v e del principale componente della miscela, T-4-olo all'1% v/v, in un modello di infezione sperimentale di *C. albicans* nella ratte, modello molto stringente e predittivo della terapia della vaginite da *Candida* nelle donne, anche con l'uso di ceppi resistenti agli azolici o alla caspofungina. Tuttavia per determinare l'indice terapeutico di TTO e di T-4-olo contro la candidosi vulvovaginale ricorrente, verso la quale attualmente nessuna cura eradicante è disponibile, sono indispensabili ulteriori studi clinici randomizzati controllati.

L'efficacia terapeutica di TTO e di T-4-olo sono stati dimostrati anche in un modello murino di candidosi orale con una diminuzione dei sintomi e del numero di cellule vitali di *Candida* nella cavità orale solo dopo due ore dal trattamento antifungino, anche nei confronti di ceppi di *C. albicans* resistenti (25).

Negli studi riportati da Ramage G. (26) viene valutata l'efficacia anti-biofilm e anti-infiammatoria del TTO e dei suoi componenti nei confronti di *C. albicans* e gli eventuali effetti citotossici. In particolare hanno dimostrato che: TTO e T-4-olo hanno la capacità potenziale di sopprimere mediatori infiammatori, che sono comuni nelle mucose dei malati oncologici; TTO, T-4-olo e  $\alpha$ -terpineolo esercitano una potente attività microbica, in funzione del tempo di esposizione, nei confronti di biofilm di *C. albicans* e soprattutto i componenti risultano significativamente più attivi del TTO anche a livello dell'alterazione delle membrane cellulari. Inoltre TTO e T-4-olo risultano biologicamente attivi contro cellule di mammiferi, essendo tossici sia per fibroblasti che per cellule epiteliali alla dose di una MIC<sub>50</sub> (*Minimum Inhibitory Concentration*: la concentrazione più bassa di antibiotico capace di inibire il 50% dei ceppi microbici testati), riducendo la vitalità anche dopo una breve esposizione (2 min). Dimezzando la MIC<sub>50</sub>, T-4-olo non presenta alcuna tossicità contro fibroblasti (98% vitalità) rispetto al TTO (63% vitalità). A questa stessa dose T-4-olo e TTO non sono però tossici per le cellule epiteliali (100% vitali). In generale per quanto riguarda gli studi di citotossicità i dati non sono facilmente comparabili in quanto gli studi presenti in letteratura sono rivolti a linee cellulari di vario tipo, con dosi di oli essenziali e tempi di esposizione differenti.

Uno studio recente (27) ha mostrato che l'attività anti-infiammatoria del T-4-olo può rappresentare un ruolo chiave ai fini dell'efficacia terapeutica contro la candidosi orale. Anche se sono necessari ulteriori studi, T-4-olo potrebbe essere utilizzato non solo nella terapia della candidosi orale, ma anche nei confronti di varie malattie di natura infiammatoria.

Gli studi clinici di Jandourek A. (21) e di Vasquez J.A. (22) hanno esaminato l'efficacia di due formulazioni di collutorio contenenti TTO in pazienti HIV-positivi con candidosi orofaringea refrattaria al fluconazolo, mettendo in evidenza riduzioni significative sia delle cellule lievito infettanti, sia delle lesioni orali. Questo è stato osservato sia con la formulazione in fase acquosa, sia con quella contenente alcol, anche se a quest'ultima tuttavia è stata associata una moderata sensazione di bruciore nella cavità orale. Entrambi i colluttori sono clinicamente efficaci in pazienti affetti da HIV con candidosi orale, ma ulteriori studi clinici sono necessari.

Ormai molti prodotti a base di TTO per l'igiene delle mucose sono disponibili in commercio. In generale, i prodotti antisettici con TTO hanno mostrato un'attività antimicrobica equivalente o maggiore a quella del controllo a base di TTO non formulato (28). La maggiore attività dei prodotti può essere attribuita ad altri eccipienti antimicrobici presenti come conservanti, o alle interazioni antimicrobiche sinergiche tra il TTO e altri eccipienti presenti nel prodotto.

I dati attuali in vitro suggeriscono che questi prodotti a base di TTO, attualmente disponibili in commercio, possono anche essere attivi in vivo e portano alla considerazione di un eventuale utilizzo per la prevenzione e il trattamento di infezioni fungine mucocutanee. Tuttavia, sono state riportati alcuni fattori negativi in alcune formulazioni orali quali le reazioni di ipersensibilità e il sapore sgradevole dell'olio essenziale e inoltre devono essere esaminati con attenzione anche la *compliance* del paziente e la potenziale tossicità del TTO. Tutto ciò può essere valutato opportunamente solo attraverso ulteriori studi e sperimentazioni cliniche. Nel complesso, i risultati della letteratura scientifica suggeriscono che TTO e T-4-olo potrebbero potenzialmente prevenire o risolvere le infezioni fungine mucocutanee nei pazienti oncologici grazie alla loro efficacia antimicrobica, anti-infiammatoria, alle potenziali sinergie con antifungini convenzionali, e alla bassa tossicità riportata, insieme ai dati promettenti provenienti da studi pre-clinici. Inoltre l'uso del T-4-olo, come componente purificato attivo del TTO, potrebbe evitare costosi controlli di qualità impiegati generalmente nella utilizzazione di miscele

e potrebbe essere più appropriato per lo sviluppo di prodotti per uso topico. Tuttavia ulteriori studi clinici randomizzati controllati sono necessari per determinare l'efficacia e i rischi di questi prodotti di origine vegetale nel trattamento delle infezioni fungine mucocutanee nei pazienti oncologici.

## Bibliografia

1. Wingard JR. Oral complications of cancer therapies. Infectious and non-infectious systemic consequences. *NCI Monogr* 1990;9:21-6.
2. Sonis ST, Fey EG. Oral complications of cancer therapy. *Oncology (Williston Park)* 2002;16:680-6; Discussion 686, 691-2, 695.
3. Redding SW, Dahiya MC, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Patterson TF, Fothergill AW, Rinaldi MG, Thomas CR Jr. *Candida glabrata* is an emerging cause of oropharyngeal candidiasis in patients receiving radiation for head and neck cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:47-52.
4. Davies AN, Brailsford SR, Beighton D. Oral candidosis in patients with advanced cancer. *Oral Oncol* 2006; 42: 698-702.
5. Bagg J, Sweeney MP, Lewis MA, Jackson MS, Coleman D, Al MA, Baxter W, McEndrick S, McHugh S. High prevalence of non-albicans yeasts and detection of anti-fungal resistance in the oral flora of patients with advanced cancer. *Palliat Med* 2003;17:477-81.
6. Ganguly S, Mitchell AP. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol* 2011;14:380-5.
7. Ramage G, López-Ribot JL. Fungal biofilms and drug resistance. In: San Blas G, Calderone RA (Ed.). *Pathogenic fungi: host interactions and emerging strategies for control*. Norwich: Horizon Scientific Press; 2004. Chapter 11.
8. d'Enfert C. Biofilms and their role in the resistance of pathogenic *Candida* to antifungal agents. *Curr Drug Targets* 2006;7:465-70.
9. ISO 4730:2004. *Oil of Melaleuca, Terpinen-4-ol type (Tea Tree Oil)*. Geneva: International Organization for Standardization; 2004.
10. European Medicines Agency. *Assessment Report on Melaleuca alternifolia (Maiden and Betch) Cheel, M. linariifolia Smith, M. dissitiflora F. Mueller and/or other species of Melaleuca, aetheroleum*. London: EMA; 2013. (EMA/HMPC/320930/2012).
11. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:50-62.
12. Hammer KA, Carson CF, Riley TV, Nielsen JB. A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Food Chem Toxicol* 2006;44:616-25.
13. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil and the major monoterpene component terpinen-4-ol on the development of single- and multistep antibiotic resistance and antimicrobial susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:909-15.
14. Brand C, Grimbaldston MA, Gamble JR, Drew J, Finlay-Jones JJ, Hart PH. Tea tree oil reduces the swelling associated with the efferent phase of a contact hypersensitivity response. *Inflamm Res* 2002;51:236-44.
15. Dryden MS, Dailly S, Crouch M. A randomized, controlled trial of tea tree topical preparations versus a standard topical regimen for the clearance of MRSA colonization. *J Hosp Infect* 2004;56:283-6.

16. Kwiecinski J, Eick S, Wojcik K. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase. *Int J Antimicrob Agents* 2009;33:343-7.
17. Jobbins J, Bagg J, Parsons K, Finlay I, Addy M, R.G. Newcombe. Oral carriage of yeasts, coliforms and staphylococci in patients with advanced malignant disease *J Oral Pathol Med* 1992;21(7):305-8.
18. Carson CF, Ashton L, Dry L, Smith DW, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil gel (6%) for the treatment of recurrent herpes labialis. *J Antimicrob Chemother* 2001;48:450-1.
19. Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Salvatore G, Cassone A. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic yeasts. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:1223-9.
20. Bagg J, Jackson MS, Petrina Sweeney M, Ramage G, Davies AN. Susceptibility to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil of yeasts isolated from the mouths of patients with advanced cancer. *Oral Oncol* 2006;42:487-92.
21. Jandourek A, Vaishampayan JK, Vazquez JA. Efficacy of melaleuca oral solution for the treatment of fluconazole refractory oral candidiasis in AIDS patients. *AIDS* 1998;9:1033-7.
22. Vazquez JA, Zawawi AA. Efficacy of alcohol-based and alcohol-free melaleuca oral solution for the treatment of fluconazole-refractory oropharyngeal candidiasis in patients with AIDS. *HIV Clin Trials* 2002;3:379-85.
23. Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Cassone A, Salvatore G. *In vivo* activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. *BMC Infect Dis* 2006;6:158.
24. Mondello F, Girolamo A, De Bernardis F, Cassone A. Componenti di oli essenziali e vaginite ricorrente da *Candida albicans*: un promettente e innovativo approccio terapeutico. In: Facchinetti F, Unfer V (Ed.). *Fitoterapia e integratori in ostetricia e ginecologia*. Roma: CIC Edizioni Internazionali; 2009. p. 78-84.
25. Ninomiya K, Maruyama N, Inoue S, Ishibashi H, Takizawa T, Oshima H, Abe S. The essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) and its main component, terpinen-4-ol protect mice from experimental oral candidiasis. *Biol Pharm Bull* 2012;35(6):861-5.
26. Ramage G, Milligan S, Lappin DF, Sherry L, Sweeney P, Williams C, Bagg J, Culshaw S. Antifungal, cytotoxic, and immunomodulatory properties of tea tree oil and its derivative components: potential role in management of oral candidosis in cancer patients. *Front Microbiol* 2012;3:220.
27. Ninomiya K, Hayama K, Ishijima Sa, Maruyama N, Irie H, Kurihara J, Abe S. Suppression of inflammatory reactions by terpinen-4-ol, a main constituent of tea tree oil, in a murine model of oral candidiasis and its suppressive activity to cytokine production of macrophages *in vitro*. *Biol Pharm Bull* 2013; 36(5):838-44.
28. Thomsen PS, Jensen TM, Hammer KA, Carson CF, Mølgaard P, Riley TV. Survey of the antimicrobial activity of commercially available Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil products *in vitro*. *J Altern Complement Med* 2011;17:835-41.

## PROFILASSI PER FUNGHI INVASIVI CON *TEA TREE OIL* E PROBIOTICI: STUDIO *IN VITRO*

Maura Di Vito (a,b), Paola Mattarelli (c), Monica Modesto (c), Antonietta Girolamo (b),  
 Milva Ballardini (a), Annunziata Tamburro (a), Marcello Meledandri (a), Francesca Mondello (b)  
 (a) *Unità Operativa Complessa Microbiologia e Virologia, Ospedale San Filippo Neri, Roma*  
 (b) *Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma*  
 (c) *Dipartimento di Scienze Agrarie, Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, Bologna*

Dati in letteratura indicano che l'incidenza di candidosi è maggiore nelle donne in gravidanza rispetto alle altre e che il trattamento topico per le candidosi non è spesso sufficiente a decontaminare completamente il microambiente vaginale tanto che, frequentemente, si verificano recidive. Studi in letteratura per la prevalenza delle candidosi vaginali indicano che circa il 13% delle donne non in gravidanza ha recidive per la candidosi. Questa percentuale aumenta nelle gestanti che, pur necessitando di un trattamento preventivo per ridurre il rischio di contagio del neonato durante il parto, non possono essere trattate con i più comuni interventi antimicotici poiché controindicati in gravidanza. (1-2).

Una recente analisi condotta tra il 1988 e il 2008 conclude che, anche se nel corso degli anni il numero assoluto di decessi neonatali da infezione è diminuito, la percentuale delle infezioni nei nati prematuri è progressivamente aumentata (12,1%, 13,6% e 14,9%) e, parallelamente, anche la percentuale dei parti pretermine (14%, 24% e 38%). L'aumento del tasso di mortalità infantile (*Infant Mortality Rate*, IMR) per infezioni ha per agenti eziologici maggiori *Escherichia coli* e *Candida* spp. (3).

Altri dati indicano che la colonizzazione da *Candida* spp. non solo è significativamente più alta in gravidanza rispetto alle donne non in gravidanza (rispettivamente 31,4% vs 19,9%;  $\chi^2=5,59$ ;  $P=0,018$ ), ma è anche più spesso asintomatica (46,5% vs. 16%;  $\chi^2=42,31$ ;  $P<0,0001$ ). Inoltre, è noto che le gestanti colonizzate da *Candida* spp. sviluppano più frequentemente infezioni asintomatiche (58,1% vs 30,8%;  $\chi^2=6,18$ ;  $P=0,013$ ) (4).

In Italia, una percentuale compresa tra 9-15% dei nati pretermine con peso alla nascita molto basso saranno colonizzati da funghi durante il primo mese di vita nella terapia intensiva neonatale dove la colonizzazione è individuata generalmente la terzo giorno dalla nascita (88% dei casi) e particolarmente in siti di colonizzazione quali l'ano (88,8%), la cavità orale (66,6%) e il moncone ombelicale (55%) (5-6).

Quanto detto rappresenta un importante fattore di rischio per i nati prematuri considerato che il transito vaginale e gli interventi necessari per assistere il parto possono contagiare il neonato pretermine inducendo lo sviluppo di Infezioni Fungine Sistemiche (IFI).

Le IFI sono la 3<sup>a</sup> causa di morte nei neonati prematuri con peso alla nascita <1500 g mentre, nei nati con peso alla nascita <1000 g, sono la causa del 30% circa delle mortalità e del 50% della compromissione dello sviluppo neurologico, rilevata nei sopravvissuti. Per questo motivo i neonati nati da madri con tampone vaginale positivo per la ricerca dei miceti, ed essi stessi colonizzati, nei primi giorni di vita possono subire trattamenti di profilassi con formulazioni a base di azolici (generalmente fungistatici e non fungicidi), mentre, per i neonati che evolvono in IFI il trattamento elettivo è a base di Amphotericina B (7).

Per quanto detto e per il disagio generato dalle infezioni recidivanti, sempre più frequentemente, sotto indicazione medica o per automedicazione, popolazioni sensibili, incluse

le donne in gravidanza o i bambini, assumono prodotti, facilmente reperibili presso le farmacie e a base di sostanze naturali per la cura e/o prevenzione di patologie (8).

Il *Tea Tree Oil* (TTO), olio essenziale derivato dalla distillazione delle foglie dell'albero *Melaleuca alternifolia*, nativo dell'Australia, è noto da molti anni alla medicina tradizionale aborigena per le proprietà antisettiche. È noto che, tradizionalmente è usato come sostanza naturale nel trattamento di infezioni fungine e batteriche con applicazioni topiche su cute, piaghe superficiali e mucose. Questo uso tradizionale è stato recentemente validato anche attraverso ricerche scientifiche. Attualmente, il TTO è tra i pochi oli essenziali ad essere contestualmente inserito nella 7<sup>a</sup> Farmacopea Europea e, contestualmente, monografato dall'agenzia di medicina europea (*European Medicines Agency*, EMA) che ne ha riconosciuto l'uso tradizionale e pubblicato la relativa monografia (9) prevedendone l'uso tradizionale in prodotti reperibili nelle erboristerie e farmacie (8). In ogni caso, nonostante il diffuso impiego tradizionale nel trattamento delle infezioni fungine, sono ancora poche le evidenze scientifiche *in vitro* e *in vivo* ottenute nel contesto ginecologico.

Lo scopo finale del nostro studio sarà quello di valutare l'effetto di una profilassi combinata nel tempo con la terapia convenzionale, a base di azolici, prescritta di routine alle gestanti nel trattamento delle candidosi vaginali. Tale profilassi prevede l'utilizzo di una formulazione in ovuli vaginali a base di TTO (Candinorm® Pegaso), registrata come dispositivo medico di classe prima presso il Ministero della Salute, e già in studio post marketing.

Vengono riportati i risultati preliminari *in vitro* ottenuti con l'ausilio di test microbiologici eseguiti secondo linee guida internazionali (CLSI) studiando l'azione fungicida e battericida, di ovuli a base di TTO, rispettivamente su 19 ceppi di *Candida* spp. (in particolare, 2 ceppi di riferimento *C. albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* ATCC 201380, un ceppo di *C. albicans* azolo-resistente ed uno sensibile fortemente vaginopatico oltre a 15 ceppi di *Candida* isolati presso l'ospedale San Filippo Neri di Roma) e su 3 ceppi probiotici appartenenti al microbiota vaginale [1 ceppo di riferimento *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (DSM 10140) e 2 ceppi, *Lactobacillus casei* R-215 e *Lactobacillus acidophilus* R-52, isolati da AxiDophilus® Pegaso].

Dal nostro studio *in vitro* risulta che sia gli ovuli che il TTO hanno mostrato, su tutti i ceppi di *Candida* spp. testati, l'azione fungicida a 24, 48 e 72 ore; mentre il placebo e il gel di aloe non hanno mostrato alcuna azione fungicida o fungi statica.

Inoltre, dallo studio dell'azione esercitata su ceppi probiotici appartenenti al microbiota è emerso che dopo 4 gg in anaerobiosi solo il ceppo di riferimento di *Bifidobacterium animalis* risulta inibito nella crescita, mentre non si osserva alcuna inibizione per tutti i ceppi di *Lactobacillus* spp. Nel particolare, i test di microdiluzione in brodo mostrano un'azione inibente del TTO solo per concentrazioni  $\geq 4\%$  mentre, per concentrazioni  $\leq 2\%$ , sia tutti i ceppi probiotici testati restano vitali.

I dati ottenuti mostrano come gli ovuli a base di TTO abbiano *in vitro* un'azione fungicida selettiva, anche nei confronti di ceppi di *Candida albicans* resistenti agli azolici, lasciando pressoché inalterata la vitalità dei probiotici testati. Il nostro studio sperimentale risulta promettente al fine di ridurre recidive e cronicità della candidosi vaginale, senza effetti tossici collaterali, ma sono necessari adeguati studi clinici controllati e randomizzati per confermare quanto rilevato *in vitro*.

## Ringraziamenti

Il progetto è stato parzialmente finanziato dal Fellowship Program 2014 di Gilead.

## Bibliografia

1. Foxman B, Muraglia R, Dietz JP, Sobel JD, Wagner J. Prevalence of recurrent vulvovaginal candidiasis in 5 European Countries and the US: Results from an Internet Panel Survey. *Low Genit Tract Dis* 2013;17(3):340-5.
2. Mendling W, Brasch J; German Society for Gynecology and Obstetrics; Working Group for Infections and Infectimmunology in Gynecology and Obstetrics; German Society of Dermatology, the Board of German Dermatologists; German Speaking Mycological Society. Guideline vulvovaginal candidosis (2010) of the German Society for Gynecology and Obstetrics, the Working Group for Infections and Infectimmunology in Gynecology and Obstetrics, the German Society of Dermatology, the Board of German Dermatologists and the German Speaking Mycological Society. *Mycoses* 2012;55 Suppl 3:1-13.
3. Williams EJ, Embleton ND, Bythell M, Ward Platt MP, Berrington JE. Acta Paediatr. The changing profile of infant mortality from bacterial, viral and fungal infection over two decades. *Acta Paediatr* 2013;102(10):999-1004.
4. Leli C, Mencacci A, Meucci M, Bietolini C, Vitali M, Farinelli S, Dè Alò F, Bombaci JC, Perito S, Bistoni F. Association of pregnancy and *Candida* vaginal colonization in women with or without symptoms of vulvovaginitis. *Minerva Ginecol* 2013;65(3):303-9.
5. de Waure C, Cadeddu C, Gualano MR, La Torre G, Ricciardi W. Epidemiologia, fisiopatologia e diagnosi delle patologie da *Candida* spp. *IJPH* 2010;7(4):S1-S14.
6. Ali GY, Algohary EH, Rashed KA, Almoghanum M, Khalifa AA. Prevalence of *Candida* colonization in preterm newborns and VLBW in neonatal intensive care unit: role of maternal colonization as a risk factor in transmission of disease. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012;25(6):789-95.
7. Hundalani S, Pammi M. Invasive fungal infections in newborns and current management strategies. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013;11(7):709-21.
8. Scientific Committee on Consumer Products. *Opinion on tea tree oil*. Brussels: European Commission; 2008. (SCCP/1155/08).
9. European Medicines Agency. *Assessment Report on Melaleuca alternifolia (Maiden and Betch) Cheel, M. linariifolia Smith, M. dissitiflora F. Mueller and/or other species of Melaleuca, aetheroleum*. London: EMA; 2013. (EMA/HMPC/320930/2012).

## USO DEGLI OLI ESSENZIALI IN ENDOCRINOLOGIA

Giacomo Tirabassi, Andrea Biagioli, Giancarlo Balercia

*Clinica di Endocrinologia, Dipartimento di Scienze Cliniche e Molecolari, Università Politecnica delle Marche, Ancona*

Gli oli essenziali sono estratti naturali di piante officinali ottenuti attraverso processi di distillazione, spremitura, *enfleurage* o solventi. Per la semplicità della tecnica estrattiva e per l'abbondanza di piante officinali presenti in ogni habitat, ogni civiltà a partire dalle più antiche, ha scoperto l'uso degli oli essenziali non solo nelle pratiche religiose, ma anche nelle rudimentali cure mediche. Anche se questi composti officinali sono ormai noti da millenni, non c'è un consenso univoco sulla loro efficacia né, tantomeno, alcuna indicazione scientifica nei riguardi di specifiche patologie. Tuttavia ogni anno aumenta il numero di studi osservazionali che riportano l'efficacia di qualche estratto nel contrastare, prevenire l'insorgenza o mitigare gli effetti di qualche patologia cronica.

### Fitoterapia e malattie del metabolismo

Diversi studi (1) condotti negli ultimi dieci anni hanno riportato l'efficacia di estratti di Cannella, Coriandolo e Aneto nel contrastare l'insorgenza del diabete o nel migliorare il profilo ematochimico dei pazienti affetti.

Il *Coriandrum sativum* (coriandolo o prezzemolo cinese), conosciuto anche con il nome spagnolo cilantro, è una pianta erbacea annuale della famiglia delle Apiaceae (ex Umbelliferae). Appartiene alla stessa famiglia botanica del cumino, dell'aneto, del finocchio e del prezzemolo. Tradizionalmente viene somministrato come infuso per attenuare sintomatologie digestive, ma recentemente gli è stata attribuita la capacità di ridurre i livelli di glicemia attraverso due meccanismi: l'aumento della secrezione insulinica e un'azione insulino-simile a livello cellulare. Inoltre, l'olio di semi di coriandolo migliora il profilo lipidico riducendo i livelli di colesterolo totale, trigliceridi e LDL (2).

Il *Cinnamomum zeylanicum* (cannella), impiegato nella forma della corteccia e delle foglie essiccate o come estratto oleoso puro o diluito in olio di oliva, è utilizzato da centinaia di anni per le sue proprietà curative in molte patologie, in particolare nelle medicine orientali, ma attualmente anche nelle medicine occidentali per contrastare i reumatismi, lo stress e abbassare la pressione arteriosa. Il principio attivo (presente a seconda delle preparazioni tra il 60% e il 90%) è l'aldeide cinnamica, una molecola fortemente reattiva che interagisce con numerosi enzimi e recettori nel nostro organismo. Ultimamente, una metanalisi che ha considerato 540 pazienti provenienti da diversi studi ha dimostrato come l'estratto di corteccia di cannella migliori il profilo lipidico riducendo i livelli di colesterolo totale e trigliceridi e aumentando il colesterolo HDL; questa sostanza inoltre migliora i livelli di glicemia (3).

Gli acidi grassi a catena media e i monogliceridi presenti nell'olio di cocco (*Cocos nucifera*) sono gli stessi presenti nel latte materno e possiedono un potente effetto anti-infiammatorio e antimicrobico attraverso la distruzione delle strutture lipidiche batteriche. L'acido laurico, il suo metabolita monolaurico e altri acidi grassi presenti nell'olio di cocco sono in grado di distruggere le diverse popolazioni microbiche e allo stesso tempo risultano inefficaci nei confronti della flora intestinale. Una *review* del 2002 della McGill University riporta una serie

di studi condotti sull'uso degli oli a catena media per contrastare l'obesità. Il risultato della metanalisi dimostra come sostituendo nell'alimentazione gli acidi grassi a catena lunga con quelli a catena media un soggetto obeso può perdere dai 5 ai 16 chilogrammi all'anno (4).

Il *Myrtus communis* L. (mirto), sia in forma di foglie che di olio essenziale, è da sempre usato nella medicina turca come rimedio naturale per abbassare i livelli di glucosio. Questo effetto, attribuito in maniera empirica, ha ricevuto conferma laboratoristica. Un gruppo di ricercatori turchi ha, infatti, testato l'efficacia dell'olio essenziale di mirto su un modello di coniglio diabetico indotto. I parametri laboratoristici dimostravano che la somministrazione dell'olio riduce i livelli di glicemia del 51% a 4 ore dalla somministrazione e che la dose ottimale di tale composto è di 50mg/kg. Inoltre questo olio riduce i livelli di trigliceridi ma non altera l'insulinemia (5).

Un altro composto attivo sul metabolismo è l'olio essenziale di *Carthamus tinctorius* L. (cartamo). Il cartamo è una pianta utilizzata in tutto il mondo, dalle note proprietà analgesiche e antipiretiche, spesso utilizzato per contrastare i dolori premestruali. Il suo olio essenziale contiene cariofillene, p-alliltoluene, 1-acetossitetralina ed eicossani, sostanze efficaci sia nel ridurre l'assorbimento dei grassi, migliorando il profilo lipidico, sia nel prevenire la perdita della componente ossea riducendo l'attività osteoclastica (6).

## Oli essenziali e fertilità

Oltre al miglioramento metabolico, la cannella e i suoi derivati hanno proprietà multifattoriali quali l'azione antiossidante, antinfiammatoria e antidiabetica. Il *Cinnamomum zeylanicum* e la sua variante selvatica *Cinnamomum osmophloeum kanehira* sono stati utilizzati recentemente da un gruppo di ricerca turco su un modello sperimentale animale. Dodici ratti Wistar maschi sani sono stati divisi in due gruppi, ognuno di sei ratti. Mentre al gruppo di controllo è stato dato olio di oliva, all'altro gruppo sono stati somministrati 100 mg/kg di *cinnamon (Cinnamomum zeylanicum) bark oil (CBO)* con somministrazione giornaliera per 10 settimane. Nei ratti trattati con CBO rispetto al gruppo di controllo sono stati osservati una significativa diminuzione dei livelli della malondialdeide e l'incremento marcato dei livelli del glutatione ridotto, delle attività della glutatione perossidasi e della catalasi. Il consumo di CBO comportava un incremento significativo del peso dei testicoli e degli epididimi, della concentrazione spermatica negli epididimi, della motilità degli spermatozoi e del diametro dei tubuli seminiferi, rispetto al gruppo di controllo (7).

Sembra invece dimostrata, l'efficacia dell'olio essenziale di *Satureja khuzestanica*, una pianta nativa dell'Iran, che ha dimostrato *in vitro* e *in vivo* effetti sulla potenza, fecondità e fertilità. Studi condotti su modelli murini hanno riportato come questo olio aumenti in maniera significativa sia i parametri clinici, sia a livello istologico il numero di spermatogoni, spermatidi, Leydig e causi una ipertrofia delle cellule del Sertoli (8).

## Oli essenziali e osteoporosi

Un ulteriore campo di utilizzo molto descritto per gli oli essenziali è la prevenzione dell'osteoporosi. In una *review* del 2002, Mühlbauer *et al.* (9) hanno elencato quali piante presentano una attività anti-osteoporotica e i rispettivi meccanismi d'azione. L'elenco è molto ampio, ma le piante che sembrano avere maggiore efficacia appartengono alla famiglia delle erbe comuni (oli essenziali di salvia, rosmarino, ginepro, pino, pino nano ed eucalipto). Per

esempio, l'olio essenziale di pino si è dimostrato efficace nel prevenire la perdita di massa ossea in un modello murino di ratta ovariectomizzata. I monoterpeni contenuti in questi oli (es. timolo, borneolo e camfora) sono inibitori diretti dell'attività osteoclastica. Altri monoterpeni non polari agiscono solo dopo attivazione metabolica, ad esempio il cis-verbanolo, metabolita dell' $\alpha$ -pinene è un potente inibitore osteoclastico mentre il  $\alpha$ -pinene è inerte. Alcuni di questi metaboliti sono così efficaci da avere effetti rapidi, per esempio già dopo 30 minuti dalla somministrazione di borneolo si osserva la scomparsa degli anelli di attivazione, una caratteristica morfologica dell'attivazione osteoclastica.

Un altro composto che sembra prevenire la perdita di massa ossea agendo sugli osteoclasti è l'olio essenziale di *Curcuma longa* (curcuma). Un'équipe cinese ha recentemente dimostrato come tale estratto inibisca direttamente il RANK-ligando riducendo la differenziazione degli osteoclasti in maniera dose-dipendente. Sembra inoltre che l'olio blocchi l'espressione di mRNA prodotto dagli osteoclasti riducendo l'espressione di fosfatasi alcalina tartrato-resistente (TRAP), il recettore per la calcitonina e catepsina K, tutte proteine essenziali per l'attività osteoclastica (10).

## Bibliografia

1. Srinivasan K. Plant foods in the management of diabetes mellitus: spices as beneficial antidiabetic food adjuncts. *Int J Food Sci Nutr* 2005;56:399-414.
2. Mohamed FR, Afify Amer MM, El-Said AA. Coriander seed oil improves plasma lipid profile in rats fed a diet containing cholesterol. *European Food Resource Technology* 2008;227:1173-82.
3. Allen RW, Schwartzman E, Baker WL, Coleman CI, Phung OJ. Cinnamon use in type 2 diabetes: an updated systematic review and meta-analysis. *Ann Fam Med* 2013;11:452-9.
4. St-Onge MP, Jones PJ. Physiological effects of medium-chain triglycerides: potential agents in the prevention of obesity. *J Nutr* 2002;132:329-32.
5. Sepici A, Gürbüz I, Cevik C, Yesilada E. Hypoglycaemic effects of myrtle oil in normal and alloxan-diabetic rabbits. *J Ethnopharmacol.* 2004;93:311-8.
6. Asgarpanah J, Kazemivash N. Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Carthamus tinctorius* L. *Chin J Integr Med.* 2013;19:153-9.
7. Yüce A, Türk G, Çeribaşı S, Sönmez M, Çiftçi M, Güvenç M. Effects of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) bark oil on testicular antioxidant values, apoptotic germ cell and sperm quality. *Andrologia* 2013;45:248-55.
8. Haeri S, Minaie B, Amin G, Nikfar S, Khorasani R, Esmaily H, Salehnia A, Abdollahi M. Effect of *Satureja khuzestanica* essential oil on male rat fertility. *Fitoterapia* 2006;77:495-9.
9. Mühlbauer RC, Lozano A, Palacio S, Reinli A, Felix R. Common herbs, essential oils, and monoterpenes potentially modulate bone metabolism. *Bone* 2003;32:372-80.
10. Yu M, Chen X, Lv C, Yi X, Zhang Y, Xue M, He S, Zhu G, Wang H. Curcumol suppresses RANKL-induced osteoclast formation by attenuating the JNK signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;447:364-70.

# OLI ESSENZIALI: INTERAZIONE CON I FARMACI IN VITRO E IN VIVO

Filomena Corbo, Antonio Rosato

Dipartimento di Farmacia Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Bari 'Aldo Moro', Bari

## Introduzione

Il crescente interesse scientifico nel settore della terapia antibiotica è ascrivibile alla globale diffusione di infezioni microbiche e alla costante insorgenza di fenomeni di farmaco-resistenza in ambito ospedaliero.

Negli ultimi anni, è in continuo aumento l'uso di impianti biomedicali quali cateteri, pacemaker, protesi cardiache e articolari che possono essere colonizzati da microrganismi in grado di formare biofilm costituiti da cellule microbiche in mono o multi strato incapsulate in una matrice di materiale polimerico extracellulare e caratterizzati da profili di farmacoresistenza elevati. È, infatti, accertato che i microrganismi comunicano tra di loro nei biofilm, utilizzando piccole molecole diffusibili, che regolano la produzione di metaboliti secondari e controllano l'espressione di fattori di virulenza in modo proporzionale alla densità della popolazione cellulare. Questo sofisticato meccanismo definito *quorum sensing* ha molte affinità con il sistema endocrino degli organismi superiori che mette in comunicazione, tramite molecole di natura ormonale, i diversi comparti metabolici. I biofilm originati su impianti medici o conseguenti a protesi mediche invasive non sono altrimenti curabili se non mediante l'asportazione chirurgica.

Una recente indagine, condotta nei primi mesi del 2013 dalla *Salient Survey*, una *global community* che mette in rete ricercatori, aziende farmaceutiche e laboratori diagnostici, dal titolo "Antibiotic Resistance 2013: A global survey", fotografa la situazione della multiresistenza antibiotica in tutto il mondo e da più punti di vista: clinico, sperimentale e diagnostico. Emerge che i cinque ceppi batterici ad elevata patogenicità Gram negativi come *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Enterobacter*, rappresentano il 79% del totale, e i primi cinque Gram positivi come *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, e *Streptococcus pyogenes* rappresentano l'82% del totale. La maggior parte delle patologie batteriche dunque sono dovute a pochi microrganismi ripetutamente attaccati con non oltre 10 molecole commerciali appartenenti alle classi delle cefalosporine, penicilline, fluorochinoloni, carbapenemi e aminoglicosidi. L'uso ripetuto degli stessi farmaci favorisce l'insorgenza di multiresistenza dovuta a sovraespressione di pompe di efflusso, a modificazione dei target cellulari o dei metabolismi connessi. Alla luce di queste premesse, vista la crescente difficoltà, anche dei più recenti antimicrobici di sintesi, di superare i fenomeni di farmacoresistenza, l'uso combinato di antibiotici/battericidi, in commercio o di nuova sintesi, in sinergia con composti naturali di estrazione da alimenti e/o oli essenziali potrebbe rappresentare una svolta terapeutica importante.

Gli oli essenziali in particolare sono miscele complesse la cui composizione chimica, standardizzabile e quantificabile attraverso le più sofisticate e recenti tecniche cromatografiche, mostrano profili antimicrobici e spettri d'azione estremamente ampi. Il loro utilizzo in associazione con antimicrobici ha mostrato un miglioramento del profilo terapeutico, una

diminuzione della dose del farmaco (e quindi degli effetti collaterali) e a volte un superamento delle più comuni farmacoresistenze.

## Materiali e metodi

Gli oli essenziali usati *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree), *Origanum vulgare* (Wild majoran), *Aniba rosaeodora* (Rosewood), e *Pelargonium graveolens* (Fragrant geranium) sono commerciali (Erbeamea Istrana, Treviso, Italia). I ceppi batterici e fungini usati sono di Collezione ATCC (ATCC, Rockville, MD, USA). Le colture batteriche sono coltivate in terreno Mueller Hinton agar (MHA, Oxoid) mentre quelle fungine sono coltivate in brodo Sabouraud 2% glucosio (SAB), e incubate a 37°C. Le sospensioni ottenute vengono diluite nel rispettivo terreno di coltura fino ad ottenere una concentrazione finale di  $1 \times 10^6$  Unità Formanti Colonia (UFC)/mL.

Le minime concentrazioni inibenti (*Minimum Inhibitory Concentration*, MIC) batteriche sono state determinate mediante il metodo della microdiluzione secondo le linee guida del *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) (1), mentre quelle per i funghi sono state calcolate con il metodo CLSI M27A3 (2).

Il valore di MIC è stato definito come la concentrazione più bassa a cui non si osserva crescita visibile del ceppo batterico rispetto al controllo. I valori di MIC vengono determinati in triplicato. Le concentrazioni prese in esame per effettuare uno studio sinergico sono individuate sulla base dei valori di minima concentrazione inibente degli stessi composti studiati singolarmente. La miscela sinergica è composta, infatti, da percentuali delle concentrazioni attive dei farmaci. L'analisi delle combinazioni tra le sostanze viene effettuata attraverso il calcolo del FICI (*Fractional Inhibitory Concentration Index*):

$$\text{FICI} = (\text{MIC A+B} / \text{MIC A}) + (\text{MIC B+A} / \text{MIC B})$$

dove A e B rappresentano i due composti (3).

Il metodo per il calcolo del FICI è il *Microdilution Checkerboard Method* descritto da White *et al.* (4). Il valore è calcolato come somma dei FICI dell'olio e del farmaco e interpretato come segue: i) effetto sinergico  $\text{FICI} < 0,5$ ; ii) effetto additivo  $0,5 < \text{FICI} < 1$ ; iii) effetto antagonista  $> 1$ .

## Risultati e discussione

Obiettivo del presente lavoro è stato lo studio degli effetti sinergici tra oli essenziali a composizione standardizzata e antibiotici commerciali anche obsoleti, come per esempio la gentamicina, presidio quasi esclusivo per la cura di miocarditi ed endocarditi, oltre che di infezioni endoaddominali e urogenitali e infezioni gravi del SNC (Sistema Nervoso Centrale) (comprese le meningiti), ma con pesanti effetti collaterali, al fine di individuare le migliori coppie sinergiche, i profili di attività su microrganismi isolati e su biofilm batterici, le caratteristiche di sicurezza e i meccanismi d'azione.

Per sinergia si intende l'associazione di due o più sostanze dotate di attività qualitativamente simile che, somministrate contemporaneamente, mostrano un effetto farmacologico superiore o paragonabile rispetto a quello che si ottiene somministrandole separatamente. Questo comporta una serie di vantaggi, tra cui il più significativo è senza dubbio la minore incidenza degli effetti collaterali a dose dipendente. I due composti sinergizzano la loro azione in vari modi: agendo su più target contemporaneamente, migliorando le caratteristiche farmacocinetiche del farmaco,

modificando i meccanismi di resistenza che i microrganismi mettono in campo, eliminando o neutralizzando gli effetti collaterali. Ciò avviene perché le concentrazioni prese in esame per effettuare uno studio sinergico sono individuate sulla base dei valori di MIC degli stessi composti studiati singolarmente. La miscela sinergica è composta, infatti, da percentuali delle concentrazioni attive dei componenti. Per valutare i risultati della sinergia tra oli essenziali e antimicrobici si procede al calcolo del FICI.

Il FICI è il valore di sinergia espresso da ogni combinazione capace di inibire la crescita microbica: più il suo valore è basso, più le quantità delle due sostanze necessarie ad indurre la sinergia sono basse. Numerosi lavori scientifici hanno evidenziato la presenza di relazioni sinergiche *in vitro* tra oli essenziali e antimicrobici, mostrando una notevole riduzione delle concentrazioni dei componenti l'associazione stessa. Nella comparsa di sinergia è essenziale il fitocomplesso nella sua interezza rispetto al componente più abbondante, come dimostrato nello studio condotto associando alla norfloxacina l'olio essenziale di *P. graveolens* a confronto con l'associazione con i componenti singoli come il citronellolo e il geraniolo in cui il FICI scende a valori di 0,37 per lo *S. aureus* solo per il fitocomplesso (5) (Tabella 1).

**Tabella 1. Valori di FICI per associazione con norfloxacina**

Ceppo batterico	<i>P. graveolens</i>	Citronellolo	Geraniolo
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	0,50	ND	ND
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0,50	0,50	0,50
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	0,37	0,50	0,50
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	0,50	ND	ND

L'incremento della frazione terpenolica del fitocomplesso che si osserva passando dall'olio essenziale di *M. alternifolia*, a quello di *O. vulgare*, *P. graveolens* e *A. rosaeodora* contribuisce ad aumentare la sinergia sia su ceppi batterici che fungini in associazione con amfotericina B, nistatina, e gentamicina (6-8). In particolare sono state studiate le azioni sinergiche di antibiotici e di antifungini con oli essenziali su ceppi batterici Gram positivi, Gram negativi, sia di collezione internazionale che isolati clinici e su ceppi di *Candida albicans* e *C. non-albicans*. Tra gli isolati clinici è stata data particolare rilevanza a ceppi di *S. aureus* MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*).

I risultati ottenuti mostrano valori dell'indice di sinergia (FICI) interessanti in particolare con l'associazione tra gentamicina e l'olio essenziale di *P. graveolans* e *A. rosaeodora* (FICI 0,11-0,50) (Tabella 2).

**Tabella 2. Valori di FICI per associazione con gentamicina**

Ceppo batterico	<i>O. vulgare</i>	<i>A. rosaeodora</i>	<i>M. alternifolia</i>	<i>P. graveolens</i>
<i>B. cereus</i> ATCC 7464	0,28	0,30	0,52	0,30
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,31	0,30	0,50	0,28
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,65	0,35	0,49	0,35
<i>A. baumannii</i> ATCC19606	0,65	0,11	0,50	0,11
<i>S. marcescens</i> ATCC 8100	0,65	0,30	0,49	0,45
<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 9610	0,63	0,11	0,49	0,22

È da sottolineare la forte sinergia tra gentamicina e *A. rosaeodora* sul ceppo Gram negativo di *A. baumannii* (FICI 0,11). Tra gli antimicotici, la nistatina ha mostrato con oli essenziali di *O. vulgare* e *P. graveolens* un'azione sinergica fortemente indirizzata a ceppi di *C. non albicans* responsabili di infezioni micotiche ad alta recrudescenza (Tabella 3).

**Tabella 3. Valori di FICI per associazione con nistatina**

Ceppo fungino	<i>P. graveolens</i>	<i>O. vulgare</i>
<i>C. albicans</i> ATCC 14053	0,30	0,11
<i>C. guilliermondii</i> NRRL 324	0,11	0,17
<i>C. krusei</i> NRRL 7179	0,11	0,11
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	0,11	0,17

Dato il crescente impatto delle infezioni ospedaliere e di comunità sostenute da *S. aureus* MRSA, di recente è stata focalizzata l'attenzione su particolari associazioni tra un antibiotico ad esclusivo uso ospedaliero a struttura ossazolidinonica, il linezolid, attivo su *S. aureus* MRSA e a spettro ristretto ai Gram positivi e oli essenziali di *O. vulgare*, *Crithmum maritimum* e *Monarda didyma*. I risultati dei test vedono un notevole effetto antimicrobico esteso anche a Gram negativi e un significativo effetto sinergico. I dati sono in fase di pubblicazione.

## Bibliografia

1. CLSI. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for Bacteria that grow aerobically. Approved Standard, 8th ed. M7-A8*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
2. CLSI. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standard, 3rd Ed. M27-A3*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
3. Te Dorsthorst DTA, Verweij PE, Meletiadis J, Bergevoet M, Punt NC, Meis JFGM, Mouton JW. *In vitro* interaction of flucytosine combined with amphotericin B or fluconazole against thirty-five yeast isolates determined by both the fractional inhibitory concentration index and the response surface approach. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2982-9.
4. White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different *in vitro* methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob. Agents Chemother* 1996;40:1914-8.
5. Rosato A, Vitali C, De Laurentis N, Armenise D, Antonietta Milillo M. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine* 2007;14:727-32.
6. Rosato A, Vitali C, Gallo D, Balenzano L, Mallamaci R. The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with Amphotericin. *Phytomedicine* 2008;15:635-8.
7. Rosato A, Vitali C, Piarulli M, Mazzotta M, Argentieri MP, Mallamaci R. *In vitro* synergic efficacy of the combination Nystatin essential oils against some *Candida* species. *Phytomedicine* 2009;16:972-5.
8. Rosato A, Piarulli M, Corbo F, Muraglia M, Carone A, Vitali ME, Vitali C. *In vitro* synergistic action of certain combinations of Gentamicin and essential oils. *Curr Med Chem* 2010;17:3289-95.

# **RUOLI ECOFISIOLOGICI DI OLI ESSENZIALI E VARIABILITÀ NELLA COMPOSIZIONE CHIMICA: CARATTERIZZAZIONE DI CHEMOTIPI DI PREGIO PER L'INDUSTRIA AGRO-ALIMENTARE E LA DIFESA ECOSOSTENIBILE DELLE PIANTE**

Marco Michelozzi

*Istituto di Bioscienze e Biorisorse, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Sesto Fiorentino (Firenze)*

## **Oli essenziali**

Gli oli essenziali sono costituiti da numerosi composti quali alcoli, aldeidi, chetoni, esteri, fenoli e terpeni volatili (monoterpeni e sesquiterpeni).

I terpenoidi o isoprenoidi perché caratterizzati dall'isoprene come unità strutturale, costituiscono il più vasto gruppo di composti vegetali.

Alcuni terpeni comprendono numerose molecole che rivestono un ruolo fondamentale nel metabolismo primario della pianta come gibberelline e acido abscissico con attività ormonale e i pigmenti carotenoidi.

La stragrande maggioranza dei terpeni sono invece classificati metaboliti secondari e molte di queste molecole svolgono importanti funzioni ecologiche in particolare nelle interazioni pianta-parassita, pianta-pianta e anche a livello tritrofico pianta-insetto fitofago-entomofago.

## **Ruoli ecofisiologici**

Molti terpeni conferiscono odore e sapore sgradevole alle foglie e ai frutti proteggendo la pianta dall'attacco degli erbivori. Alcuni di questi terpenoidi sono tossici e costituiscono un vero e proprio schermo biochimico contro l'attacco di insetti, funghi e microbi.

In virtù di questa tossicità, i terpenoidi svolgono un ruolo estremamente importante nell'ecosistema, in particolare nelle relazioni pianta-parassita e nei rapporti pianta-pianta (1).

Le piante si proteggono dall'attacco degli animali producendo terpeni che sono immagazzinati in strutture specializzate come i tricomi ghiandolari delle piante aromatiche e i dotti resiniferi diffusi in molti organi delle conifere. È noto che la resina preformata ricca di monoterpeni, sesquiterpeni e diterpeni costituisce una barriera fisica e chimica all'ingresso del parassita (2). In generale, il flusso di resina si esaurisce in 24-48 ore, dopodiché si attiva una nuova sintesi di composti terpenici che vanno a costituire la resina secondaria o indotta dalla presenza del patogeno. La composizione chimica della resina secondaria differisce da quella della resina primaria e sembra che i genotipi meno suscettibili abbiano evoluto la capacità di aumentare in risposta alla presenza del patogeno la produzione dei terpeni con alto livello di tossicità e diminuire la sintesi dei composti terpenici che attirano i parassiti o sono biologicamente meno attivi (3). Esistono, infatti, dei casi in cui alberi feriti liberano terpeni volatili che attirano insetti fitofagi come ad esempio gli individui di bostrico attratti dai monoterpeni emessi da piante di douglasia.

Alcuni insetti hanno tuttavia sviluppato la capacità di superare queste barriere chimiche come nel caso di specie gregarie di scolitidi che sintetizzano il feromone di aggregazione a partire da monoterpeni che funzionano da attrattivo per gli altri individui provocando un attacco in massa della pianta (4). Insetti solitari hanno sviluppato altre forme di adattamento come una cuticola molto spessa che li protegge dal contatto con questi veleni oppure la capacità di detossificare queste molecole.

Un caso particolare di terpeni coinvolti nell'interazione pianta-insetti è rappresentato dall'impollinazione: ad esempio il cineolo sembra svolgere una funzione di attrazione nei confronti di apoidei e in generale gli insetti impollinatori sono attratti dal profumo di queste sostanze (5, 6).

I sistemi pianta-patogeno offrono numerosi esempi di modelli genetici del ciclo continuo del processo coevolutivo. Varie e singolari sono le relazioni intercorrenti tra pianta e parassita dalle quali scaturisce un vantaggio a favore di uno o l'altro dei bionti secondo il disegno a tappe della coevoluzione biochimica (7).

Alcune piante producono sostanze terpeniche che limitano la germinazione dei semi, inibiscono la crescita sia degli individui della stessa specie che quelli appartenenti ad altre specie (8). È noto l'esempio della *Salvia leucophylla*, una specie che vive nel deserto della California, che libera nel terreno i monoterpeni canfora e cineolo che sono tossici per la vita di altre piante. La capacità di produrre queste fitotossine può conferire un particolare vantaggio nella competizione tra specie e quindi avere un ruolo importante nella strutturazione della comunità (9).

Molte piante forestali (es. appartenenti a *Populus* spp. e *Quercus* spp.) sintetizzano isoprene o monoterpeni nei cloroplasti fogliari a partire da carbonio appena fissato con la fotosintesi e non conservano questi terpeni in organi specializzati, ma li liberano immediatamente nell'atmosfera. L'ipotesi oggi più ricorrente è che l'isoprene svolga un ruolo importante nella stabilizzazione delle membrane dei cloroplasti contro stress termici (10).

La sintesi di isoprene aumenta anche in risposta alla carenza di acqua e in generale è stato ipotizzato che l'isoprene possa avere un'azione antiossidante per la presenza nella sua molecola di doppi legami coniugati altamente reattivi con composti *Reactive Oxygen Species* (ROS) (11, 12, 13).

Terpeni volatili sono coinvolti nella chimica dell'atmosfera: le piante emettono nell'aria isoprene e monoterpeni che, a causa dell'alta reattività con radicali OH e composti antropogenici, alterano l'ozono della troposfera, influenzano la qualità dell'aria, possono contribuire a fenomeni di inquinamento atmosferico ed essere coinvolti nel cambiamento climatico su scala regionale, continentale e terrestre (14) (Di Carlo *et al.*, 2004).

I ruoli più rilevanti dei terpeni nei confronti dell'ambiente possono essere riassunti come segue:

- 1) *Ruolo di difesa*  
in relazione a:
  - 1a. insetti
  - 1b. funghi
  - 1c. microbi
  - 1d. erbivori
  - 1e. stress meccanici e ambientali;
- 2) *Attrazione degli impollinatori;*
- 3) *Effetti allelopatici;*
- 4) *Attrazione degli insetti fitofagi;*
- 5) *Qualità dell'aria.*

## Variabilità nel profilo terpenico e caratterizzazione di chemotipi di pregio

Le capacità adattative in popolamenti di specie forestali dipendono dal livello di variabilità genetica e dai meccanismi coinvolti nel mantenimento e nella distribuzione di questa diversità intesa come potenziale evolutivo. In base alle indagini più recenti appare sempre più evidente il rapporto tra eterozigosi e valenza ecologica.

Per quanto riguarda studi di biochimica sistematica, esistono numerose indagini sulla variabilità genetica nel contenuto di terpeni in alberi forestali.

Il profilo terpenico risulta sotto forte controllo genetico e valori elevati di ereditabilità sono stati riportati per diversi monoterpeni in numerose specie forestali. L'esistenza di variabilità nel contenuto di terpeni tra specie, popolazioni appartenenti alla stessa specie, individui all'interno del singolo popolamento, ibridi e cloni offre notevoli opportunità per la caratterizzazione di chemotipi meno sensibili alle fitopatie e con caratteristiche di pregio per l'industria e l'agricoltura.

È sempre maggiore in questi ultimi anni l'interesse verso le potenzialità di utilizzo di metaboliti secondari da parte dell'industria farmaceutica sempre alla ricerca di nuovi antibiotici e di molecole con proprietà anticancerogena. Inoltre, è sempre più sentita l'esigenza di salvaguardare l'ambiente che ci circonda riducendo l'apporto di sostanze chimiche inquinanti (15). L'allarme suscitato dall'impiego indiscriminato di prodotti di sintesi in agricoltura, nell'industria alimentare e in altri settori, ha portato alla riscoperta dell'uso di metaboliti secondari isolati da tessuti vegetali e, in particolare, di composti volatili costituenti di oli essenziali e resine, per la produzione di aromi, conservanti, erbicidi, fitofarmaci e articoli di cosmesi (16).

### Bibliografia

1. Gershenzon J, Dudareva N. The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology* 2007;3:408-14.
2. Cates RG. The role of mixture and variation in the production of terpenoids in conifer-insect pathogen interactions. In: Romeo JT, Saunders JA, Barbosa P (Ed.). *Phytochemical diversity and redundancy in ecological interactions*. New York: Plenum Press; 1996. Vol. 30. p. 179-216.
3. Bonello P, Capretti P, Luchi N, Martini V, Michelozzi M. Systemic effects of *Heterobasidion annosum* ss infection on severity of Diplodia pinea tip blight and terpenoid metabolism in Italian stone pine (*Pinus pinea*). *Tree physiology* 2008;11:1653-60.
4. Raffa KF. Terpenes tell different tales at different scales: glimpses into the chemical ecology of conifer - bark beetle - microbial interactions. *Journal of Chemical Ecology* 2014;40(1):1-20.
5. Piresa EP, Morgadoa LN, Souzaa B, Carvalhoa CF, Nemésio A. Community of orchid bees (Hymenoptera: Apidae) in transitional vegetation between Cerrado and Atlantic Forest in southeastern Brazil. *Braz J Biol* 2013;73(3):507-13.
6. Dobson H. Floral volatiles in insect biology. In: Bernays EA (Ed.). *Insect-plant interactions*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1993. Vol. V. p. 47-81.
7. Langenheim JH. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. *J Chem Ecol* 1994;20:1223-80.
8. Grana EC, Díaz-Tielas AM, Sanchez-Moreiras M, Reigosa J. Mode of action of monoterpenes in plant-plant interactions. *Current Bioactive Compounds* 2012;8(1):80-9.

9. Fischer NH. Plant terpenoids as allelopathic agents. In: Harborne JB, Tomes-Barberan FA (Ed.). *Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids*. Oxford: Clarendon Press; 1991. p. 377-99.
10. Singaas EL, Lerdau M, Winter K, Sharkey TD. Isoprene increases thermotolerance of isoprene-emitting species. *Plant Physiol* 1997;115:1413-20.
11. Affek HP, Yakir D. Protection by isoprene against singlet oxygen in leaves. *Plant Physiology* 2002;129:269-77.
12. Vickers CE, Gershenzon J, Lerdau MT, Loreto F. A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Nat Chem Biol* 2009; 5:283-91.
13. Loreto F, Schnitzler JP. Abiotic stresses and induced BVOCs. *Trends Plant Sci* 2010;15:154-66.
14. Di Carlo P, Brune WH, Martinez M, *et al.* Missing OH reactivity in a forest: evidence for unknown reactive biogenic VOCs. *Science* 2004;304:722-5.
15. Flamini G. Natural herbicides as a safer and more environmentally friendly approach to weed control: a reviewer of the literature since 2000. *Stud Nat Prod Chem* 2012;38:353-96.
16. Zwenger S, Basu C. Plant terpenoids: applications and future potentials. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* 2008;3(1):001-007.

## PROFILO FITOCHIMICO DEGLI OLI ESSENZIALI

Stefania Benvenuti

*Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Modena*

L'avvento delle angiosperme (140 milioni di anni fa) e relativa differenziazione (100 milioni di anni fa) porta, oltre a diverse modalità riproduttive, alla formazione di composti chimici di difesa o di comunicazione. Le piante hanno dovuto utilizzare difese statiche per dissuadere erbivori e per difendersi dall'attacco di batteri, virus e funghi, ma la coevoluzione portò ad un miglioramento degli strumenti degli animali per cibarsi e per attaccare le piante e quindi, la risposta evolutiva vegetale fu la biosintesi di sostanze sempre più complesse e tossiche.

Nella pianta queste sostanze non giocano un ruolo primario, ma sono generate da processi metabolici secondari specifici di ogni famiglia, genere, specie, in passato considerate anche prodotti di scarto.

Già le gimnosperme (conifere) iniziarono a sintetizzare e depositare sostanze in specifici tessuti secretori; ma solo con le angiosperme si arrivò ad una grande diversificazione produttiva (1).

Attualmente si è arrivati a riconoscere migliaia di composti di origine vegetale che hanno questo ruolo "secondario", ossia differente rispetto ai metaboliti primari, ma non meno importante. Lo studio e la tracciabilità di queste molecole (metabolomica) permette di stabilire il profilo fitochimico (*fingerprinting*) di ogni pianta, frutto dell'interazione con l'ambiente e dei meccanismi biochimici messi in atto per la loro sintesi.

Gli oli essenziali sono appunto una miscela di metaboliti secondari con caratteristiche chimiche e fisiche comuni, prodotti dalla pianta in risposta a fattori ecologici e patogeni.

La composizione chimica degli oli essenziali può variare anche all'interno delle sotto-varietà, cultivar, ibridi, cloni; soprattutto fra le piante spontanee in cui la variabilità genetica è più intensa, si assiste ad una coevoluzione che permette solo ad alcune piante, con lievi differenziazioni genetiche, di sopravvivere. Ecco che non basta la denominazione dell'olio essenziale riferita a genere, specie, varietà, ecc., ma è necessario specificare spesso il chemiotipo che ne individua il componente prioritario.

In genere gli oli essenziali sono costituiti da 2 o 3 componenti, presenti in concentrazione relativamente alta (20-95%), e altri presenti in quantità minori o addirittura in tracce. L'aroma è dato dalla combinazione di tutti i componenti e, anche quelli presenti in concentrazioni minime, giocano un ruolo fondamentale nel determinare le proprietà organolettiche e fitoterapiche.

I costituenti degli oli essenziali sono chiamati "terpeni" e la loro unità monomerica è chiamata "isoprenica" in relazione all'isoprene a struttura dienica  $C_5$  (2, 3). I terpeni hanno formula molecolare che corrisponde a multipli dell'isoprene (unite in modo testa-coda), insieme a frammenti alcolici, fenolici e chetonici (terpenoidi). Solo alcuni derivano da semplice riarrangiamento testa-coda, ma la maggior parte dei terpenoidi presentano ulteriori modificazioni in seguito a reazioni di ciclizzazione, o addirittura presentano piccoli frammenti terpenoidici legati a scheletri carboniosi diversi (alcaloidi, fenoli, ecc.).

I composti derivati sono chiamati: emiterpeni  $C_5$ , monoterpeni  $C_{10}$ , sesquiterpeni  $C_{15}$ , diterpeni  $C_{20}$ , sesterterpeni  $C_{25}$ , triterpeni  $C_{30}$  e tetraterpeni  $C_{40}$ . Polimeri superiori si ritrovano in materiali come la gomma.

Per quanto riguarda la via metabolica di origine l'unità fondamentale (isoprene) viene prodotta a partire da tre unità di acetato che, grazie ad una serie di condensazioni che dapprima generano acido mevalonico, producono isopentenilpirofosfato, forma attivata dell'isoprene. Nella successiva biosintesi si ha condensazione di due molecole di isopentenilpirofosfato che

danno origine a trans-geranil pirofosfato. Questo può condensare ulteriormente con una molecola di isopentil pirofosfato formando farnesil pirofosfato da cui possono formarsi sesquiterpeni.

I pirofosfati C<sub>10</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>20</sub> sono i diretti precursori di mono, sesqui e diterpeni. La biosintesi dei diversi terpeni coinvolge anche reazioni di spostamenti, addizione di acqua o di amine, deidrogenazione e introduzione di funzioni ossigenate. I processi di ossidazione possono implicare decarbossilazione o altre scissione ossidative con perdita di altri atomi di C. Tutto ciò dà luogo a considerevoli variazioni nei tipi di strutture così come nei gruppi funzionali.

I componenti degli oli essenziali hanno basso peso molecolare, sono volatili, estraibili in corrente di vapore e lipofili per cui appartengono alla classe dei monoterpeni (C<sub>10</sub>), sesquiterpeni (C<sub>15</sub>) e loro derivati ossigenati. La presenza di molecole a più alto peso molecolare in estratti di origine vegetale, indica l'utilizzo di un'altra tecnica di separazione diversa dalla distillazione in corrente di vapore o dalla spremitura; il prodotto quindi non rispetta la definizione di olio essenziale.

Alcuni componenti degli oli essenziali sono prodotti da un'altra via metabolica secondaria, la via dell'acido shikimico: questa porta alla formazione di alcuni aminoacidi aromatici quali la fenilalanina e tirosina, dai quali si ottengono derivati dell'acido cinnamico che sono precursori di fenilpropanoidi, quali ad esempio eugenolo, anetolo, estragolo presenti in alcuni oli essenziali (3). Anche in questo caso comunque i derivati hanno caratteristiche fisiche comuni ai terpeni.

I monoterpeni che costituiscono i componenti principali degli oli essenziali possono essere classificati in base ai gruppi funzionali e per il loro grado di ossidazione in: idrocarburi aliciclici (es. mircene, ocimene, fellandrene) e ciclici (es. limonene,  $\alpha$ - e il  $\beta$ -pinene, *p*-cimene), alcoli (es. geraniolo, nerolo, linalolo, lavandulolo, citronellolo, mentolo, borneolo, terpineolo), aldeidi (es. geraniale e citronellale), chetoni (es. mentone, carvone, canfora), fenoli (es. timolo, carvacrolo), ossidi (es. eucaliptolo), esteri (es. linalilacetato).

I sesquiterpeni C<sub>15</sub> hanno una struttura piuttosto complessa e sono costituiti da uno o più cicli generati dalla diversa ciclizzazione del farnesil pirofosfato. Le strutture anulari che ne derivano sono numerosissime e sono spesso peculiari di alcune specie.

La ricchezza in alcune componenti piuttosto che altre non sempre corrisponde a ciò che la pianta sintetizza: infatti ciò che viene prodotto dai tessuti secretori, non equivale a ciò che viene distillato in corrente di vapore; il processo estrattivo infatti seleziona i composti più bassobollenti e può generare artefatti non presenti nel metabolismo vegetale. Da ciò emerge la effettiva incertezza ad ipotizzare un ruolo biologico di una miscela magari nemmeno realmente rappresentata nel tessuto vegetale.

La fitoterapia, la cosmetica e l'industria alimentare fanno comunque largo uso degli oli essenziali e sono proprio i loro costituenti che ne suggeriscono l'impiego. Da ciò nasce la necessità non solo della caratterizzazione del profilo fitochimico, ma del dosaggio, con tecniche analitiche idonee, dei costituenti presenti.

## Bibliografia

1. Valussi M. *Il grande manuale dell'aromaterapia, Fondamenti di scienza degli oli essenziali*. Milano: Tecniche Nuove; 2013.
2. Ruzicka L. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia* 1953;10:357-67.
3. Manitto P. *Biosynthesis of natural products*. Daryaganj: Ellis Horwood Ltd; 1981.

## POTENZIALITÀ DEGLI OLI ESSENZIALI NELLE MALATTIE INFETTIVE

Mondello Francesca, Antonietta Girolamo, Maura Di Vito

*Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e immunomediate, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Per più di mezzo secolo, la società umana si è affidata principalmente agli antibiotici e ai vaccini per trattare le infezioni microbiche. Nonostante il grande progresso in ambito medico e farmaceutico negli ultimi decenni, il trattamento tradizionale delle malattie infettive risulta spesso inefficace con un incremento delle allergie e delle reazioni farmacologiche dannose inattese. Un quinto dei decessi globali è dovuto alle malattie infettive, molte delle quali di origine batterica, le quali costituiscono la principale causa di morte per i bambini di età inferiore ai 5 anni (1).

L'uso indiscriminato degli antibiotici in ambito clinico, veterinario, agricolo ha portato all'emergere della farmaco-resistenza batterica (2, 3) e attualmente ci troviamo di fronte alla minaccia di superbatteri, cioè batteri patogeni resistenti alla maggior parte o a tutti gli antibiotici disponibili. L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha messo chiaramente in evidenza che tali patogeni multi-resistenti potrebbero molto probabilmente portare il mondo all'epoca pre-antibiotica (4).

Fino ad ora, l'industria farmaceutica ha affrontato questo problema modificando gli antibiotici esistenti e sviluppandone di nuovi. Tuttavia, solo tre nuove classi di antibiotici (cioè lipopeptidi, ossazolidinoni, e streptogramine) sono entrate nel mercato della medicina negli ultimi quattro decenni e tutte solo per il trattamento delle infezioni dovute a batteri Gram positivi. Inoltre, i batteri hanno dimostrato di avere la capacità di sviluppare e diffondere la resistenza agli antibiotici prontamente, rendendo questa strategia sempre meno efficace. Ciò evidenzia chiaramente la necessità di nuovi agenti antimicrobici che abbiano fundamentalmente diverse modalità di azione rispetto a quella degli antibiotici tradizionali.

L'enorme domanda ha innescato interessi e sforzi a livello mondiale per lo sviluppo di nuove alternative antimicrobiche sicure ed efficaci. Tra i candidati potenziali più promettenti nella prevenzione e nel trattamento di diverse malattie infettive vi sono soprattutto prodotti di origine naturale per la loro esigua tossicità, biodegradabilità e il loro ampio spettro di azione rispetto alle sostanze antimicrobiche di sintesi.

In particolare numerosi studi sperimentali hanno dimostrato che un gran numero di oli essenziali, misture vegetali volatili, con i loro costituenti sono stati ben caratterizzati *in vitro* per la loro attività antibatterica, antifungina, antivirale, antiparassitaria e per la loro attività antinfiammatoria e immunostimolante. Principalmente l'attività di questi fitoestratti e dei loro componenti è stata dimostrata, soprattutto *in vitro*, contro batteri multi-resistenti, come *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA), *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa* e/o contro funghi farmaco-resistenti opportunisti (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*) dimostrando il potenziale notevole di questi prodotti naturali per contrastare lo sviluppo della resistenza microbica agli antibiotici. Inoltre, gli studi sull'uso degli oli essenziali e dei loro componenti in combinazione con antibiotici di sintesi sono risultati promettenti per poter limitare, con dosi meno tossiche per il paziente, tale problematica crescente.

Tuttavia spesso gli oli essenziali utilizzati nella ricerca non rispondono ai requisiti di buona qualità, in quanto si tratta di miscele non standardizzate di vari composti. Inoltre anche i dati microbiologico-clinici promettenti sono spesso insufficienti, aneddotici e non basati sull'uso di metodologie validate e di modelli sperimentali con buona predittività per l'uso clinico.

In questa relazione verranno riportate informazioni circa le attuali conoscenze sugli oli essenziali riguardo a efficienza antimicrobica, modalità di azione, specificità e sicurezza e vantaggi e svantaggi relativi a potenziali applicazioni cliniche (5-7).

## Attività antimicrobica

Gli oli essenziali sono complesse miscele di sostanze organiche estratte da piante aromatiche mediante distillazione in corrente di vapore o spremitura, costituite prevalentemente da terpeni (biomolecole derivanti dalla ripetizione di catene idrocarburiche isopreniche).

Sono liquidi infiammabili, volatili a temperatura ambiente, oleosi, solubili negli oli, negli alcoli e nei solventi organici.

L'attività antimicrobica, valutata *in vitro* sia in forma liquida che gassosa, varia da un microrganismo all'altro e da un olio essenziale all'altro, ma è sempre dose-dipendente. È strettamente connessa alla composizione chimica e alla concentrazione dei loro costituenti, che non dipendono solo dalla specie, ma anche da altri fattori come la provenienza della pianta, la parte usata, lo stadio di sviluppo, le condizioni di crescita (temperatura, terreno, fertilizzanti, ecc.), la distillazione e le condizioni di conservazione.

È importante quindi prendere atto che per i suddetti motivi vi sarà una variabilità chimica ad ogni distillazione per cui si dovranno sempre effettuare delle metodiche di analisi chimica (gascromatografia, spettrometria di massa, rotazione ottica, indice di rifrazione, test agli infrarossi, ecc.), necessarie per attestare il rispetto degli standard richiesti, che saranno valide solo per il lotto preso in considerazione.

L'attività antimicrobica negli oli essenziali, oltre a dipendere dalla composizione chimica, è anche direttamente proporzionale alla tossicità (basso indice terapeutico) per cui è necessario avere una minima concentrazione inibente (*Minimum Inhibitory Concentration*, MIC) ottimale più bassa possibile per evitare effetti collaterali (8).

Per valutare l'attività antimicrobica degli oli essenziali in genere vengono utilizzati i metodi convenzionali utilizzati per testare gli antibiotici con tutte le caratteristiche di standardizzazione, ripetibilità e qualità del risultato richieste dagli organismi internazionali di controllo, quali EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) e CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*).

Le proprietà specifiche degli oli essenziali (quali volatilità, insolubilità, viscosità) richiedono però delle modificazioni dei suddetti metodi, perché si potrebbe avere una distribuzione non omogenea dell'olio, anche utilizzando un appropriato solubilizzante che deve essere inerte nei confronti del microrganismo testato.

Queste complesse miscele di sostanze volatili, potrebbero evaporare o decomporsi durante una lunga incubazione che deve quindi essere monitorata in tal senso. Altri fattori importanti che possono influenzare la valutazione dell'attività antimicrobica degli oli essenziali sono anche l'inoculo, il terreno di coltura, la temperatura, le condizioni di crescita in aerobiosi o anaerobiosi, il tipo di solubilizzante (tween, DMSO, etanolo, agar), l'eventuale uso di sigillanti. Ad oggi, per tali motivi, manca ancora una standardizzazione delle metodiche.

In letteratura molti studi scientifici, principalmente *in vitro*, sono stati condotti con oli essenziali e componenti estratti da piante Lamiaceae, nei confronti di *S. aureus*, batterio patogeno ad elevato grado di morbilità e mortalità, sia in ospedale che in ambito comunitario, e

nei confronti del patogeno fungino umano opportunisto *Candida*, responsabile di patologie mucocutanee e in alcuni casi di gravi infezioni sistemiche, soprattutto in pazienti immunocompromessi nosocomiali.

La maggior parte degli oli essenziali studiati – isolati da Lamiaceae, tra cui *Lavandula* sp., *Thymus vulgaris* e *Zataria multiflora* – ha mostrato una notevole attività nei confronti di ceppi di MRSA, soprattutto *T. vulgaris* e *Z. multiflora*. Entrambi questi due oli essenziali presentano un'alta percentuale di timolo, monoterpene fenolico, il quale sembra abbia un ruolo importante nell'inibire la crescita di MRSA. Gli oli essenziali testati in combinazione con un agente antimicrobico di sintesi o con altri oli essenziali hanno mostrato effetti sinergici contro MRSA, in molti casi con una riduzione sostanziale della MIC, come ad esempio per l'olio essenziale di *Z. multiflora* in combinazione con vancomicina, o per l'olio essenziale di *Lavandula luisieri* in combinazione con l'olio essenziale di *L. angustifolia* o l'olio essenziale di *L. stoechas*.

Diversi componenti estratti dagli oli essenziali di *Origanum vulgare*, *Origanum dictamnus*, *Mentha piperita*, *Lavandula hybrida*, *Z. multiflora*, *T. vulgaris* sono stati testati contro *S. aureus*, e tutti hanno mostrato un'evidente attività inibitoria. Il carvacrolo, monoterpene fenolico presente nell'olio essenziale di origano e di timo, ha effetti specifici su *S. aureus* e *S. epidermidis* agendo sulla vitalità del biofilm e sulla morfologia delle cellule sessili. È noto come la formazione di biofilm sia uno dei meccanismi patogenetici coinvolti nelle infezioni correlate all'uso di dispositivi medici e sia anche responsabile della resistenza antimicrobica. Recenti studi hanno valutato l'azione di oli essenziali nei confronti di fattori virulenza secreti o correlati alla parete cellulare. Diverse concentrazioni di oli essenziali di *Perilla frutescens* (Lamiaceae) sopprimono l'espressione dell' $\alpha$ -tossina, dell'enterotossina A e B di *Staphylococcus* e della tossina della sindrome da shock tossico di *S. aureus* sia meticillino-sensibile che meticillino-resistente. Inoltre sono risultati attivi contro MRSA anche gli oli essenziali della famiglia Myrtaceae (*Cleistocalix operculatus*, *Eucalyptus globulus*, *Melaleuca alternifolia* Cheel) composte principalmente da monoterpene monociclici (es. 1,8-cineolo e terpinene-4-olo). Studi *in vitro*, hanno dimostrato che il singolo componente terpinene-4-olo (T-4-olo) presenta un'attività batteriostatica e battericida molto più forte rispetto a quella dell'olio essenziale di *M. alternifolia* (*Tea Tree Oil*, TTO) nei confronti di stafilococchi coagulasi negativi e MRSA.

Gli oli essenziali studiati, isolati da Lamiaceae, come *Z. multiflora*, *Ocimum sanctum*, *O. vulgare*, *O. majorana*, *M. piperita*, *Mentha suaveolens* con i loro componenti principali, oltre ad avere attività antibatterica, hanno mostrato anche notevole attività antifungina, in particolare anti-*Candida*. Tutti sono caratterizzati da un elevato contenuto di timolo, carvacrolo, cimene, linalolo o  $\alpha$ -pinene. In particolare, timolo, carvacrolo e geraniolo sono anche in grado di inibire lo sviluppo della formazione del biofilm in *Candida*.

Giordani R. ha confrontato l'effetto anti-*Candida* di diversi tipi di *Thymus*, *O. majorana* e *R. officinalis* raccolti in Algeria. È il primo studio in cui viene dimostrata l'elevata attività dell'olio essenziale di *Thymus numidicus* (Lamiaceae) contro la *Candida* con una MIC 1357 volte superiore rispetto alla MIC di amfotericina. Il componente principale di questo olio essenziale è stato identificato nel timolo (9).

Molti studi sono stati effettuati sulla sinergia tra gli oli essenziali o i componenti e gli antibiotici convenzionali. In ogni caso, poiché i risultati variano in base al microrganismo, all'antibiotico e all'olio essenziale che vengono presi in considerazione, la combinazione di oli essenziali con i farmaci sintetici deve essere sempre attentamente considerata. Per esempio, nei confronti di *Candida* l'olio essenziale di *Pelargonium graveolens* ha dimostrato sinergia in combinazione con amfotericina B, mentre quelli di *M. piperita*, di *T. vulgaris* e di *R. officinalis* hanno mostrato effetti antagonisti (10).

## Meccanismo di azione

Il meccanismo di azione degli oli essenziali nei riguardi dei microrganismi è complesso e ancora non è stato ben chiarito perché dipende da vari fattori: 1) dal tipo di potenza antimicrobica dei vari oli essenziali che a sua volta dipende dalla loro composizione chimica e quindi dalle loro caratteristiche prevalentemente idrofile o lipofile; 2) dal tipo di microrganismi ed è principalmente collegato alla struttura della loro parete cellulare.

A causa della variabilità delle quantità e dei componenti degli oli essenziali, è molto probabile che la loro attività antimicrobica non sia dovuta ad un unico meccanismo, ma a diverse modalità di azione a livello cellulare. L'idrofobicità consente agli oli essenziali di ripartirsi tra i lipidi della membrana cellulare batterica o fungina e mitocondriale, alterando le strutture cellulari e rendendole così più permeabili. Le perdite eccessive di ioni e molecole dalla cellula microbica condurranno poi inevitabilmente alla morte. Alcuni oli essenziali modulano la farmaco resistenza in diversi batteri Gram negativi minando i meccanismi di efflusso (11). I batteri Gram positivi in molti studi risultano più sensibili agli oli essenziali rispetto ai batteri Gram negativi.

L'azione degli oli essenziali verso i batteri Gram positivi e funghi sembra essere simile. Segni visibili della loro azione contro i lieviti, i dermatofiti e altri funghi filamentosi possono essere osservati con cambiamenti morfologici e funzionali micro e macroscopici. La maggior parte degli studi sul meccanismo di azione antifungina degli oli essenziali sono stati condotti su *Candida albicans*, il maggiore patogeno fungino umano. Gli oli essenziali sembrano agire prevalentemente con cambiamenti strutturali e funzionali delle membrane fungine, portando alla dispersione del citoplasma e alla morte cellulare. Si assiste quindi ad un blocco della sintesi delle membrane, inibizione della germinazione, riproduzione e respirazione cellulare. Gli studi principali si sono focalizzati molto sul meccanismo di azione del TTO, dimostrando l'alterazione della permeabilità delle cellule dei lieviti.

## Studi preclinici

Gli studi preclinici con gli oli essenziali costituiscono un valido supporto sperimentale per studi di sicurezza d'uso e di efficacia degli oli essenziali nelle infezioni batteriche e fungine umane e rappresentano un contributo preliminare per lo sviluppo di una nuova generazione di antibiotici naturali a scopo terapeutico e preventivo. La maggior parte degli studi sono stati condotti per infezioni mucosali e sistemiche da *Candida* e per infezioni da dermatofiti. Verranno riportati solo alcuni esempi.

Il carvacrolo, il maggiore componente fenolico dell'olio essenziale di timo e di origano e l'eugenolo, il maggiore componente fenolico dell'olio essenziale di garofano sono stati usati in un modello sperimentale di vaginite e di candidosi orale nella ratta confermandone l'efficacia (12-14). L'applicazione vaginale di olio di geranio e del suo componente principale, il geraniolo, sopprime la crescita di *C. albicans* e l'infiammazione locale nella candidosi sperimentale murina (15).

L'efficacia *in vivo* dell'olio essenziale di timo e di perila (*Perilla frutescens*) tramite contatto con vapore degli oli essenziali è stato dimostrato in *tinea pedis* sperimentale in cavie infettate con *Trichophyton mentagrophytes*, dimostrando una potente azione anti-*Trichophyton* tramite contatto con solo vapore (16).

Si è dimostrato, per la prima volta, l'elevata attività antifungina di TTO al 5% e di T-4-olo 1% in un modello di infezione sperimentale di *C. albicans* nella ratta, modello molto stringente

e predittivo della terapia della vaginite da *Candida* nelle donne, anche con l'uso di un ceppo resistente agli azolici (17, 18). Specificamente tre dosi post-challenge di TTO al 5% v/v e di T-4-olo all'1% v/v (paragonabili all'azione del TTO al 2,5% v/v) sono risultate altamente significative nel risolvere efficacemente l'infezione vaginale con *C. albicans*, resistente al fluconazolo, nelle ratte infettate sperimentalmente. Tuttavia TTO al 5% v/v risulta più attivo del T-4-olo 1% v/v nel risolvere l'infezione causata da *C. albicans* farmaco-resistenti.

## Studi clinici

Nei pochi casi in cui sono stati effettuati degli studi clinici i dati sono promettenti, ma non ancora esaustivi. Inoltre la maggior parte degli studi è stata effettuata utilizzando il TTO. Precedenti studi clinici effettuati per convalidare l'efficacia clinica degli oli essenziali non sono stati considerati scientificamente validi dagli standard oggi in uso, perché in molti casi non sono stati condotti in condizioni controllate.

Sebbene alcuni di questi dati clinici indichino che molti oli essenziali possano essere efficaci come agenti terapeutici, sono necessari altri rigorosi studi clinici che dovranno considerare fattori come: la concentrazione finale ottimale dell'olio, la formulazione del prodotto, la durata e la frequenza del trattamento, eventuali effetti avversi che possono influenzare l'efficacia farmacologica, gli eventuali effetti tossici, e il costo-efficacia del potenziale trattamento terapeutico con gli oli essenziali.

## Tossicità

La maggior parte degli oli essenziali, anche se "naturali", possono causare effetti tossici se somministrati ad alte dosi. La tossicità può essere studiata tramite saggi *in vitro* come test di citotossicità su linee cellulari animali o *in vivo* dove gli animali di laboratorio vengono esposti agli oli essenziali per valutarne gli eventuali effetti avversi. Qualche informazione è stata tratta anche da incidenti casuali avvenuti dopo ingestione o esposizione cutanea nell'uomo. Molti oli essenziali (tra cui oli essenziali di *Lavandula*, *Origanum*, *Melissa officinalis*) hanno mostrato tossicità anche a basse concentrazioni.

È stato postulato che uno dei meccanismi primari di citotossicità è dovuto al danno cellulare simile a quello riscontrato nei batteri e funghi. In generale questi dati *in vitro* non sono molto paragonabili in quanto vengono utilizzate diverse linee cellulari, diversi oli essenziali, dosi e tempi di esposizione.

Una misura della tossicità ampiamente accettata è la LD<sub>50</sub> che è la dose letale (*Lethal Dose*) per il 50% degli animali testati: la tossicità orale acuta varia da una dose di 1,4 g/kg per l'olio essenziale di *Ocimum basilicum* a una dose maggiore di 5 g/kg per l'olio essenziale di *Litsea cubeba* e di *Lavandula*. Gli oli essenziali possono essere tossici se applicati ad alte dosi sulla pelle come dimostrato dai valori LD<sub>50</sub> di tossicità dermica che variano da una dose di 4,8 g/kg a una dose maggiore di 5 g/kg.

Per quanto riguarda gli effetti tossici negli uomini in genere si sono riscontrati problemi di irritazione e di allergia in soggetti predisposti e le reazioni sono generalmente dose-dipendenti. In genere tali reazioni sono dovute all'uso di oli essenziali datati, esposti alla luce e all'aria che comportano la formazione di prodotti di ossidazione con un potenziale allergico più elevato (19, 20).

## Conclusioni e prospettive future

Gli oli essenziali potrebbero costituire una possibile integrazione e, in alcuni casi estremi, un'alternativa all'antibiotico-terapia, in particolare nei casi refrattari alla terapia convenzionale. Infatti oltre a dimostrare una notevole attività antimicrobica, possiedono proprietà biologiche e terapeutiche multifunzionali (antinfiammatorie, immunomodulanti, ecc.).

I dati sperimentali in letteratura danno un sostanziale supporto a precedenti evidenze empiriche e scientifiche sull'efficacia antimicrobica *in vitro* degli oli essenziali, anche nei confronti di specie microbiche farmaco-resistenti. Sperimentalmente è stato confermato anche che i principali componenti degli oli essenziali generalmente rappresentano il prodotto attivo della mistura. Presumibilmente, sarà più difficile per i batteri sviluppare resistenza verso le misture degli oli essenziali, costituite da numerose entità molecolari, piuttosto che rispetto ai singoli antibiotici generalmente costituiti da una singola molecola.

L'uso topico a livello cutaneo e mucosale potrebbe costituire la strategia più promettente al momento e l'attività dimostrata degli oli essenziali come potenzianti la penetrazione cutanea degli antisettici potrebbe essere applicata per prevenire le infezioni, anche farmacoresistenti, che si riscontrano in chirurgia e con l'uso di dispositivi medici.

Gli studi preclinici dimostrano l'elevata attività antifungina degli oli essenziali verso *C. albicans* in modelli di infezione sperimentale mucosale e sistemica murina, anche con l'uso di ceppi fungini resistenti. Tali indagini costituiscono un valido supporto sperimentale preclinico per studi di sicurezza d'uso e di efficacia. Ulteriori studi anche sul ruolo sinergistico con oli essenziali e con farmaci potrebbero anche essere utili per migliorare l'indice terapeutico di alcuni farmaci, come quelli antifungini, attualmente tossici per l'ospite alle dosi impiegate.

Purtroppo, ad oggi, gli studi clinici con gli oli essenziali sono scarsi e metodologicamente carenti, e inoltre sono poche le informazioni ottenute circa la sicurezza d'uso degli oli essenziali per via orale. Per l'eventuale uso clinico ci sono ancora molti problemi da affrontare quali la necessità di standardizzazione dei metodi di estrazione, dei criteri di qualità dell'olio essenziale testato e delle metodiche *in vitro*, in modo che la ricerca possa essere più sistematica e l'interpretazione dei risultati più facilitata. Sono necessarie inoltre ulteriori conferme scientifiche (studi pre-clinici, clinici, farmacocinetici, farmacodinamici, di tossicità) delle evidenze empiriche terapeutiche provenienti dalla tradizione clinica.

## Bibliografia

1. World Health Organization. *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. Geneva: WHO; 2014. Disponibile all'indirizzo: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1); ultima consultazione 8/4/15.
2. Teuber M. Veterinary use and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* 2001;4:493-9.
3. Heuer OE, Hammerum AM, Collignon P, Wegener HC. Human health hazard from antimicrobial-resistant enterococci in animals and food. *Clin Inf Dis* 2006;43:911-6.
4. Bush K, Courvalin P, Dantas G, Davies J, Eisenstein B, Huovinen P, Jacoby GA, Kishony R, Kreiswirth BN, Kutter E, Lerner SA, Levy S, Lewis K, Lomovskaya O, Miller JH, Mobashery S, Piddock LJ, Projan S, Thomas CM, Tomasz A, Tulkens PM, Walsh TR, Watson JD, Witkowski J, Witte W, Wright G, Yeh P, Zgurskaya HI. Tackling antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 2011;9(12):894-6.
5. Lang G, Buchbauer G. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. *Flavour and Fragrance Journal* 2012;27(1):13-39.

6. Solórzano-Santos F, Miranda-Navales MG. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol* 2012; 23(2):136-41.
7. Hammer KA, Carson CF. Antibacterial and antifungal activities of essential oils. In: Thormar H (Ed.). *Lipids and essential oils as antimicrobial agents*. Chichester: John Wiley & Sons; 2011. p. 255-306.
8. Camporese A. *Oli essenziali e malattie infettive. Terapia antimicrobica ragionata con gli oli essenziali*. Milano: Tecniche Nuove (Ed). 1998
9. Giordani R, Hadeif Y, Kaloustian J. Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia* 2008;79(3):199-203.
10. Bassolé IH, Juliani HR. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules* 2012;17(4):3989-4006.
11. Lorenzi V, Muselli A, Bernardini AF, Berti L, Pagès JM, Amaral L, Bolla JM. Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from gram-negative species. *J Antimicrob Chemother* 2009; 53(5):2209-11.
12. Chami F, Chami N, Bennis S, Trouillas J, Remmal A. Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54(5):909-14.
13. Chami N, Chami F, Bennis S, Trouillas J, Remmal A. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *Braz J Infect Dis* 2004;8(3):217-26.
14. Chami N, Bennis S, Chami F, Aboussekhra A, Remmal A. Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol *in vitro* and *in vivo*. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20(2):106-11.
15. Maruyama N, Takizawa T, Ishibashi H, Hisajima T, Inouye S, Yamaguchi H, Abe S. Protective activity of geranium oil and its component, geraniol, in combination with vaginal washing against vaginal candidiasis in mice. *Biol Pharm Bull* 2008;31(8):1501-6.
16. Inouye S, Uchida K, Yamaguchi H. *In-vitro* and *in-vivo* anti-*Trichophyton* activity of essential oils by vapour contact. *Mycoses* 2001;44(3-4):99-107.
17. Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Salvatore G, Cassone A. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic yeasts. *J Antimicrob Chemother* 2003;51(5):1223-9.
18. Mondello F, De Bernardis F, Girolamo A, Cassone A, Salvatore G. *In vivo* activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. *BMC Infect Dis* 2006;6:158.
19. Carson CF, Hammer KA. Chemistry and bioactivity of essential oils. In: Thormar H (Ed.). *Lipids and essential oils as antimicrobial agents*. Chichester: John Wiley & Sons; 2011. p. 203-38.
20. Carson CF, Hammer KA, Nielsen JB. Efficacy and safety of tea tree and other oils. In: Walters KA, Roberts MS (Ed.). *Dermatologic, cosmetic, and cosmetic development: therapeutic and novel*. New York: CRC Press; 2007. p. 437-52.

## MICROBIOLOGIA DEGLI OLI ESSENZIALI NELLE INFEZIONI FUNGINE

Vivian Tullio, Daniela Scalas, Narcisa Mandras

*Dipartimento Scienze della Sanità Pubblica e Pediatriche, Sezione di Microbiologia, Università di Torino, Torino*

Le infezioni fungine rappresentano un problema assai diffuso in ogni parte del mondo e la loro incidenza continua ad aumentare. Sono classificate, dal punto di vista clinico, in base alla patologia provocata, in: micosi superficiali che sono per lo più asintomatiche e dovute alla colonizzazione della superficie della pelle e dei capelli; in alcuni casi, originano dalla proliferazione di lieviti normalmente residenti (*Malassezia furfur*, *Trichosporon* spp.); micosi cutanee che coinvolgono gli strati cornei della cute e gli annessi cutanei: comprendono le dermatofizie (da dermatofiti) e le dermatomicosi (da lieviti e altri funghi filamentosi non dermatofiti); micosi subcutanee dovute ad un impianto traumatico dei funghi nei tessuti sottocutanei (es. cromoblastomicosi, micetomi); micosi profonde dovute a funghi filamentosi e lieviti che per via ematica possono disseminare e coinvolgere gli organi interni (1).

Tra le diverse infezioni fungine, le micosi superficiali e cutanee costituiscono un gruppo di affezioni in continua e allarmante crescita come numero e come causa di morbilità. Anche se queste infezioni non rappresentano delle patologie gravi che mettono in pericolo la vita del paziente, sono pur sempre infezioni fastidiose che possono cronicizzare e diffondere tra gli individui immunocompetenti della popolazione, peggiorandone la qualità della vita anche dal punto di vista psicologico. Nelle micosi superficiali l'individuo infettato sviluppa una scarsa, o nulla, risposta immunitaria e il danno che ne riceve è prevalentemente di natura estetica. Gli agenti eziologici sono per lo più ubiquitari, per alcuni (*Hortaea werneckii*, *Piedraia hortae*) l'habitat naturale è il suolo, altri (*Malassezia* spp., *Trichosporon cutaneum*) si ritrovano generalmente come saprofiti facendo parte dell'abituale microbiota cutaneo umano. Nelle micosi cutanee la presenza dei funghi e dei loro prodotti metabolici è irritante e stimola le difese immunitarie dell'organismo responsabili della reazione infiammatoria e dei successivi sintomi. Le micosi cutanee provocate da miceti cheratinofili come i dermatofiti vengono definite dermatofizie per indicare che gli agenti eziologici sono miceti che utilizzano la cheratina come fonte principale di nutrimento. I principali dermatofiti delle nostre regioni sono *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *M. gypseum* ed *Epidermophyton floccosum*. Le micosi cutanee denominate dermatomicosi sono, invece, causate da altri funghi filamentosi non dermatofiti, solitamente saprofiti o patogeni vegetali, quali *Fusarium* spp., *Acremonium* spp. e *Scopulariopsis* spp. Le dermatomicosi possono essere causate anche da lieviti appartenenti al genere *Candida*, abituali saprofiti o commensali dell'uomo, che diventano patogeni solo quando si realizzano condizioni favorevoli. All'interno del genere *Candida*, il patogeno più diffuso è *Candida albicans* che può dare manifestazioni acute, subacute, croniche ed episodiche e può interessare la cute, gli annessi cutanei e gli organi interni, provocando nei casi più gravi setticemie e meningiti.

Nonostante la disponibilità di numerosi agenti antifungini, la terapia di queste infezioni presenta ancora rilevanti problemi riconducibili sia alla comune struttura eucariotica delle cellule fungine e animali, sia all'efficacia e alla tossicità del farmaco, nonché al più recente possibile sviluppo di ceppi resistenti (2). Nell'ambito dei trattamenti delle dermatofizie, sono largamente usati sia farmaci per uso topico sia per uso sistemico. Nel trattamento delle dermatomicosi ci sono diversi fattori che rendono difficile la guarigione come, ad esempio, la

limitata correlazione tra i risultati dei test di sensibilità *in vitro* ed esito clinico, la difficoltà di fornire una diagnosi precoce e, soprattutto, la resistenza ai più comuni antimicotici. I funghi filamentosi non dermatofiti non rispondono in modo soddisfacente alla maggior parte dei farmaci usati nelle dermatofizie; tuttavia sembra che gli azoli siano i più efficaci, soprattutto quelli di recente impiego, come i triazolici.

Per tali ragioni, sarebbe fondamentale, oltre ad una corretta identificazione dell'agente eziologico e a un utilizzo più razionale dei farmaci attivi nei confronti dei ceppi fungini, l'introduzione di nuove molecole di supporto alle terapie note, che siano efficaci nei confronti dei ceppi resistenti, che tengano conto sia delle caratteristiche del micete coinvolto (lievito o filamentoso) che del tipo di patologia da trattare. A questo scopo, nel tentativo di dare il proprio contributo terapeutico, la fitoterapia si è arricchita di un certo numero di prodotti vegetali, quali ad esempio gli oli essenziali che, possedendo molte proprietà farmacologiche, risultano tra i più importanti agenti antimicrobici naturali. I prodotti di origine vegetale potrebbero risultare, così, degli ottimi "farmaci" di supporto a quelli tradizionali, a patto che si ottengano risultati scientifici che confermino l'attività terapeutica ipotizzata. Per questo motivo, oggi, nuove sostanze, di origine vegetale, vengono saggiate *in vitro* e *in vivo* per valutarne il possibile utilizzo a livello clinico. In questo senso, risulta importante introdurre dei metodi standardizzati per la valutazione dell'attività dei prodotti naturali.

Nella nostra esperienza l'attività antifungina di numerosi oli essenziali (timo rosso, melissa, chiodi di garofano, finocchio, pino, salvia, lavanda, origano, melaleuca, menta, mirto, rosmarino, e altri) e di alcuni dei loro principali costituenti è stata valutata nei confronti di miceti filamentosi, compresi i dermatofiti, e diverse specie di lieviti (*Candida* spp. e non-*Candida* spp.), mediante i parametri microbiologici standard, quali la minima concentrazione inibente (*Minimum Inhibitory Concentration*, MIC) e la minima concentrazione fungicida (*Minimum Fungicidal Concentration*, MFC). Anche se ad oggi non esistono metodiche standardizzate e convalidate dalla comunità scientifica per valutare l'attività antifungina degli oli essenziali, essa è stata determinata utilizzando il metodo della microdiluzione scalare in brodo, secondo le specifiche proposte dal CLSI e modificato per alcuni funghi (3). Come MIC si è definita la più bassa concentrazione di olio in grado di inibire visivamente la crescita fungina a 33°C per 24-48 ore per i lieviti e dopo 3 e 7 giorni di incubazione a 30°C per i funghi filamentosi, mentre come MFC è stata definita la minima concentrazione in grado di impedire completamente la crescita fungina dopo 3 giorni a 30°C.

I risultati ottenuti mostrano un'attività inibente degli oli essenziali variabile in relazione alla specie fungina (lievito o muffa). Pur osservando scarsa attività nei confronti di *S.brevicaulis* e degli zigomiceti (*Mucor* e *Rhizopus*), i dati ottenuti evidenziano una reale efficacia degli oli saggiati e, in particolare, per alcuni di essi, di inibire la crescita dei miceti, sia filamentosi che lieviti, già a basse concentrazioni (Figure 1, 2). È il caso questo degli oli essenziali di timo, di pino, di origano e di chiodi di garofano, che hanno dimostrato di essere i più efficaci, mostrando valori di MIC in alcuni casi anche molto bassi, soprattutto verso i ceppi di dermatofiti, *F. oxysporum* (Figura 1) e *C. glabrata* (Figura 2). Il riscontro di questi dati è di grandissima importanza alla luce delle evidenti resistenze che molti ceppi di *C. glabrata* stanno dimostrando nei confronti delle terapie tradizionali con azoli. Le pompe di efflusso e l'alterata produzione di ergosterolo, sembra siano i principali meccanismi attraverso cui questa specie si dimostra, nella maggior parte dei casi, non sensibile all'attività degli azoli (4).

L'olio essenziale di pino sorprendentemente mostra, per i lieviti, un'attività inibente più elevata rispetto ai chiodi di garofano e al timo; i suoi maggiori componenti sono idrocarburi terpenici che, come molti studi hanno già dimostrato, possiedono elevate capacità antimicrobiche, non solo nei confronti dei miceti, ma anche verso batteri e virus, dimostrandosi una delle classi di composti di origine vegetale più attiva in questo senso.

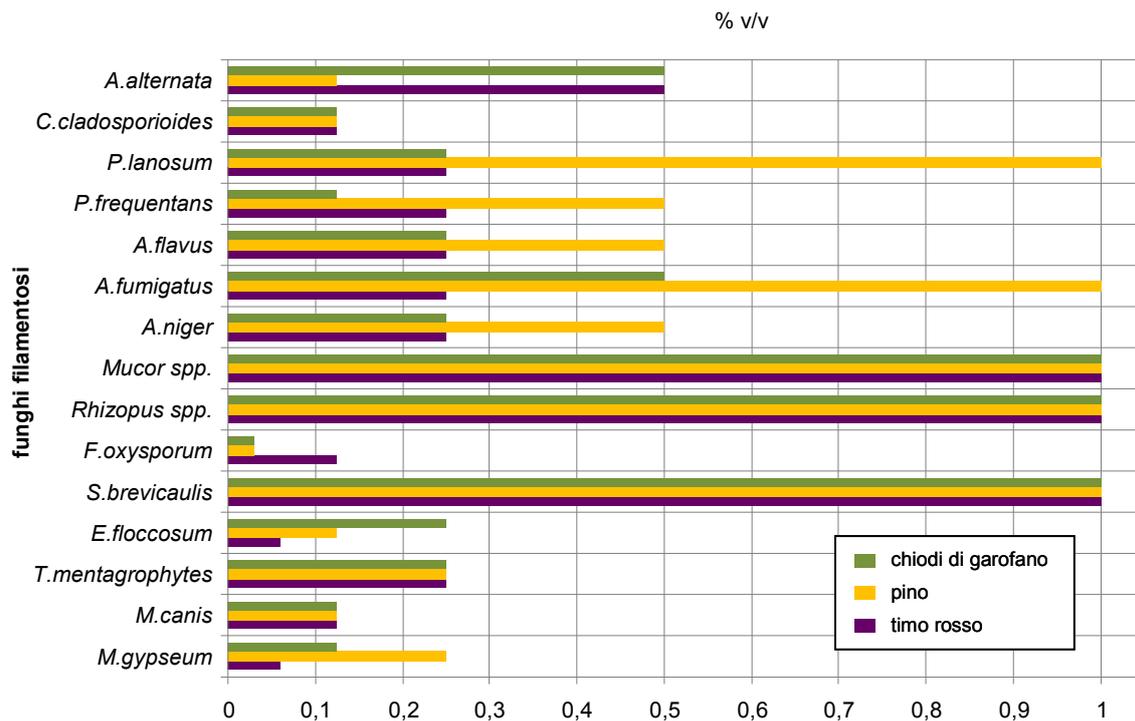


Figura 1. Valori di MIC di funghi filamentosi in presenza di olio essenziale di chiodi di garofano, pino e timo rosso

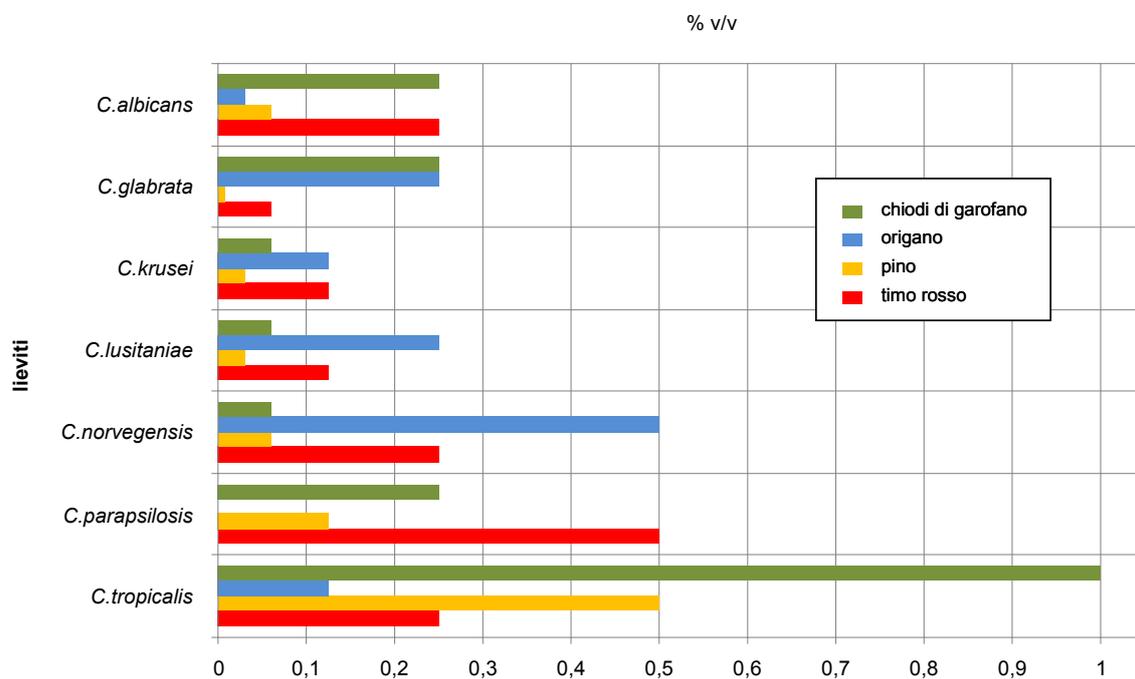


Figura 2. Valori di MIC di *Candida* spp. in presenza di olio essenziale di chiodi di garofano, pino e timo rosso

Non sorprende il fatto che gli oli di timo e chiodi di garofano presentino una elevata inibizione della crescita fungina dato che i loro componenti principali sono fenoli, quali timolo, carvacrolo, eugenolo, composti caratterizzati da elevata bioattività. I saggi effettuati su alcuni componenti come il timolo, il carvacrolo e l'eugenolo hanno fornito risultati incoraggianti, anche se con valori di MIC più elevati rispetto all'olio *in toto*.

Per quanto riguarda la MFC dopo 48 ore, per alcuni miceti i valori sono risultati uguali alla MIC, indicando un'azione fungicida, mentre per altri al massimo superiori di 1-2 diluizioni, indicando un'azione fungistatica dei diversi oli saggiati. Non sono stati ancora studiati nel dettaglio i siti specifici in cui agiscono i componenti degli oli essenziali, né i loro meccanismi di azione. Tuttavia, considerato l'alto numero di composti chimici presenti negli oli essenziali è presumibile che la loro attività antimicrobica non sia attribuibile ad uno specifico meccanismo, ma piuttosto ad una serie di azioni che si combinano e si amplificano per effetto di molecole che agiscono in sinergia. Sarebbe, quindi, un errore pensare che le molecole presenti negli oli essenziali agiscano meglio singolarmente, a seconda della classe chimica di appartenenza, e quindi isolarli per uso terapeutico. La natura ci offre un insieme di composti che agiscono in modo ottimale quando siano rispettati i sottili equilibri sinergici della pianta, un'arma in più capace di combattere infezioni resistenti ai comuni chemioterapici e antifungini.

In considerazione dei risultati ottenuti, gli oli essenziali sembrano possedere un potenziale applicativo promettente nei confronti di numerosi miceti. Anche se molti oli vengono già usati empiricamente in campo medico e veterinario per la cura di numerose patologie infettive, soprattutto batteriche e virali e, più raramente, fungine, l'utilizzo terapeutico degli oli necessita di ulteriori studi per confermare e approfondire i dati finora ottenuti, per valutarne il meccanismo d'azione e i parametri di farmacocinetica e farmacodinamica. È perciò auspicabile che le varie ricerche sperimentali e cliniche continuino, al fine di migliorare le indicazioni, le modalità e i limiti di questo tipo di terapia.

## Bibliografia

1. Tullio V, Funghi. In: Carlone NA, Pompei R (Ed.). *Microbiologia farmaceutica*. II ed. Napoli: Edises; 2012. p. 215-26.
2. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ellis D, Tullio V, Rodloff A, Fu W, Ling TA; Global Antifungal Surveillance Group. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol* 2010; 48(4):1366-77.
3. Tullio V, Nostro A, Mandras N, Dugo P, Banche G, Cannatelli MA, Cuffini AM, Alonzo V, Carlone NA. Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. *J Appl Microbiol* 2007;102(6):1544-50.
4. Vermitsky JP, Edlind TD. Azole resistance in *Candida glabrata*: coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-like transcription factor. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(10):3773-81.

## ATTIVITÀ ANTIMICROBICA DELL'OLIO ESSENZIALE DI *MYRTUS COMMUNIS* SU *MYCOBACTERIUM* SPP.

Stefania Zanetti, Paola Molicotti, Sara Cannas

Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari, Sassari

Il mirto (*Myrtus communis*) è una sclerofilla che cresce spontaneamente nella macchia mediterranea. Possiede una notevole plasticità ecologica per la sua capacità di crescere e svilupparsi nelle aree costiere e sub-costiere, sino ad ambienti interni umidi e freddi. In Sardegna la sua abbondanza è sfruttata per la produzione di liquori, dalle riconosciute proprietà digestive, ottenuti dalla macerazione delle bacche e delle foglie. In campo cosmetico, per le sue proprietà toniche e antisettiche, l'essenza ricavata dai fiori è utilizzata per la preparazione di creme e detergenti.

Nella tradizione popolare si ritiene che il mirto favorisca la digestione ed espliciti attraverso un'azione immunomodulante, una funzione antinfiammatoria, nelle cistiti, gengiviti e nelle emorroidi, ed il decotto delle foglie inoltre è un valido rimedio contro l'infezione delle vie respiratorie. Solo recentemente è stata valutata l'attività antimicrobica (1) dell'olio essenziale di *M. communis* nei confronti di batteri Gram-positivi e Gram-negativi e sui lieviti e i risultati ottenuti hanno mostrato una buona efficacia nei confronti di questi due ultimi microrganismi.

In questo studio abbiamo analizzato la sua attività nei confronti dell'agente eziologico della tubercolosi: il *Mycobacterium tuberculosis* e nei confronti di Micobatteri Non Tubercolari (MNT) di isolamento clinico. Questi microrganismi sono caratterizzati da acido-alcol resistenza, da una parete ricca di acidi micolici e da una lenta replicazione (24-48 h).

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), ogni anno 2 milioni di persone muoiono a causa di questa malattia e 9 milioni si ammalano (2). I tassi di incidenza sono più elevati nei Paesi in via di sviluppo (Africa sub sahariana, Sud Est asiatico, India), e nell'Europa dell'est. L'Italia è considerata un Paese a bassa incidenza con meno di 10 casi/100.000 abitanti l'anno. La diffusione di questo microrganismo è legata essenzialmente ad una trasmissione prevalentemente aerogena, ed è aggravata dalla circolazione di ceppi *Multi Drug-Resistant Tuberculosis* (TB-MDR) e *eXtensively Drug-Resistant Tuberculosis* (TB-XDR), difficilmente curabili con la terapia antitubercolare prevista dalle linee guida internazionali (3).

La terapia, sostanzialmente costituita da pochi farmaci, il più recente dei quali risale agli anni 50, prevede l'assunzione contemporanea di 3 o 4 farmaci per un periodo minimo di 6 mesi. In questo lavoro l'olio essenziale, estratto con idrodistillazione Clavenger dalle foglie di mirto e successivamente analizzato con gas cromatografia di massa, per determinarne la composizione chimica, è stato utilizzato per valutare la sua attività antimicrobica nei confronti di ceppi ATCC (*American Type Culture Collection*) di *M. tuberculosis*, di ceppi clinici resistenti a uno o più farmaci antitubercolari e nei confronti di isolati di MNT. Sono stati inoltre saggiati i singoli composti dell'olio essenziale per valutare la loro efficacia rispetto all'olio essenziale in toto, così come è stata studiata la sua tossicità nei confronti della linea cellulare J774 (macrofagi murini).

## Materiali e metodi

In questo studio l'estrazione dell'olio essenziale di *M. communis* dalle foglie è stata ottenuta attraverso il metodo della idrodistillazione (HD) con un apparato di tipo Clevenger, in accordo con la Farmacopea Europea. La composizione dell'olio essenziale è stata analizzata attraverso la gas cromatografia/spettrometria di massa (*Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, GC/MS). Le foglie di *M. communis* sono state collezionate nella primavera del 2010 a Domus de Maria, località del sud della Sardegna. L'attività antimicrobica è stata saggiata con il *Resazurin Microtiter Assay* (REMA).

### Idrodistillazione

L'idrodistillazione è stata effettuata in un apparato circolare di Clevenger, fino al completo esaurimento dell'olio contenuto nella matrice, in accordo con la procedura descritta dalla Farmacopea Europea (4).

### GC e GC/MS

L'analisi della frazione volatile dell'olio è stata effettuata attraverso la GC e GC-MS.

L'identità dei componenti è stata assegnata attraverso il confronto dello spettro di massa e gli indici di ritenzione, per due differenti fasi stazionarie cromatografiche, calcolate attraverso interpolazione lineare per la conservazione di una serie di n-alcani. I dati ottenuti sono stati comparati con i dati presenti in letteratura di oli di riferimento e standard commerciali (5, 6). Le percentuali dei componenti individuali sono stati calcolati, sulla base dei picchi dell'area di GC senza la correzione del fattore di risposta FID (*Flame Ionization Detector*, rilevatore a ionizzazione di fiamma) (Tabella 1).

**Tabella 1. Composizione chimica dell'olio essenziale di *Myrtus communis***

Tempo di ritenzione (minuti)	Indice di ritenzione Kovats	Olio essenziale di <i>M. communis</i> (%)	Componenti
5,17	927	0,5	triciclene
5,38	<b>939</b>	<b>39,8</b>	<b><math>\alpha</math>-pinene</b>
4,72	<b>960</b>	<b>0,8</b>	<b>thuja-2,4(10)-diene</b>
7,88	1025	2,3	para-cymene
8,03	<b>1029</b>	<b>10,7</b>	<b>limonene</b>
8,13	<b>1031</b>	<b>24,8</b>	<b>1,8-cineolo</b>
9,03	1060	0,8	$\gamma$ -terpinene
10,09	1089	0,8	terpinolene
10,52	<b>1097</b>	<b>6,4</b>	<b>linalolo</b>
14,10	1189	2,6	$\alpha$ -terpineolo
16,86	1257	5,4	linalolo acetato
20,73	1300	1,0	terpin-4-olo acetato
22,20	1381	2,8	geranil acetato
23,04	1404	1,2	metil eugenolo

In grassetto i principali componenti chimici del *M. communis*

## Ceppi batterici saggiati

L'olio essenziale di *M. communis* è stato saggiato su 2 ceppi ATCC (H37Rv e H37Ra) e 14 isolati clinici di *M. tuberculosis*. I due ceppi ATCC e 2 dei 14 isolati clinici sono risultati sensibili a tutti i farmaci di prima linea: Streptomina, Isoniazide, Rifampicina e Etambutolo (SIRE). I restanti (12) isolati clinici sono risultati resistenti a un farmaco (5 isolati), a due farmaci (6 isolati) e a tre farmaci (1 isolato), tutti appartenenti agli antitubercolari di prima scelta, SIRE. In particolare 3 di essi sono risultati *Multi Drug Resistant* (MDR), resistenti a Isoniazide e Rifampicina, capisaldi della terapia antitubercolare.

L'attività dell'olio essenziale è stata inoltre saggiata su 10 isolati clinici di MNT: *M. intracellulare*, *M. simiae*, *M. gordonae*, *M. xenopi*, *M. kansasii*, *M. phlei*, *M. abscessus*, *M. avium*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*.

## REMA: test di sensibilità per *M. tuberculosis* e MNT

Il REMA è un test colorimetrico che attraverso una reazione di ossido riduzione rileva la vitalità cellulare. Il saggio utilizza l'indicatore resazurina, che aggiunto dopo l'esposizione del microrganismo a diverse concentrazioni di farmaco, vira dal blu al rosa, in modo direttamente proporzionale al numero di micobatteri vitali, presenti nel terreno di coltura. È stata considerata la MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*), la minore concentrazione di antimicrobico che ha impedito il viraggio del colore. Tutti i valori di MIC ottenuti con i farmaci antitubercolari e con l'olio essenziale di *M. communis*, sono stati infine confrontati, con quelli ottenuti con il metodo proporzionale e con il Bactec MGIT 960 (Becton Dickinson) (7, 8). In ogni reazione è stato aggiunto un controllo positivo e uno negativo.

## Saggio di citotossicità

Per il saggio di tossicità è stato utilizzato il saggio colorimetrico MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Il bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio è un sale che è convertito in formazano, soluzione insolubile porpora (cellule vitali), dalle deidrogenasi mitocondriali, per rottura dell'anello di tetrazolio. Per il test, l'olio essenziale di *M. communis* a concentrazioni scalari [16-0,0005%(v/v)] è stato messo a contatto (30 minuti) con la linea cellulare J774 (macrofagi murini); infine l'aggiunta dell'isopropanolo, che solubilizza il formazano eventualmente formatosi, consente la lettura in spettrofotometria ad una lunghezza d'onda di 570 nm.

## Risultati e conclusioni

I dati ottenuti in questo lavoro preliminare hanno evidenziato l'azione antibatterica dell'olio essenziale [MIC di 0,17 % (v/v)] nei confronti dei due ceppi ATCC (H37Rv e H37Ra) e di 14 isolati clinici di *M. tuberculosis*, 12 dei quali resistenti ad uno o più antitubercolari ed in particolare 3 erano ceppi MDR (Tabella 2). È stata inoltre valutata l'azione delle principali frazioni dell'olio essenziale di *M. communis*, limonene, 1-8 cineolo, alfa-pinene, nei confronti dei due ceppi ATCC e nei confronti dei 14 isolati clinici.

I risultati (Tabella 3) ottenuti, dimostrano una buona attività del limonene e dell'1-8-cineolo, il primo su tutti i ceppi di *M. tuberculosis* saggiati, il secondo oltre agli ATCC anche nei confronti di 8 isolati clinici [MIC di 2% (v/v)].

**Tabella 2. MIC dell'olio essenziale di *Myrtus communis* e concentrazione *break-point* dei principali farmaci antitubercolari nei confronti di ceppi ATCC e di isolati clinici di *Mycobacterium tuberculosis* (dati ottenuti con REMA)**

Ceppi	Principali farmaci antitubercolari (concentrazione <i>break-point</i> )				Olio essenziale di <i>M. communis</i> * MIC % v/v
	streptomicina	isoniazide	rifampicina	etambutolo	
<b>ATCC (2)</b>					
H37Rv	S	S	S	S	0,17
H37Ra	S	S	S	S	0,17
<b>Isolati clinici (14)</b>					
2	S	S	S	S	0,17
3	S	S	R	S	0,17
1	R	R	S	S	0,17
1	R	S	R	S	0,17
1	R	R	S	R	0,17
3	S	R	R	S	0,17
1	R	S	S	S	0,17
1	S	R	S	R	0,17
1	S	S	S	R	1

S: sensibile, R: Resistente

\* concentrazioni saggiate da 16→0,08 % v/v

**Tabella 3. Confronto tra l'attività antibatterica dell'olio essenziale di *Myrtus communis* in toto e quella dei suoi principali componenti nei confronti di ceppi ATCC e di isolati clinici di *Mycobacterium tuberculosis***

Ceppi	Antibiotici SIRE	Olio essenziale di <i>M. communis</i> (MIC % v/v)			
		<i>in toto</i>	componenti		
			limonene	1,8-cineolo	α-pinene
<b>ATCC (2)</b>					
H37Rv	Sensibile	0,17	2	2	1
H37Ra	Sensibile	0,17	2	2	1
<b>Isolati clinici (14)</b>					
2	Sensibile	0,17	2	2	1
1	R a S	0,17	2	2	1
2	R a R	0,17	2	2	1
1	R a R	0,17	2	2	16
1	R a E	1	2	>16	2
1	R a SI	0,17	2	>16	8
1	R a SR	0,17	2	2	1
1	R a IE	0,17	2	>16	2
1	R a SIE	0,17	2	>16	2
3	R a IR	0,17	2	>16	8

SIRE (S: Streptomicina, I: Isoniazide, R: Rifampicina, E: Etambutolo);

Resistente a (R a): S: Streptomicina, R: Rifampicina E: Etambutolo

SI: Streptomicina + Isoniazide

SR: Streptomicina + Rifampicina

IE: Isoniazide + Etambutolo

SIE: Streptomicina + Isoniazide + Etambutolo

IR: Isoniazide + Rifampicina

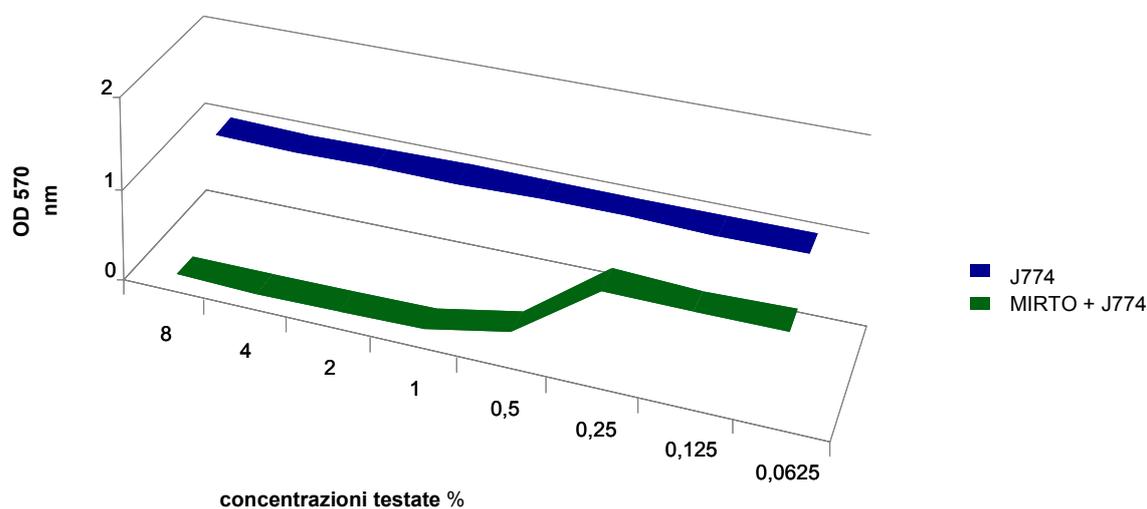
Per quanto riguarda l' $\alpha$ -pinene l'olio essenziale di *M. communis* ha avuto una maggiore attività antibatterica, rispetto alle precedenti frazioni [MIC 1%(v/v)] oltre che sugli H37 anche su 5 isolati clinici. Il confronto tra l'olio essenziale "in toto" e le frazioni, dimostra però che il primo è più efficace nei confronti di tutti i ceppi saggiati di *M. tuberculosis*. È stata inoltre valutata l'attività dell'olio essenziale su 10 isolati clinici di MNT (Tabella 4).

**Tabella 4. Attività antibatterica dell'olio essenziale di *Myrtus communis* nei confronti di Micobatteri Non Tubercolari (MNT)**

MNT (10 isolati clinici)	Olio essenziale di <i>M. communis</i> * MIC % v/v
(1) <i>M. intracellulare</i>	4
(1) <i>M. simiae</i>	0,035
(1) <i>M. gordonae</i>	4
(1) <i>M. xenopi</i>	0,008
(1) <i>M. kansasii</i>	0,016
(1) <i>M. phlei</i>	0,061
(1) <i>M. abscessus</i>	0,125
(1) <i>M. avium</i>	0,125
(1) <i>M. scrofulaceum</i>	0,125
(1) <i>M. szulgai</i>	0,016

\* concentrazioni saggiate da 16→0,08 % v/v

I risultati mostrano anche in questo caso l'efficacia dell'olio essenziale di *M. communis* nei confronti di tutti i ceppi saggiati con valori di MIC, in alcuni isolati, più bassi rispetto a quelli osservati con *M. tuberculosis* [range 0,008-4% (v/v)]. È stato verificato inoltre con il saggio MTT la possibile tossicità di questo olio su una linea cellulare macrofagica (J774) e i risultati (Figura 1) evidenziano che a concentrazioni inferiori a 0,48% (v/v) il 50% delle cellule sono vitali.



**Figura 1. Citotossicità dell'olio essenziale di *Myrtus communis* su cellule macrofagiche murine**

Pertanto l'olio essenziale utilizzato ad una concentrazione  $\leq 0,48\%$  (v/v), valore che è superiore ai valori di MIC da noi riscontrati su tutti i ceppi di *M. tuberculosis* e su 8 dei 10 ceppi di MNT non è citotossico.

I buoni risultati ottenuti ci spingono a ipotizzare che l'olio essenziale di *M. communis* dato il suo potenziale effetto antibatterico nei confronti dell'agente eziologico della tubercolosi e degli MNT possa trovare, effettuando ulteriori studi, un loro eventuale possibile futuro impiego non come antitubercolare, ma come adiuvante della terapia antitubercolare.

## Bibliografia

1. Sardi JC, Almeida AM, Mendes Giannini MJ. New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites a brief review. *Arch Oral Biol* 2011;56(10):951-9.
2. World Health Organization. *Global tuberculosis report 2014*. Geneva: World Health Organization; 2014. Disponibile all'indirizzo: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809_eng.pdf?ua=1); ultima consultazione 23/4/2015.
3. Zanetti S, Sechi LA, Molicotti P, Delogu G, Rubino S. In honor of Professor Giovanni Fadda: a fighter against tuberculosis. *J Infect Dev Ctries* 2013;7:159-60.
4. Council of Europe. *European Pharmacopoeia 8th edition: supplement 8.2*. Strasbourg: Council of Europe; 2014.
5. Adams RP. *Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*. Carol Stream, Illinois, USA: Allured Publishing Corporation; 2004.
6. Joulain D, Konig WA. *The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons*. Hamburg: Verlag Hamburg; 1998.
7. Canetti G, Fox W, Khomenko A, Mahler HT, Menon NK, Mitchison DA, Rist N, Smelev NA. Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull World Health Organ* 1969;41(1):21-43.
8. Ardito F, Sanguinetti M, Sechi L, Posteraro B, Masucci L, Fadda G, Zanetti S. Comparison of the mycobacteria growth indicator tube with radiometric and solid culture for isolation of mycobacteria from clinical specimens and susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *New Microbiol* 2000;23(2):151-8.

## **EFFICACIA STRUTTURALE E FUNZIONALE DI UNA SINERGIA DI OLI ESSENZIALI E VEGETALI NELL'ANTI-AGE CUTANEO**

Mara Ramploud

Medico specialista in Pneumologia e Scienza dell'Alimentazione, ASL, Milano

L'invecchiamento cutaneo, un processo naturale ma considerato una vera e propria patologia dagli "estetico-dipendenti", è l'effetto della fisiologica evoluzione del nostro organismo, legata al passare degli anni. Vi sono diverse teorie sull'invecchiamento o meglio sulla velocità individuale dello stesso, tra cui quella genetica e quella acquisita a seconda della risposta dell'organismo agli eventi esterni (epigenetica).

Nell'individuo il viso è il distretto corporeo che, con più frequenza, richiede le cure della medicina estetica (1, 2).

L'invecchiamento del viso è la risultanza di effetti biochimici (formazione di radicali liberi) e di attivazioni muscolari (mimica) che, oltre a determinare alterazioni cutanee fisiche (rughe), determinano emozioni e risposte neurovegetative modulate da molecole biologiche (neurotrasmettitori, ormoni) che a loro volta mantengono le attivazioni muscolari. Le manifestazioni cliniche dell'invecchiamento oltre alle rughe sono: l'avvizzimento cutaneo, l'afflosciamento della pelle, la perdita di elasticità, l'iperpigmentazione e le macchie cutanee, la vasodilatazione capillare.

Il più evidente e riproducibile segno biologico di cute invecchiata è l'atrofia della matrice cellulare, determinata da una diminuzione del numero dei fibroblasti e di collagene (3). Questi effetti sono in parte dovuti da una continua produzione endogena di radicali liberi (*Reactive Oxygen Species*, ROS) durante il metabolismo ossidativo cellulare (4). Nelle aree cutanee esposte in maniera continuativa alla luce solare (raggi UVA e UVB), la produzione dei ROS è aumentata e, di conseguenza, il processo di invecchiamento è accelerato soprattutto per quanto riguarda le macchie cutanee, lentiggini, il numero e la profondità delle rughe (5).

Considerando l'estetica come armonia delle forme e la salute come armonia delle funzioni biologiche, in ogni essere vivente la forma è espressione della funzione e quindi salute ed estetica sono indissolubilmente legate nell'espressione di benessere individuale. La fisiognomica, che studia le particolarità del volto umano, permette di valutare attraverso l'interpretazione della fisionomia del viso gli aspetti biologici e caratteriali dell'individuo.

La medicina estetica attraverso i suoi interventi, soprattutto a livello del viso (*filler e lifting*), interferisce sulla fisionomia dell'individuo e conseguentemente ha una complessità di effetti psico-biologici superiore rispetto a quella finalizzata al mantenere un aspetto giovanile.

Per quanto detto, gli sforzi in ambito medico-estetico dovrebbero essere rivolti a sviluppare una metodica terapeutica che possa intervenire su tutti gli aspetti dell'individuo rispettando la fisiologica risposta biologica dell'essere umano.

La ricerca di terapie non invasive e non dannose per il controllo dell'*anti-aging* ha riportato l'interesse sull'utilizzo di estratti di piante e sullo studio delle loro proprietà antiossidanti (6), antibatteriche, neuromodulatrici.

Una delle possibilità terapeutiche in tal senso è l'aromaterapia che si occupa dell'impiego di oli essenziali estratti da piante aromatiche per il mantenimento della salute o per la terapia. Il trattamento con oli essenziali è sia topico, con potenzialità antibatterica, antinfiammatoria,

antiossidante e analgesica, sia sistemico, con interazione con i recettori del bulbo olfattivo e quindi stimolazione dell'area del cervello emozionale: il sistema limbico.

Uno studio osservazionale da me condotto, in collaborazione con le Università di Roma Tor Vergata e Perugia, ha mostrato che una miscela di oli essenziali somministrata per 30 giorni (gg) può migliorare direttamente le caratteristiche fisiche della cute del volto e indirettamente la condizione di benessere psico-fisico dei soggetti trattati.

A tal fine è stato reclutato un campione omogeneo di 10 soggetti di sesso femminile, di età compresa fra i 50 e 60 anni, dello stesso grado di scolarizzazione, con simili abitudini di vita e alimentari: tutti i soggetti sono stati sottoposti preliminarmente ad un test MSP (Misura dello Stress Percepito) finalizzato alla valutazione dei livelli percepiti dei disturbi prodotti in condizioni di stress. Il test MSP è stato poi ripetuto a fine ciclo terapeutico e a 30 e 90 gg dalla fine del trattamento. A fine ciclo terapeutico e a 30 e 90 gg dalla fine del trattamento, in associazione al test MSP è stato somministrato un test di autovalutazione cutanea; tutti i soggetti sono stati sottoposti a prova di sensibilizzazione alle miscele di sostanze utilizzate e successivamente al seguente protocollo terapeutico:

- *Trattamento "giorno"*  
una miscela di tre oli essenziali:
  - *Ledum groenlandicum*, 3 gocce (1, 8),
  - *Rosa x damascena* 4 gocce (9),
  - *Cupressus sempervirens* 3 gocce (10),
 in 100 mL di olio di *Macadamia integrifolia* (11), da applicare sul viso una volta al giorno al mattino per 30 gg;
- *Trattamento "notte"*  
peeling a base di acido glicolico (2-5%) per detergere la cute del viso seguito dall'applicazione di una miscela di tre oli essenziali:
  - *Daucus carota* 5 gocce (12),
  - *Canarium luzonicum* 3 gocce (14),
  - *Cananga odorata* 2 gocce (13),
 in 100 mL di *Borago officinalis* (12), da applicare sul viso una volta al giorno alla sera per 30 gg;

Il trattamento "giorno" ha prodotto i seguenti risultati (Tabella 1):

- un miglioramento sovrapponibile dei parametri "levigatezza e idratazione" in tutti i test eseguiti;
- un miglioramento del parametro "elasticità" in 9 soggetti su 10 nei test eseguiti 30 e 90 gg dopo il trattamento (1 soggetto già a fine trattamento);
- un miglioramento del parametro "luminosità" in 3 soggetti su 10 nei test eseguiti 30 e 90 gg dopo il trattamento (7 soggetti già a fine trattamento).

Il trattamento "notte" ha prodotto i seguenti risultati (Tabella 2):

- un miglioramento sovrapponibile dei parametri "levigatezza" e "idratazione" in tutti i test eseguiti;
- un miglioramento del parametro "elasticità" in 5 soggetti su 10 nei test eseguiti 30 e 90 gg dopo il trattamento (5 soggetti già a fine trattamento);
- un miglioramento del parametro "elasticità" nei test eseguiti a 30 e 90 gg dopo il trattamento (1 soggetto già a fine trattamento);

**Tabella 1. Trattamento “giorno”: test di autovalutazione sui parametri di levigatezza e idratazione, elasticità, e luminosità cutanea**

Soggetto	Levigatezza e idratazione			Elasticità cutanea			Luminosità cutanea		
	Fine trattamento	30 gg	90 gg	Fine trattamento	30 gg	90 gg	Fine trattamento	30 gg	90 gg
# 01	1	1	1	0	1	1	0	1	1
# 02	1	1	1	0	1	1	0	1	1
# 03	1	1	1	0	1	1	1	1	1
# 04	1	1	1	0	1	1	1	1	1
# 05	1	1	1	0	1	1	0	1	1
# 06	1	1	1	0	1	1	0	1	1
# 07	1	1	1	0	1	1	0	1	1
# 08	1	1	1	0	1	1	1	1	1
# 09	1	1	1	0	1	1	0	1	1
# 10	1	1	1	0	1	1	0	1	1

condizione iniziale: invariata e/o peggiorata = 0; migliorata = 1

**Tabella 2. Trattamento “notte”: test di autovalutazione sui parametri di levigatezza e idratazione, elasticità, e luminosità cutanea**

Soggetto	Levigatezza e idratazione			Elasticità cutanea			Luminosità cutanea		
	Fine trattamento	30 gg	90 gg	Fine trattamento	30 gg	90 gg	Fine trattamento	30 gg	90 gg
# 01	1	1	1	1	1	1	1	1	1
# 02	1	1	1	1	1	1	0	1	1
# 03	1	1	1	1	1	1	1	1	1
# 04	1	1	1	1	1	1	1	1	1
# 05	1	1	1	1	1	1	1	1	1
# 06	1	1	1	0	1	1	1	1	1
# 07	1	1	1	0	1	1	1	1	1
# 08	1	1	1	0	1	1	1	1	1
# 09	1	1	1	0	1	1	1	1	1
# 10	1	1	1	0	1	1	1	1	1

condizione iniziale: invariata e/o peggiorata = 0; migliorata = 1

Tutti i soggetti trattati acquisterebbero entrambi i prodotti (“giorno” e “notte”).

Il test MSP ha mostrato un globale miglioramento della condizione di stress percepito in tutti i soggetti già a fine trattamento per poi migliorare ulteriormente al controllo 30 giorni dopo la fine del trattamento e consolidarsi nella verifica effettuata 90 giorni dopo la fine del trattamento (Tabella 3).

Cicerone affermava che “il volto è lo specchio dell’anima”, i risultati ottenuti con questo studio, pur se limitati ad un numero ridotto di casi, sembrano confermare tale metafora.

La congruità dei risultati, ottenuta nei due test (autovalutazione cutanea e MSP), dimostra che, come già sappiamo da tempo in medicina, mimica facciale e condizione neuro-psicofisica dei soggetti trattati è strettamente correlata.

Tabella 3. MSP test totale

Soggetto	Prima trattamento	Fine trattamento	30 gg	90 gg
# 01	107	79	62	62
# 02	133	75	64	67
# 03	142	83	65	63
# 04	184	109	51	51
# 05	132	95	86	68
# 06	167	120	100	87
# 07	196	107	75	69
# 08	165	111	86	82
# 09	139	95	82	82
# 10	139	93	78	78

a valori maggiori corrisponde una condizione clinica peggiore

Infine, dallo studio emergono alcuni dati che potrebbero essere oggetto di ulteriori approfondimenti: la risposta generale è certamente legata alla funzione olfattiva che attiva i meccanismi neurovegetativi coinvolti nella risposta sistemica; è possibile, agendo direttamente sulla cute del volto, indurre un cambiamento locale e modulare la condizione generale del soggetto trattato; in ogni caso, gli oli essenziali dovrebbero essere considerati potenzialmente farmaci con eventuale effetto terapeutico determinato dai principi attivi e dalla loro associazione.

## Bibliografia

1. Serri R, Iorizzo M. Combating aging skin. *Clin Dermatol* 2008; 26(2):105.
2. Shiffman AM, Mirrifati JS, Lam MS, Cueteaux GC. *Simplified facial rejuvenation*. Berlin: Springer; 2008.
3. Quatresooz P, Piérard GE. Immunohistochemical clues at aging of the skin microvascular unit. *J Cutan Pathol* 2009;36(1):39-43.
4. Zanchetta LM, Kirk D, Lyng F, Walsh J, Murphy JEJ. Cell-density-dependent changes in mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species production in human skin cells post sunlight exposure. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2010;26(6):311-7.
5. Herrling T, Fuchs J, Rehberg J, Groth N. UV-induced free radicals in the skin detected by ESR spectroscopy and imaging using nitroxides. *Free Radic Biol Med* 2003;35(1):59-67.
6. Yang J, Guo J, Yuan J. *In vitro* antioxidant properties of rutin. *LWT-Food Science and Technology*. 2008;41(6):1060-6.
7. National Cancer Institute. *Aromatherapy and Essential Oils (PDQ®): Health Professional Version*. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2005 [updated 2014]. PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Disponibile all'indirizzo: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK82221/>; ultima consultazione 15/4/15.
8. Shenefelt PD. Herbal treatment for dermatologic disorders. In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S (Ed.). *Herbal medicine: biomolecular and clinical aspects. 2nd edition*. Boca Raton (FL): CRC Press; 2011. Chapter 18
9. Boskabady MH, Shafei MN, Saberi Z, Amini S. Pharmacological effects of rosa damascena. *Iran J Basic Med Sci* 2011;14(4):295-307.

10. Kuriyama H, Watanabe S, Nakaya T, Shigemori I, Kita M, Yoshida N, Masaki D, Tadai T, Ozasa K, Fukui K, Imanishi J. Immunological and Psychological Benefits of Aromatherapy Massage. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005;2(2):179-84.
11. Akhtar N, Yazan Y. Formulation and *in-vivo* evaluation of a cosmetic multiple emulsion containing vitamin C and wheat protein. *Pak J Pharm Sci* 2008;21(1):45-50.
12. Korać RR, Khambholja KM. Potential of herbs in skin protection from ultraviolet radiation. *Pharmacogn Rev* 2011;5(10):164-73.
13. Buchbauer G. Relaxing effect of ylang ylang oil on humans after transderm absorption. *Phytother Res* 2006;20(9):758-63.
14. Dorman HJD, Deans SG, Noble RC, Surai P. Evaluation *in vitro* of plant essential oils as natural antioxidants. *J Essent Oil Res* 1995;7:645-51.

## STRESS E OLI ESSENZIALI

Leonardo Paoluzzi (a), Paolo Campagna (b)

(a) Istituto Superiore di Ricerca in Medicina Tradizionale e Antropologia, Terni

(b) Società Italiana per la Ricerca sugli Oli Essenziali, Roma

Filogeneticamente i sensi chimici costituiscono il sistema sensoriale più antico e più comune tra gli esseri viventi. L'evoluzione della vita è avvenuta alla presenza di numerosissime sostanze chimiche, con la funzione di segnalare la presenza di cibo, di sostanze nocive e la possibilità di riproduzione. Privi di sistema nervoso organizzato, gli animali primitivi utilizzavano la chemiorecezione per lo svolgimento delle funzioni vitali di base.

Di fatto, nel corso di milioni di anni, le cose non sono molto cambiate. L'originaria sensibilità a sostanze chimiche presenti nell'ambiente, che ha presieduto l'evoluzione della vita, si è specializzata in numerosissimi chemiorecettori, che permettono all'uomo il riconoscimento di molecole presenti nell'atmosfera, nell'acqua o nel cibo, ma anche da noi stessi prodotte.

In particolare, i sensi chimici si sono perfezionati nelle tre vie sensoriali in grado di riconoscere le molecole presenti nell'ambiente: l'olfatto, il gusto e il sistema chemiorecettivo del trigemino. Il sistema olfattivo riconosce le molecole presenti nell'aria allo stato gassoso, il gusto riconosce le molecole che possono essere ingerite, mentre il sistema trigeminale, i cui ricettori sono costituiti da terminazioni libere e presentano proprietà comuni ai nocicettori, costituisce un sistema di rilevamento di molecole potenzialmente negative, come alcol, ammoniaca e sostanze pungenti. Il gusto e l'olfatto svolgono un compito simile mediante l'utilizzo di entrambi i sensi, il nostro sistema nervoso percepisce odori e sapori. L'informazione nasce dai ricettori del gusto e dell'olfatto, percorre vie nervose parallele e crea connessioni solo a livelli corticali superiori. Quando gli stimoli chimici raggiungono la corteccia sensoriale, si traducono molto spesso in sensazioni coscienti. Queste informazioni sensoriali sono strettamente e primariamente correlate a necessità fisiologiche, come la fame e la sete e coinvolgono sempre alcuni aspetti della vita affettiva, come gli altri stati emotivi e la memoria, in particolar modo l'olfatto, attraverso la così detta "memoria degli odori". Numerosi sono gli studi a livello internazionale circa la possibilità degli oli essenziali di agire a livello neuro-emozionale (1).

Gli attuali trattamenti per i disordini relativi all'ansia e alla depressione hanno differenti effetti e questi hanno portato a tentativi di ricerca di nuove sostanze con potenziali attività in questi stessi disordini. Il *Citrus aurantium* (arancio amaro) è stato scelto su dati etnofarmacologici poiché la medicina tradizionale attribuisce al genere *Citrus* la capacità di diminuire i sintomi dell'ansia e dell'insonnia, e l'arancio amaro è stato recentemente proposto come adiuvante per gli antidepressivi. In questo lavoro sono state investigate le attività biologiche fondamentali dell'olio essenziale del *C. aurantium* come ansiolitico e antidepressivo, il meccanismo alla base degli effetti simili agli ansiolitici, e i cambiamenti neurochimici nelle specifiche strutture del cervello di un topolino in seguito ad un trattamento acuto. È stato inoltre monitorato il topolino per intercettare possibili segni di tossicità dopo un trattamento di 14 giorni. L'effetto simile agli ansiolitici degli oli essenziali è stato esaminato in una scatola luce/buio, e l'attività antidepressiva è stata esaminata in un test di nuoto forzato. Il Flumazenil, un antagonista competitivo delle benzodiazepine, e il 5-HT1A recettore selettivo antagonista WAY100635 sono stati utilizzati nelle procedure sperimentali per determinare il meccanismo di azione degli oli essenziali. Per escludere risultati falsi positivi come l'indebolimento motorio, il topolino è stato sottoposto a un test rotatorio. I dati hanno stabilito che l'attività ansiolitica,

osservata mediante la procedura della scatola luce/buio in seguito a dosi acute (5 mg/kg) o ripetizione di 14 giorni (1 mg/kg/giornaliero), è stata rilevata mediante il sistema serotoninergico (recettori 5-HT<sub>1A</sub>). Il trattamento acuto con gli oli essenziali ha mostrato che non c'è nessuna attività nel test di nuoto forzato, il quale è sensibile agli antidepressivi. Una valutazione neurochimica ha dimostrato nessuna alterazione nei livelli dei neurotrasmettitori della corteccia, nella corpo striato, nel ponte e nell'ipotalamo. Inoltre, non ci sono segni d'indebolimento motorio o di tossicità o cambiamenti biochimici, eccetto una riduzione dei livelli del colesterolo, osservati in seguito al trattamento con gli oli essenziali.

Uno studio del 2012 contribuisce ad una migliore comprensione dell'attività biologica degli oli essenziali, in particolare dell'olio essenziale di *Citrus aurantium* riguardo il meccanismo di azione come ansiolitico (2). Lo scopo di questo studio era di determinare se l'aromaterapia migliorava l'ansia e/o la depressione nella donna a più alto rischio post parto e di fornire degli strumenti per una terapia complementare ai professionisti in campo medico. Lo studio pilota era quello dell'osservazione con misurazioni ripetute. Il consulto privato è avvenuto all'interno di un centro per le donne di un grande ospedale di Indianapolis. Sono state arruolate 28 donne, in fase post partum 0-18 mesi. I gruppi di cura sono stati prelevati "a caso" o all'interno del gruppo di inalazione o in quello di tecnica manuale di aromaterapia. I trattamenti erano strutturati in sessioni di 15 minuti, due volte a settimana, per quattro settimane consecutive. In tutti i trattamenti sono stati utilizzati gli oli essenziali di *Rosa damascena* e di *Lavandula angustifolia* in soluzione diluita al 2 %. Il gruppo dei "non a caso", composto da volontarie, è stato strutturato per evitare l'uso dell'aromaterapia durante le 4 settimane comprendenti il periodo di studio. Trattamenti medici allopatrici sono stati protratti su tutti i partecipanti. Tutti i soggetti completavano la scala di depressione postnatale di Edimburgo (*Edinburgh Postnatal Depression Scale*, EPDS) e la scala di disordine di ansia generale (*Generalized Anxiety Disorder 7-item*, GAD-7) all'inizio dello studio. Le scale sono state ripetute a metà percorso (due settimane) e alla fine del trattamento (quattro settimane). L'ANOVA (*ANalysis Of VAriance*) è stata utilizzata per determinare le differenze di punteggio in EPDS e/o in GAD-7 tra l'aromaterapia e i gruppi controllati all'inizio, alla metà e alla fine dello studio. Non sono state riscontrate differenze significative tra l'aromaterapia e i gruppi controllati all'inizio. I punteggi a metà e alla fine del trattamento hanno indicato che l'aromaterapia ha avuto risultati significativi maggiori rispetto ai gruppi controllati sia sull'EPDS che sulla GAD-7. Non ci sono stati effetti sfavorevoli.

Lo studio pilota indica risultati positivi con rischi esigui mediante l'uso di aromaterapia come terapia complementare sia sulla scala dell'ansia che della depressione *post-partum*. In un altro studio (3) è stata valutata l'attività della miscela di oli essenziali sui crampi mestruali per pazienti con dismenorrea primaria ed ha esplorato gli ingredienti analgesici all'interno degli oli essenziali. È stato condotto uno studio casuale, completamente anonimo. In 48 pazienti è stata diagnosticata dismenorrea primaria da un ginecologo con un punteggio maggiore di 5 in una scala di valutazione numerica con punteggio massimo 10 (*Numeric Scale Rating*, NRS). I pazienti sono stati assegnati casualmente ad un gruppo di oli essenziali (n. 24) e ad un gruppo di fragranza sintetica (n. 24). Estratti di oli essenziali di lavanda (*Lavandula officinalis*), salvia (*Salvia sclarea*) e maggiorana (*Origanum majorana*) in una scala di 2:1:1 sono stati diluiti in una crema non profumata al 3% di concentrazione per il gruppo di oli essenziali. Tutti i pazienti hanno utilizzato la crema giornalmente per massaggiare il loro basso addome dalla fine dell'ultima mestruazione fino all'inizio della consecutiva. Sia la scala numerica sia quella verbale sono significativamente diminuite ( $P < 0,001$ ) dopo un solo intervento sul ciclo mestruale in entrambi i gruppi. La durata del dolore è stata significativamente diminuita da 2,4 a 1,8 dopo l'intervento di aromaterapia nel gruppo degli oli essenziali. Il massaggio con gli oli aromatici ha portato sollievo ai pazienti con dismenorrea primaria e ha ridotto la durata del

dolore della mestruazione all'interno del gruppo di oli essenziali. L'estratto di oli essenziali contiene quattro parti di componenti analgesici che coprono il 79,29%; questi componenti analgesici sono linalil acetato, linalolo, eucaliptolo e betacariofillene. Questo studio suggerisce che l'estratto di questa formula può servire come referente per una medicina complementare del disturbo della dismenorrea primaria.

## **Esperienze cliniche personali con oli essenziali in sala parto**

La Terapia Olfattiva di Regolazione (TOR) è quella particolare modalità terapeutica che usa gli oli essenziali e che presuppone come oggetto del trattamento medico la conoscenza del "terreno" ovvero lo stato psico-neuro-endocrino-immune del soggetto malato. Pertanto lo scopo della TOR è di poter curare le cause che sono alla base della patologia e non il sintomo, che esprime soltanto il punto di cedimento del sistema. In altri termini, il sintomo va considerato solo come espressione di uno squilibrio più ampio, la cui soppressione farebbe perdere di vista la totalità del problema, in quanto viene eliminato un elemento di allarme che invece va inserito nel contesto generale e compreso nel suo significato.

La possibilità di usare sostanze naturali per il trattamento di uno squilibrio funzionale non fa riferimento all'evento patologico in sé ma all'alterazione del percorso fisiologico e pertanto deve inserirsi in quella sequenza che è stata turbata per ripristinarla. Ciò avviene sostenendo la fisiologia e i suoi processi normali e non antagonizzando il sintomo. Il TOR pertanto si basa sulla valutazione dell'azione globale che l'olio essenziale ha nei confronti del terreno psico-neuro-endocrino-immune e quindi sul suo orientamento al ripristino dei processi fisiologici dell'individuo, uscendo dal paradigma meccanicistico di sintomo-organo/struttura-rimedio, proponendo quello di struttura-energia-informazione.

La Psiconeuroendocrinoimmunologia (PNEI), secondo la scienza medica moderna, è una disciplina che si occupa delle relazioni fra il funzionamento del sistema nervoso, del sistema immunitario e del sistema endocrino. PNEI è quindi un complesso sistema di informazione interna preposta alla regolazione e al mantenimento dell'omeostasi.

In pratica accade che ogni nostra percezione (cognitiva/emozionale o percettiva/istintiva) mette in moto una precisa sequenza neurovegetativa tale che l'apparato endocrino, il sistema immunitario e le strutture organiche correlate danno una risposta adeguata a fare fronte al cambiamento necessario, che a sua volta rimanda l'informazione elaborata al mittente.

Oggi l'uomo si trova a dover gestire soprattutto le sue paure, le sue ansie, le sue preoccupazioni e le sue frustrazioni con mezzi inadeguati, perché quelli che ha attualmente a disposizione sono stati elaborati dalla natura per fare fronte a situazioni acute destinate a durare poco, mentre attualmente la necessità di gestione si protrae nel tempo e si va quindi nella direzione dello stress cronico (4). Premesso ciò, diciamo che in campo ostetrico per ciò che attiene alla gravidanza e al parto, nella letteratura internazionale ritroviamo che già da alcuni anni gli oli essenziali vengono usati allo scopo di lenire i dolori durante il travaglio, per calmare la neomamma in caso di ansia e per accelerare il processo delle doglie onde favorire l'espletamento del parto medesimo. Non ultimo, la possibilità di agire sulla paura e rilasciare la muscolatura perineale che potrebbe essere di ostacolo alla progressione del feto (5).

Tutti gli oli essenziali usati per via topica devono essere diluiti in un olio di base (in genere si consigliano 10 gocce di olio essenziale in 50 mL di olio di mandorle dolci, olio di germe di grano, olio di jojoba), al fine di evitare una esposizione della zona da trattare che sia troppo diretta e quindi potenzialmente lesiva per la cute oltre che eccessiva, ma possono essere anche

usati per via inalatoria una volta dispersi e fatti evaporare nell'ambiente. Sappiamo, infatti, che gli oli essenziali rappresentano un'informazione chimica che per via nasale o cutanea, attraverso un complesso meccanismo di trasduzione "olfattiva", arrivano direttamente nel cervello e più precisamente a livello del "sistema limbico" complessa formazione nervosa del cervello rettiliano, che presiede alle attività istintive e primitive attraverso una serie di risposte regolate dal sistema neurovegetativo simpatico o parasimpatico. La struttura limbica in realtà più che essere una struttura anatomica vera e propria corrisponde ad una unità funzionale molto complessa che supporta svariate funzioni psichiche come emotività, comportamento, memoria a lungo termine e olfatto.

È noto che l'idea di affrontare il parto, un'esperienza nuova, costituisce per la paziente in uno stato di ansia, di paura, di preoccupazione e quindi di tensione generale del corpo e dello stato d'animo. Tutto ciò può essere di ostacolo ad un espletamento normale del parto e tale terapia con gli oli essenziali può essere di grande sostegno.

Nel caso del dolore del parto anche se noi sopprimessimo il dolore con una anestesia epidurale, rimarrebbe la condizione mentale di paura e ansia che determinerebbe un ricordo spiacevole e comunque un non vissuto. Per ovviare a tale condizione di "ostacolo" e riprendendo esperienze simili che vengono condotte ormai da tempo negli ospedali inglesi nei servizi di maternità, per dare maggiore serenità e una migliore condizione organica che possa aiutare la neomamma e il nascituro, sono stati messi a punto alcuni protocolli presso l'Ospedale del Casentino di Bibbiena (AR). «L'aromaterapia riduce l'ansia e la paura aiutando le donne a sentirsi più rilassate e può contribuire a ridurre sintomi come bruciore di stomaco o mal di schiena. Quando le donne durante il travaglio sono rilassate, il loro bisogno di alleviare il dolore è ridotto, ma ogni donna è unica e si possono usare gli oli specifici per ogni esigenza», ha dichiarato Mary Carlisle, manager della Birth Suite presso il Southmead Hospital, nel Regno Unito. Partendo da questa considerazione che riteniamo fondamentale, presso l'ospedale suddetto sono stati presi in esame vari possibili protocolli. Un protocollo a base di *Citrus sinensis*, *Citrus bergamia*, *Lavandula* spp. ad azione "rinfrescante"; in quanto riducono il tono simpatico, calmano l'ansia e la paura, rasserenano, rilasciano lo stato generale della paziente, tonificano l'umore, hanno un'azione simpaticolitica che non altera lo stato di vigilanza. Un altro protocollo con un'azione opposta alla precedente a base di *Ocimum basilicum*, *Piper nigrum*, *Zingiber officinalis*, in quanto la paziente necessita di essere riscaldata ovvero tonificata nel senso stretto, per una possibile inerzia del sistema e per una dominanza del tono vagale. Un terzo protocollo quando c'è necessità di "purificare l'aria e la mente" agendo direttamente con odori gradevoli su paure remote ingiustificate, in quei soggetti che hanno paura di tutto, che soffrono o hanno sofferto di attacchi di panico con il *Citrus sinensis*, *Myrtus communis*, *Jasminum grandiflorum*. Infine, menzione a parte merita la *Salvia sclarea* unita al *Pelargonium graveolens* e *Cananga odorata* con cui si crea una miscela molto attiva nello stress emozionale (isteria, attacchi di panico, paura) purificando tutto ciò che non è armonico. Ogni protocollo deve prevedere un massaggio perineale con olio vegetale di *Calophylla inophylla* per rendere più morbida ed elastica la zona.

Tali esperienze attualmente in Italia vengono condotte presso l'Ospedale del Casentino di Bibbiena (AR), grazie all'illuminata conduzione dei suoi medici e personale paramedico, con il nostro modesto contributo scientifico.

## Bibliografia

1. Costa CA, CuryTC, Cassettari BO, Takahira RK, Flório JC, Costa M *Citrus aurantium* L. essential oil exhibits anxiolytic-like activity mediated by 5-HT1A receptors and reduces cholesterol after repeated oral treatment *BMC Complement Altern Med* 2013 23;13:42.

2. Conrad P, Adams C. The effects of clinical aromatherapy for anxiety and depression in the high risk postpartum woman - a pilot study *Complement Ther Clin Pract* 2012;18(3):164-8.
3. Ou MC, Hsu TF, Lai AC, Lin YT, Lin CC. Pain relief assessment by aromatic essential oil massage on outpatients with primary dysmenorrhea: a randomized, double-blind clinical trial. *J Obstet Gynaecol Res* 2012;38(5):817-22.
4. Sapolsky RM. *Perché alle zebre non viene l'ulcera?* Milano: Orme Editori; 2006.
5. Ingeborg S. *Le miscele aromaterapeutiche originali. Nascere, vivere, morire. Dagli oli essenziali un valido aiuto in ogni stagione della vita.* Wiggensbach: Stadelmann Verlag; 2006.

## OLI ESSENZIALI IN PROSPETTIVA CHIRURGICA NEI PAZIENTI NOSOCOMIALI

Antonio Scafuri

*Dipartimento di Medicina Traslazionale, Policlinico di Tor Vergata Roma, Roma*

La ricerca scientifica sempre più ci spinge a nuove possibilità applicative degli oli essenziali nella quotidiana pratica clinica e se da una parte la clinica medica mostra risultati incoraggianti nella somministrazione degli oli essenziali, anche la chirurgia ne sta iniziando con gran lentezza riflessiva l'uso terapeutico (1, 2). È pur vero che il paziente chirurgico ha problematiche che si discostano a volte notevolmente dal paziente medico. Cercheremo di tracciare quelli che possono essere, in un vicino futuro, gli orientamenti di applicazioni in questi malati (3-6).

Gli oli essenziali sono miscele ricche di componenti chimici con complesse finalità biochimiche e biologiche, nello specifico terpeni, fenoli che hanno la peculiarità di interferire con la vitalità della parete batterica e fungina o sulla replicazione proteica dei componenti batterici e virali. La maggior parte degli oli essenziali che hanno questa proprietà appartengono famiglia delle Lamiaceae (prima Labiatae), piante con forte componente aromatica e ricco fitocomplesso.

Diverse sono le specialità chirurgiche che possono trarre benefici dall'uso degli oli essenziali, dalla odontoiatria alla ginecologia, dall'otorinolaringoiatria all'ortopedia, oltre alle possibilità di poterli applicare nella cura di ferite purulente o per accelerarne il processo di guarigione. Molti sono gli studi, la maggioranza su animali, in cui si documentano risultati brillanti e possibili applicazioni vantaggiose degli oli essenziali sulla guarigione di ferite infette da cocchi gram positivi, e come il loro uso sia sinergico ad altre sostanze routinariamente impiegate.

Non disgiunto dal trattamento topico (7) è la possibilità di un uso degli oli essenziali come antibatterico ambientale specie in zone ambulatoriali, dove all'effetto antibatterico si associa l'effetto centrale attraverso le vie olfattive con azione sui centri nervosi.

Un altro dato rilevante nasce dall'osservazione in laboratorio dove si è notato come spesso oli essenziali con ridotta attività antibatterica possono essere invece sinergici nell'azione antibatterica se utilizzati associati ad antibiotici comuni a dosaggi ridotti.

Questo aspetto apre orizzonti applicativi clinici di consistente potenzialità.

La letteratura esaminata conforta la visione di un futuro pronto a diffondere sempre più anche nell'ambito clinico-chirurgico l'uso degli oli essenziali, anche se la ricerca clinica è ancora volutamente miope.

In futuro in una chirurgia sempre più endoscopica e con accessi anatomici sempre più limitati il ruolo degli oli essenziali con il loro uso, noto per scarsa quantità e breve durata di somministrazione, potrebbe inserirsi sapientemente come integrazione nel processo terapeutico? Questa è una domanda alla quale presto potremo trovarci a dare una risposta positiva.

### Bibliografia

1. Stea S, Beraudi A, De Pasquale D. Essential oils for complementary treatment of surgical patients: state of the art. *Evid Based Comp Evid Based Complement Alternat Med* 2014;2014:726341.
2. Seymour R. Additional properties and uses of essential oils. *J Clin Periodontol* 2003;30 Suppl 5:19-21.

3. Braden R, Reichow S, Halm MA. The use of the essential oil lavandin to reduce preoperative anxiety in surgical patients. *J Perianesth Nurs*. 2009 Dec;24(6):348-55.
4. Vakilian K, Atarha M, Bekhradi R, Chaman R. Healing advantages of lavender essential oil during episiotomy recovery: a clinical trial. *Complementary Therapies in Clinical Practice* 2011;17(1):50-3.
5. Salamati A, Mashouf S, Sahbaei F, Mojab F. Effects of inhalation of lavender essential oil on open-heart surgery pain. *Iran J Pharm Res* 2014;13(4):1257-61.
6. Hunt R, Dienemann J, Norton HJ, Hartley W, Hudgens A, Stern T, Divine G. Aromatherapy as treatment for postoperative nausea: a randomized trial. *Anesth Analg* 2013;117(3):597-604.
7. Reddy KK, Grossman L, Rogers GS. Common complementary and alternative therapies with potential use in dermatologic surgery: risks and benefits. *J Am Acad Dermatol*. 2013;68(4):e127-35.

## OLI ESSENZIALI: CONTROLLO DI QUALITÀ

Carlo Bicchi, Patrizia Rubiolo

*Dipartimento di Scienza e Tecnologia del Farmaco, Università degli Studi di Torino, Torino*

Per olio essenziale si intende “un prodotto profumato di composizione generalmente complessa, ottenuto a partire da una materia prima vegetale o parte di essa definita correttamente dal punto di vista botanico e ottenuta sia per distillazione in vapore d’acqua o distillazione a secco sia mediante l’impiego di procedimenti meccanici senza riscaldamento”.

Questa definizione, insieme ad ulteriori descrizioni è riportata a partire dal 2007 in Farmacopea Europea (1) e aiuta a comprendere come il processo di ottenimento di un olio essenziale sia fondamentale per la sua definizione. La definizione di olio essenziale a livello internazionale tiene, infatti, conto del fatto che queste miscele complesse sono frutto di un processo tecnologico assodato nel tempo e standardizzato al punto da consentire di poterne definire le caratteristiche compositive differenziando un olio essenziale da un altro. Questa definizione così articolata esclude che l’olio essenziale possa essere ottenuto utilizzando altri sistemi estrattivi e quindi per la definizione di estratti profumati di miscele complesse si dovranno utilizzare altre terminologie anche queste indicative di processi di ottenimento diversi da quelli citati nella definizione (es. concreta, resinoidi, assoluta o semplicemente estratto).

Il controllo di qualità di un olio essenziale dovrà quindi tenere conto di quanto riportato nella definizione.

Come si deve condurre il controllo di qualità?

Analogamente a qualsiasi prodotto che venga a contatto con l’uomo o con un qualsiasi altro organismo vivente, anche gli oli essenziali devono rispondere ai requisiti intrinseci del controllo di qualità e cioè: identità, innocuità (sicurezza) ed efficacia. Tuttavia nel caso degli oli essenziali, questi aspetti sono resi ancor più complicati da garantire come conseguenza della loro complessità compositiva.

I requisiti intrinseci del controllo di qualità di un olio essenziale sono:

– *Identità*

L’identità di un olio essenziale passa attraverso la conoscenza della materia prima vegetale che è stata utilizzata per il suo ottenimento e la definizione dei composti che ne caratterizzano la composizione chimica (*marker*).

– *Innocuità (o sicurezza)*

L’aspetto della sicurezza d’impiego è senz’altro il parametro più importante e passa attraverso la composizione chimica; in questo caso ci si deve avvalere di tecniche analitiche di tipo cromatografico e spettroscopico per una corretta e attenta individuazione dei componenti dell’olio essenziale e della loro abbondanza.

– *Efficacia*

La dimostrazione dell’efficacia sarà tendenzialmente il risultato di uno studio bioguidato che dovrà arrivare a definire, se possibile, il/i componente/i biologicamente attivo/i (anche per le caratteristiche organolettiche) evidenziando eventuali sinergie o effetti indesiderati.

Uno degli aspetti più importanti da non sottovalutare nel controllo di qualità è la variabilità compositiva che ciascun olio essenziale può avere e che è legata a numerosi fattori, i quali devono essere considerati e valutati in modo che l’uso e le eventuali proprietà che verranno

attribuite a quel determinato olio essenziale possano essere mantenute e ripetute nel tempo. Di qui l'importanza di conoscere correttamente la pianta, ma soprattutto quella parte di pianta farmacologicamente attiva (= droga) che è sottoposta al processo di distillazione.

La conoscenza della materia prima vegetale e della sua origine si deve quindi tradurre in una denominazione dell'olio essenziale che oltre ad identificarlo in modo generico (es. olio di essenziale di menta) sia accompagnata dal nome botanico della specie vegetale da cui è stato ottenuto (*Mentha x piperita*, *Mentha arvensis*, *Mentha spicata*). Infatti, la composizione chimica dell'olio essenziale potrà anche essere del tutto diversa a seconda della specie botanica.

Un secondo problema che si può manifestare è che pur avendo definito precisamente la specie vegetale di provenienza, la composizione dell'olio essenziale può comunque variare anche decisamente tra un campione e un altro. Questo perché la maggior parte delle specie vegetali aromatiche è caratterizzata da differenti chemiotipi, cioè producono (biosintetizzano) composti chimici differenti pur non manifestando variazioni morfologiche o cariologiche. Ad esempio il timo (*Thymus vulgaris* L.) presenta sette chemiotipi differenti (cioè con composizione "stabilmente" differente), sei dei quali localizzati prevalentemente nel sud della Francia e uno in Spagna (2). Quindi quando si parla di olio essenziale di timo non sarà sufficiente indicare il nome botanico della specie vegetale, ma si dovrà anche indicare quale chemiotipo esso rappresenti e quindi i *marker* che lo caratterizzano. Le differenze chemiotipiche possono essere associate ad una serie di fattori quali il periodo di raccolta della pianta da distillare, la zona di vegetazione della pianta stessa, ecc.: tutto ciò rende quindi indispensabile un monitoraggio attento della composizione e la necessità per gli operatori del settore di avere dei parametri qualitativi ben definiti per l'olio essenziale in oggetto.

Un altro aspetto da non sottovalutare è che la variabilità chimica non si esprime soltanto in termini di composti chimici differenti riscontrabili nell'olio ma, essendo questi associati a cammini biosintetici differenti all'interno della pianta da cui l'olio essenziale viene isolato, molto spesso alcuni componenti sono strutture chirali con una predominanza di un enantiometro rispetto ad un altro. La valutazione quindi della composizione enantiomerica di ogni singolo olio essenziale sarà spesso necessaria, dal un lato per l'autenticazione dell'olio essenziale e dall'altro per indirizzare correttamente gli studi sulla attività biologica dell'olio laddove si voglia tentare di determinare il/i componente/i bioattivo/i.

Le indagini analitiche svolte su molti oli essenziali evidenziano spesso problemi di adulterazione e/o sofisticazione e questo aspetto assume una notevole importanza sia dal punto di vista economico (molti oli essenziali hanno costi molto elevati e quindi non è da sottovalutare l'aggiunta fraudolenta di oli differenti di basso costo e/o qualità o di alcuni componenti dell'olio essenziale stesso ottenuti per sintesi o isolati da altre specie vegetali) sia dal punto di vista della sicurezza e dell'eventuale efficacia.

Ecco perché prima di un qualsiasi utilizzo di un olio essenziale è necessario definirne correttamente la sua composizione non limitandosi semplicemente ad una indicazione sommaria di quelli che dovrebbero essere i composti predominanti.

## Bibliografia

1. Council of Europe. *European Pharmacopoeia 8th edition*. Strasbourg: Council of Europe; 2014.
2. Bruneton J. *Pharmacognosie: phytochimie, Plantes medicinales. IV ed.* Cachan: Lavoisier; 2008.

## OLI ESSENZIALI IN ONCOLOGIA CLINICA

Massimo Bonucci

ARTOI Associazione Ricerca di Terapie Oncologiche Integrate, Roma

La lotta contro la neoplasia comporta un'ampia gamma di azioni mirate che vanno dall'uso di sostanze chimiche antiblastiche, anche se molte di esse derivano da sostanze naturali, di anticorpi monoclonali, o terapia biologica mirata, di radioterapia e/o radiochirurgia stereotassica, fino all'uso di sostanze naturali. Queste ultime oltre a ridurre gli effetti collaterali della neoplasia stessa o delle terapie classiche, possono svolgere un'azione di aiuto alla chemio/radioterapia per aumentare la risposta positiva.

Quando parliamo in generale di uso di sostanze naturali, intendiamo una serie di interventi con le discipline più diverse: agopuntura, omeopatia e omotossicologia, medicina ayurvedica e fitoterapia (1). In seno a quest'ultima dobbiamo considerare l'aromaterapia considerando questa disciplina come l'uso di oli essenziali, sostanze volatili fortemente odoranti estratte in vario modo dalle piante aromatiche.

Gli oli essenziali sono prodotti ottenuti per estrazione a partire da materiale vegetale aromatico, ricco in essenze. Gli oli vengono estratti di solito tramite distillazione in corrente di vapore, che una volta raffreddato consente la separazione dell'olio essenziale dall'acqua; nel caso dell'epicarpo dei frutti del genere *Citrus*, si utilizza anche la spremitura a freddo. Gli oli essenziali sono contenuti in strutture specifiche all'interno di vari organi della pianta, quali foglie, fiori, petali e altre parti delle piante.

L'uso della aromaterapia è inteso non solo attraverso l'olfatto, ma comprende anche tutte le applicazioni topiche (massaggi con oli aromatici, impacchi), inalatorie e orali (2). Fra le più antiche manifestazioni dell'uso degli oli essenziali possiamo comprendere le terapie inalatorie, che i nostri avi facevano con il rosmarino, l'eucalipto, la menta. L'azione decongestionante dei preparati è stata per molti anni l'unica espressione di questa applicazione.

In tempi più recenti l'aromaterapia è considerata una metodica di supporto agli antibiotici. L'azione antibatterica e anti-infiammatoria della *Lavandula* o della *Melaleuca alternifolia* con il suo estratto attivo il *Tea Tree Oil*, sono le azioni più richieste. Il *Tea Tree Oil* è utilizzato come antifungino, per le candidosi orali e vaginali, o per le dermatiti, acne, eczemi e psoriasi. Queste metodiche di applicazione delle sostanze a base di oli essenziali sono state sfruttate anche in campo oncologico soprattutto per alleviare quelle che sono le problematiche post-terapia (1, 3).

L'attività anti-infiammatoria e lenitiva sulle irritazioni da radio e chemioterapia sono le più usate. Considerando che questa metodica è relativamente giovane e con una letteratura scientifica in crescita, le nuove applicazioni potranno essere indirizzate anche ad uno studio delle potenzialità terapeutiche degli oli essenziali. Sono già comparsi i primi studi sulla azione pro-apoptotica dell'olio essenziale di *Melissa officinalis* (4) su cellule di glioblastoma, dell'olio essenziale di *Smyrniolum olusatrum* L. (5-6) sulle cellule del carcinoma del colon, o l'azione citotossica dell'*Artemisia vulgaris* sulle cellule della leucemia. Uno studio importante pubblicato su *Phytotherapy Research* del 2014 (7) ha evidenziato anche l'uso degli oli essenziali in sinergia con i trattamenti convenzionali.

Bisogna concludere che la terapia più giusta per il cancro è quella che tutti noi stiamo auspicando: la terapia integrata in oncologia.

## Bibliografia

1. European Partnership for Action Against Cancer. *Complementary and Alternative Medicine (CAM) in cancer care. Development and opportunities of integrative oncology*. EPAAC; 2014. Disponibile all'indirizzo: [www.epaac.eu/images/END/Final\\_Deliverables/D5\\_Complementary\\_and\\_alternative\\_medicine\\_CAM\\_in\\_cancer\\_care\\_development\\_and\\_opportunities\\_of\\_integrative\\_oncology.pdf](http://www.epaac.eu/images/END/Final_Deliverables/D5_Complementary_and_alternative_medicine_CAM_in_cancer_care_development_and_opportunities_of_integrative_oncology.pdf); ultima consultazione 2/9/2014.
2. Firenzuoli F (Ed.). *Gli oli essenziali. Dai profumi all'aromaterapia*. Milano: Tecniche Nuove. 2002
3. Tisserand R, Young R. *Essential oil safety*. 2<sup>nd</sup> ed. Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier Ltd.; 2014.
4. Queiroz RM, Takiya CM, Guimarães LP, Rocha Gda G, Alviano DS, Blank AF, Alviano CS, Gattass CR. Apoptosis-inducing effects of *Melissa officinalis* L. essential oil in glioblastoma multiforme cells. *Cancer Invest* 2014;32(6):226-35.
5. Quassinti L, Bramucci M, Lupidi G, Barboni L, Ricciutelli M, Sagratini G, Papa F, Caprioli G, Petrelli D, Vitali LA, Vittori S, Maggi F. *In vitro* biological activity of essential oils and isolated furanosesquiterpenes from the neglected vegetable *Smyrniololus atrum* L. (Apiaceae). *Food Chem* 2013;138:808-13.
6. Quassinti L, Maggi F, Barboni L, Ricciutelli M, Cortese M, Papa F, Garulli C, Kalogris C, Vittori S, Bramucci M carcinoma cells. *Fitoterapia* 2014;97:133-41.
7. Lesgards JF, Baldovini N, Vidal N, Pietri S. Anticancer activities of essential oils constituents and synergy with conventional therapies: a review. *Phytother Res* 2014; 28(10):1423-46.

## OLI ESSENZIALI IN ONCOLOGIA

Marisa Colone, Annarita Stringaro

Dipartimento di Tecnologia e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Gli oli essenziali o essenze sono i principi aromatici contenuti nei vegetali che vengono ricavati per distillazione. Oltre che per la diversa composizione chimica e le diverse caratteristiche fisiche, questi oli si differenziano da quelli stabili, o comunque da quelli grassi che sono contenuti nei vegetali, perché sono volatili cioè tendono a passare con facilità allo stato gassoso. Nelle piante, le cellule che immagazzinano gli oli essenziali possono trovarsi in qualsiasi parte della pianta: nel fiore, nelle foglie, nelle gemme, nei semi, nei frutti e anche nel legno e nelle radici. Tecnicamente le operazioni di estrazione degli oli dai vegetali per uso terapeutico sono due: distillazione in corrente di vapore acqueo e la spremitura o pressatura.

Gli oli essenziali sono essenzialmente miscele di molecole che appartengono esclusivamente a due distinte famiglie biosintetiche: terpenoidi e fenilpropanoidi (1). Ad oggi, sono conosciuti approssimativamente 3000 oli essenziali, di cui 300 sono presenti in commercio.

Queste sostanze da secoli trovano impiego soprattutto per le loro proprietà antimicrobiche, analgesiche, antinfiammatorie, spasmolitiche e anestetiche locali anche se studi recenti hanno dimostrato che i loro componenti possiedono anche attività antitumorale sia *in vitro* che *in vivo*. Studi di tipo fisico-chimico hanno dimostrato che gli oli essenziali sono degli eccellenti antiossidanti, grazie proprio alla presenza di terpenoidi e polifenoli e che in particolare questa attività viene suggerita per promuovere il loro uso come conservanti naturali. Tale attività li rende però anche indicati nella prevenzione di numerose patologie notoriamente indotte da un eccessivo sovraccarico di reazioni da stress ossidativo. Gli antiossidanti sono ritenuti antimutagenici e anticarcinogenici proprio per le loro proprietà *radical scavenging* (1). Ad esempio, i terpenoidi contenuti nell'olio essenziale di *Ginkgo biloba* sono stati studiati per i loro effetti benefici su malattie cardiovascolari e neuronali (2); questa loro proprietà ha spinto la comunità scientifica ad approfondire la ricerca su questi composti indirizzandola anche verso la ricerca contro il cancro.

Purtroppo i farmaci utilizzati in chemioterapia non risultano essere altamente selettivi per le cellule tumorali ma agiscono anche contro le cellule che per loro natura hanno un alto indice di riproduzione come quelle del sangue, quelle che agiscono sulla crescita dei capelli o sulla rigenerazione dell'epitelio intestinale. La conseguenza di questa non selettività genera i ben noti effetti collaterali quali anemia, perdita di capelli e diarrea. Anche per questi motivi, la comunità scientifica si è impegnata a ricercare dei trattamenti alternativi complementari sempre più indirizzati verso prodotti di origine naturale che siano più facilmente accessibili e che possiedano inoltre un'ampia varietà di strutture chimiche sinteticamente modificabili per poter aumentare la loro attività antitumorale. Inoltre, è importante ricordare che i costituenti degli oli essenziali sono altamente biodisponibili poiché vengono facilmente assorbiti dall'organismo.

Molti studi scientifici hanno dimostrato che esiste un sinergismo tra farmaci chemioterapici e oli essenziali sia *in vitro* che *in vivo* (1). Un esempio è lo studio effettuato *in vivo* nei topi sul tumore del colon dove il geraniolo, un alcol monoterpeneico insaturo presente soprattutto nelle rose e nei gerani usato (150 mg/kg) in combinazione con il 5-fluorouracile (50 mg/kg) è in grado di ridurre del 53% il tumore. Il geraniolo è stato utilizzato anche in un altro studio *in vitro* dove in combinazione con la simvastatina (5  $\mu$ M) si è visto che inibisce significativamente la proliferazione cellulare di cellule di epatocarcinoma umano (3). La sua efficacia è stata dimostrata anche se utilizzato da solo cioè non in combinazione con altri farmaci. Kim *et al.*

hanno dimostrato che 0,25 mM di geraniolo sono in grado di bloccare il ciclo cellulare in fase G1 e indurre la morte cellulare programmata o apoptosi sia in cellule in coltura che in modelli animali di tumore della prostata (4).

Un altro monoterpene presente nella maggior parte degli oli essenziali è il limonene. Studi scientifici hanno dimostrato la sua efficacia sia *in vitro* che *in vivo*. In uno studio di Wattenberg e Coccia, la somministrazione di 0,2 mL di limonene due volte a settimana per otto settimane, un'ora prima della somministrazione di nornitrosocotina, è in grado di ridurre nei topi il tumore dello stomaco e dei polmoni del 33% rispetto al gruppo di controllo (5).

Il carvacolo, monoterpene fenolico presente nell'olio essenziale di origano e di timo (la sostanza che conferisce all'origano il suo odore caratteristico) ha dimostrato, insieme al timolo, del quale è suo isomero, proprietà antiproliferative in cellule in coltura di parecchi tipi di tumori quali carcinomi del polmone, fegato e colon (6). Le conoscenze ottenute dagli studi *in vitro* sono migliaia e i loro risultati sono molto incoraggianti mentre gli studi preclinici e clinici avviati sono purtroppo molto pochi.

Tra questi pochi ricordiamo uno studio in fase I sul limonene somministrato per via orale (8 g/m<sup>2</sup>) su 32 pazienti con tumori solidi refrattari alla terapia trattati ogni 21 giorni. In un paziente con carcinoma della mammella si è osservata una risposta parziale (ovvero una riduzione del 50% della dimensione del tumore) mentre in 3 pazienti con carcinoma del colon-retto si è avuta una stabilizzazione o meglio l'assenza di progressione della malattia (7).

In un altro *trial* clinico di fase I hanno somministrato alcol perillico, strutturalmente molto vicino al limonene e contenuto soprattutto nelle ciliege, che si è dimostrato molto promettente come antitumorale sia in studi *in vitro* che *in vivo*. L'alcol perillico viene somministrato a 16 pazienti con tumori maligni refrattari alle terapie e trattati a vari dosaggi, che ha per ora evidenziato un effetto antitumorale evidente solo in un paziente con tumore del colon-retto metastatico dopo 10 mesi di trattamento. Gli altri pazienti non hanno mostrato riduzioni significative del tumore ma nemmeno tossicità al trattamento (8). I meccanismi di azione di questi oli sono dovuti soprattutto al fatto che i terpenoidi e i fenilpropanoidi, essendo sostanze lipofile, vengono facilmente assorbite dall'organismo. Essi agiscono per lo più riducendo l'infiammazione e lo stress ossidativo che sono, come è noto, fenomeni associati alla progressione tumorale e probabilmente anche alla sua origine. Gli oli essenziali hanno inoltre attività antimutageniche (9), antiproliferative (10), stimolano il sistema immunitario e l'immunosorveglianza (11), e sono in grado anche di modulare la polifarmaco-resistenza (12, 13).

Inoltre, sempre grazie alla loro lipofilia, gli oli essenziali agiscono a livello delle membrane mitocondriali, depolarizzandole (soprattutto i terpenoidi) e riportando la situazione alla normalità perché come è noto, le cellule tumorali possiedono spesso membrane mitocondriali iperpolarizzate. In più i terpeni sono capaci di attivare le caspasi, ovvero le proteine responsabili del fenomeno di morte cellulare per apoptosi e quindi indirettamente sono in grado di indurre la morte delle cellule tumorali come dimostrato da vari studi *in vitro* (13-16). È importante sottolineare come l'azione antitumorale degli oli essenziali è associata strettamente all'attivazione del fenomeno apoptotico solo delle cellule tumorali e non di quelle normali. Questa proprietà dei terpenoidi di origine naturale quale per esempio il limonene, suggerisce che gli oli essenziali potrebbero costituire in futuro una nuova classe di molecole chemiosensibilizzanti e/o antitumorali con un'alta potenzialità in grado di concorrere alla regressione tumorale. Inoltre, grazie alla loro bassa tossicità, sono in grado di ridurre i ben noti effetti collaterali delle terapie antineoplastiche utilizzate in clinica.

In conclusione, considerando la crescente attenzione che i ricercatori hanno rivolto ai prodotti naturali, e in particolare agli oli essenziali (la cui azione può derivare dalla somma sinergica di ogni singola molecola che lo compone), sarà fondamentale sviluppare una nuova e

più consapevole comprensione della loro attività chemiosensibilizzante e/o antitumorale soprattutto per lo sviluppo di protocolli terapeutici complementari affiancabili alle comuni terapie chemioterapiche (17).

## Bibliografia

1. Lesgards JF1, Baldovini N, Vidal N, Pietri S. Anticancer activities of essential oils constituents and synergy with conventional therapies: a review. *Phytother Res* 2014;28(10):1423-46.
2. Liebgott T, Miollan M, Berchadsky Y, Drieu K, Culcasi M, Pietri S. Complementary cardioprotective effects of flavonoid metabolites and terpenoid constituents of *Ginkgo biloba* extract (EGb 761) during ischemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol* 2000;95:368-77.
3. Polo MP, Crespo R, de Bravo MG. Geraniol and simvastatin show a synergistic effect on a human hepatocarcinoma cell line. *Cell Biochem Funct* 2011;29(6):452-8.
4. Kim SH, Bae HC, Park EJ, Lee CR, Kim BJ, Lee S, Park HH, Kim SJ, So I, Kim TW, Jeon JH. Geraniol inhibits prostate cancer growth by targeting cell cycle and apoptosis pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;407(1):129-34.
5. Wattenberg LW, Coccia JB. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone carcinogenesis in mice by D-limonene and citrus fruit oils. *Carcinogenesis* 1991;12(1):115-7.
6. Slamenova D, Horvathova E, Sramkova M, Marsalkova L. DNA-protective effects of two components of essential plant oils carvacrol and thymol on mammalian cells cultured *in vitro*. *Neoplasma* 2007;54(2):108-12.
7. Vigushin DM, Poon GK, Boddy A, English J, Halbert GW, Pagonis C, Jarman M, Coombes RC. Phase I and pharmacokinetic study of D-limonene in patients with advanced cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 1998;42(2):111-7.
8. Ripple GH, Gould MN, Stewart JA, Tutsch KD, Arzoomanian RZ, Alberti D, Feierabend C, Pomplun M, Wilding G, Bailey HH. Ripple GH, Gould MN, Arzoomanian RZ. Phase I clinical and pharmacokinetic study of perillyl alcohol administered four times a day. *Clin Cancer Res* 2000;6(2):390-6.
9. Sharma N, Trikha P, Athar M, Raisuddin S. Inhibition of benzo[a]pyrene- and cyclophosphamide-induced mutagenicity by *Cinnamomum cassia*. *Mutat Res Fund Mol Mech Mutagen* 2001;480:179-88.
10. Lampronti I, Saab AM, Gambari R. Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division. *Int J Oncol* 2006;29:989-95.
11. Seo JY. The effects of aromatherapy on stress and stress responses in adolescents. *J Kor Acad Nurs* 2009;39:357-65.
12. Ravizza R, Gariboldi MB, Molteni R, Monti E. Linalool, a plant derived monoterpene alcohol, reverses doxorubicin resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncol Rep* 2008;20:625-30.
13. Calcabrini A, Stringaro A, Toccaceli L, Meschini S, Marra M, Colone M, Salvatore G, Mondello F, Arancia G and Molinari A. Terpinen-4-ol, the main component of *Melaleuca Alternifolia* (Tea Tree) oil inhibits the *in vitro* growth of human melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2004;122:349-60.
14. Cavalieri E, Rigo A, Bonifacio M, Carcereri de Prati A, Guardalben E, Bergamini C, Fato R, Pizzolo G, Suzuki H, Vinante F. Pro-apoptotic activity of  $\alpha$ -bisabolol in preclinical models of primary human acute leukemia cells. *J Transl Med* 2011;21:9-45.
15. Ji J, Zhang L, Wu Y-Y, Zhu X-Y, Lv S-Q, Sun X-Z. Induction of apoptosis by d-limonene is mediated by a caspase dependent mitochondrial death pathway in human leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 2006;47(12):2617-24.

16. Park KR, Nam D, Yun HM, Lee SG, Jang HJ, Sethi G, Cho SK, Ahn KS.  $\beta$ -Caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathways and ROS-mediated MAPKs activation. *Cancer Lett* 2011;312 (2):178-88.
17. Bhalla Y, Gupta VK, Jaitak V. Anticancer activity of essential oils: a review. *J Sci Food Agric* 2013;93(15):3643-53.

## TECNICA COLTURALE E RESA DI PIANTE OFFICINALI

Sebastiano Delfine (a), Gabriella Stefania Scippa (b)

(a) Dipartimento di Agricoltura, Ambiente e Alimenti, Università degli Studi del Molise, Campobasso

(b) Dipartimento di Bioscienze e Territorio, Università degli Studi del Molise, Campobasso

Le piante officinali sono da tempo nella realtà commerciale italiana e internazionale. Tanti sono i loro utilizzi che spaziano dai fini terapeutici (chemiofarmaci), all'uso culinario (spezie), alla cosmesi (profumi, detergenti, creme, ecc.), all'industria alimentare (dolcificanti, coloranti, antiossidanti, antibatterici, ecc.), ecc.

Attualmente, per soddisfare queste esigenze commerciali, la superficie totale investita alla coltivazione delle piante officinali in Italia risulta di circa 3300 ha, con più di 113 specie differenti coltivate in tutte le Regioni (1). Questo alto numero di specie è fra l'altro indice della forte vocazione del nostro territorio alla produzione delle specie officinali che per la sua conformazione peninsulare, la posizione geografica e climatica, fa sì che ogni specie trovi la sua ottimale collocazione produttiva. Nonostante il timido incremento delle superfici coltivate a piante officinali negli ultimi dieci anni (+35%), ancora oggi molte essenze vengono importate (circa il 70%). Diversi sono i motivi che hanno portato a questa situazione. I fattori critici per l'azienda agricola nella produzione specialistica di piante officinali sono: scarsa e frammentata attività di ricerca in ambito agricolo, ridotte dimensioni aziendali, basso livello tecnologico, scarsa conoscenza delle tecniche colturali opportune, scarsa specializzazione, produzioni frammentate limitate, irregolari disponibilità di prodotto, scarsa programmazione, scarsa convinzione nella scelta produttiva, assenza di servizi, scarsa organizzazione produttiva e di filiera, assenza di strutture di conferimento e scarsa valorizzazione della materia prima e del fitoderivato. In questo quadro è necessario, per dare nuova linfa alla coltivazione delle piante aromatiche, rivedere alcuni concetti colturali.

In una nuova e auspicabile concezione di gestione colturale delle essenze officinali è quindi necessario rielaborare le moderne conoscenze agronomiche. In quest'ottica sarà possibile rivedere anche il ruolo degli ambienti marginali che potranno essere visti in un'altra ottica; e cioè come territori con aspetti culturali di tradizione, di ambiente e vegetazione molto caratterizzanti e che, in quanto tali, possono dare al prodotto erboristico elementi di univocità, esclusività e quindi di valore aggiunto importante e non soggetto a concorrenza.

Alla luce della politica agricola comunitaria, se da un lato la coltivazione delle specie officinali è in perfetta linea con i nuovi indirizzi, sia in termini di disaccoppiamento e sia in termini di conservazione della biodiversità – Regolamento (CE) 1257/1999, Regolamento (CE)1750/1999 e Regolamento (CE) 2603/1999 –, dall'altro i produttori agricoli possono vedere nella coltivazione di queste piante delle nuove opportunità di reddito, più remunerative di quelle tradizionali, contribuendo alla riduzione della importazione di droghe (circa il 70% del fabbisogno nazionale) dai Paesi dell'Est.

La necessità di ampliare in Italia le produzioni di essenze officinali deriva anche dall'esistenza di scenari diversificati dal punto di vista merceologico, che determina una forte necessità di materie prime da parte dei vari comparti legati al "naturale" (industria alimentare *senso strictu*, industria mangimistica, industria vivaistica, ecc.) di estratti naturali (2), GRAS (*Generally Regarded As Safe*) da impiegare come antibatterici (3), antifungini, anticancro (4), nel prolungamento della *shelf-life* dei prodotti alimentari, come antiossidanti (5) e come aromatizzanti funzionali.

Indispensabile premessa per incrementare le produzioni di queste piante, tuttavia, è la conoscenza agronomica delle specie, che presentano un'ampia problematica nei riguardi sia della tecnica colturale che dell'ambiente di coltivazione. I fattori ambientali, infatti, possono modulare la quantità e la qualità dell'olio essenziale prodotto da una pianta, in quanto le sostanze in esso contenute hanno un ruolo eco-fisiologico contro gli stress di origine sia abiotica (6) che biotica (7).

La tecnica colturale, le condizioni pedoclimatiche, l'ambiente e il contenuto in principi attivi delle piante officinali sono tra i fattori importanti da considerare per chi vuole intraprenderne la coltivazione. L'obiettivo del produttore infatti non è solo la produzione di biomassa ma che la quantità e la qualità dei principi attivi presenti in essa siano quelle volute.

In generale, parlando di produzioni agrarie, l'obiettivo della coltivazione è quello di disporre di approvvigionamenti sicuri e garantiti nella quantità e nella qualità. Il settore agricolo deve essere organizzato in modo da garantire:

- materie prime controllate e selezionate in base alle loro caratteristiche biochimiche (es. resa in principi attivi);
- omogeneità e standardizzazione delle coltivazioni;
- materie prime prive di contaminanti chimici e microbiologici (agricoltura biologica: Regolamento CEE 2092/91).

Pertanto, il ciclo produttivo agricolo deve assolvere l'importante compito di fornire al settore della trasformazione delle erbe, con costanza e secondo quantitativi pianificati, una materia prima di eccellente qualità.

La produzione agricola – che parte dalla semina e termina con la raccolta della pianta – rappresenta la fase determinante per la qualità della droga grezza e di tutti i prodotti da essa derivati. In accordo con le linee di tendenza dell'agricoltura moderna, l'intero ciclo produttivo che conduce all'ottenimento della materia prima deve essere strutturato in conformità alle norme di buona pratica agricola (*Good Agricultural Practices*, GAP).

La qualità e la standardizzazione della tecnica di coltivazione delle piante è un passo decisivo da compiere per trasformare la coltivazione delle piante officinali da semplice attività naturalistica o complementare, ad un'attività agricola moderna e razionale (8). La tecnica colturale si compone di varie componenti, quali le lavorazioni del terreno, la fertilità del suolo, le concimazioni, l'irrigazione, la gestione delle erbe infestanti, ecc. Modulando opportunamente la strategia colturale è possibile intervenire su qualità e quantità delle droghe. La coltura in asciutto fornisce un prodotto di qualità eccellente ma poco remunerativo. Lo stress idrico favorisce la sintesi di olio essenziale (9) e interventi irrigui nel periodo antecedente la raccolta riducono fortemente la resa in olio. Le lavorazioni del terreno, agevolando la funzionalità dell'apparato radicale e migliorando l'efficienza d'uso dell'acqua e dei nutrienti, incide sulla resa delle piante. La gestione delle piante infestanti, gestendo la competizione interspecifica, migliora la resa in olio essenziale sia in termini di contenuto che di qualità dell'olio. La nutrizione, in buona parte delle colture, ha un effetto positivo sull'accumulo di biomassa, mentre pochi e specifici sono gli effetti sulla resa in droga. La densità di impianto o di semina può determinare variazioni nel contenuto in principi attivi di alcune specie.

In questo breve riassunto sono evidenziate quelle che sono alcune delle principali problematiche legate alla coltivazione di specie officinali. Molte sono le carenze e problematiche agricole ancora presenti. Diventa, quindi, importante intensificare la ricerca al fine di individuare specie e tecniche colturali idonee alla coltivazione delle specie officinali nei diversi areali produttivi.

## Bibliografia

1. Osservatorio Economico del settore delle Piante Officinali. *Piante officinali in Italia: un'istantanea della filiera e dei rapporti tra i diversi attori*. Roma: ISMEA; 2013.
2. Vitullo M, Ripabelli G, Fanelli I, Tamburro M, Delfine S, Sammarco ML. Microbiological and toxicological quality of dried herbs. *Lett Appl Microbiol* 2011; 52: 573–580.
3. Iscan G, Kirimer N, Baser KHC, Demirci F. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* oil. *J Agric Food Chem* 2002;50:3943-6.
4. Russo A, Formisano C, Rigano D, Senatore F, Delfine S, Cardile V, Rosselli S, Bruno M. Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis* L.) grown in different environmental conditions. *Food Chem Toxicol* 2013;55:42-7.
5. Lee KG, Shibamoto T. Determination of antioxidant potential of volatile exstrat isolated from various herbs and species. *J Agric Food Chem* 2002;50:4947-52.
6. Delfine S, Csiky O, Seufert G, Loreto F. Fumigation with exogenous monoterpenes of a non-isoprenoid-emitting oak (*Quercus suber* L.): monoterpene acquisition, translocation and effect on the photosynthetic properties at high temperatures. *New Phytologist* 2000;146:27-31.
7. Iacobellis NS, Lo Cantore P, Capasso F, Senatore F. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. *J Agric Food Chem* 2005;53(1):57-61.
8. Delfine S. *La coltivazione delle piante officinali*. Bagnoli del Trigno: Associazione dei Produttori Piante Officinali del Molise; 2009.
9. Delfine S, Loreto F, Pinelli P, Tognetti R, Alvino A. Isoprenoids content and photosynthetic limitations in rosemary and spearmint plants under water stress. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 2005;106:243-52.

## OLI ESSENZIALI NELLA CONSERVAZIONE DEGLI ALIMENTI

Annalisa Serio, Clemencia Chaves López, Giovanni Mazzarrino, Antonello Paparella  
 Facoltà di Bioscienze e Tecnologie Agroalimentari e Ambientali, Università degli Studi di Teramo,  
 Mosciano Stazione (TE)

L'alterazione degli alimenti è, ancora oggi, uno dei problemi principali per il consumatore e per le industrie alimentari, nonostante le continue innovazioni riguardanti le tecniche di conservazione. Ogni anno, in Italia, ben 6 milioni di tonnellate di prodotti agricoli vengono scartati prima di raggiungere il consumatore; tale enorme spreco basterebbe da solo a coprire tre quarti del fabbisogno alimentare nazionale.

Un aspetto importante da non sottovalutare è poi rappresentato dall'acquisizione di forme di resistenza agli agenti antimicrobici più comunemente utilizzati per il prolungamento della vita conservativa (1). La preoccupazione dei consumatori e delle industrie è rivolta sia verso gli alimenti contenenti conservanti sintetici, sempre più presenti nei nostri mercati, sia verso la riduzione e perdita di efficacia dei comuni conservanti a causa dello sviluppo e diffusione di batteri resistenti.

Si comprende quindi come un crescente interesse sia rivolto verso lo studio e la valutazione dell'efficacia di composti nuovi, in particolare di antimicrobici naturali, quali gli oli essenziali estratti da matrici vegetali (2). Il loro utilizzo nella formulazione di alimenti ha radici antiche ed è comunemente diffuso e accettato dal consumatore, soprattutto per le loro proprietà aromatiche; più recentemente si sta diffondendo la tendenza ad utilizzarli come conservanti alimentari. Infatti, oltre ad impartire all'alimento aromi caratteristici, gli oli essenziali di origine vegetale ne prolungano la conservazione poiché contengono composti antiossidanti e battericidi o batteriostatici, quali composti fenolici, acidi organici, vitamine e carotenoidi. Inoltre molti degli estratti potenzialmente utilizzabili come bioconservanti provengono da specie vegetali comunemente utilizzate nell'alimentazione umana. Tra queste, aglio, cipolla e porro sono state le prime ad essere studiate per le loro proprietà antimicrobiche (3). Numerosi batteri patogeni di interesse alimentare, come *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* e *Escherichia coli* sono risultati sensibili a questi estratti (3).

L'attività antimicrobica dimostrata da numerosi studi (4, 5) pone dunque le basi per una molteplicità di applicazioni degli oli essenziali come composti bioattivi naturali, tra cui la conservazione degli alimenti e delle bevande o il mantenimento della loro sicurezza (6). Inoltre, in relazione alla loro applicazione in formulazioni alimentari, gli estratti vegetali sono considerati come *consumer-friendly* e possono essere impiegati senza alcuna autorizzazione specifica o modificazione in etichetta, ad eccezione di alcuni estratti che rientrano nelle categorie di additivi e coloranti (es. rosso barbabietola E162 e capsantina da paprika E160c) (7).

La composizione degli alimenti e la loro struttura hanno un effetto importante sull'attività antimicrobica esplicita dagli oli essenziali. Infatti, interazioni con proteine, carboidrati, lipidi e additivi alimentari possono diminuire l'efficacia antimicrobica, per cui a parità di efficacia, si rendono necessarie concentrazioni di olio generalmente di almeno dieci volte superiori rispetto a quelle sufficienti negli studi *in vitro*. Ad esempio, la reazione tra proteine e carvacolo, componente importante di oli essenziali di origano e timo, tra i più efficaci dal punto di vista antimicrobico, è un fattore che limita fortemente l'azione antimicrobica (8).

Inoltre proteine e lipidi proteggono i microrganismi dall'azione degli oli, mentre i carboidrati sembrano avere un effetto protettivo minore. Anche i parametri chimico-fisici degli alimenti influenzano fortemente l'attività degli oli: i batteri, infatti, sono più sensibili agli oli in presenza di pH acidi (9). A pH bassi inoltre, gli oli essenziali hanno maggiore idrofobicità e dissolvono più facilmente nel doppio strato fosfolipidico della membrana cellulare. La solubilità in acqua o le proprietà idrofiliche degli oli sono fondamentali perché gli oli esplicano attività in fase acquosa, dove avviene lo sviluppo microbico, ma le proprietà lipofile sono importanti per le interazioni con la membrana (6).

Ancora, la sensibilità dei microrganismi varia anche in funzione di parametri estrinseci, come la temperatura o la tipologia di confezionamento (9): a questo proposito, numerosi sono gli studi che riguardano l'inclusione di sostanze antimicrobiche all'interno del materiale adoperato per il confezionamento, con la finalità di limitare lo sviluppo di batteri alteranti.

Per quanto riguarda i patogeni, diversi studi si sono concentrati sull'applicazione di oli essenziali mirata alla loro inattivazione in svariati prodotti alimentari: carne, prodotti ittici, prodotti lattiero-caseari, frutta e vegetali. Chiaramente l'impatto degli oli sulle caratteristiche sensoriali e tecnologiche degli alimenti costituisce un importante fattore che ne limita l'applicabilità. Per questo motivo occorre operare una selezione accurata degli oli sulla base del loro profilo sensoriale e aromatico, in relazione alla tipologia di alimento a cui andrebbero applicati. Prendendo come esempio *Listeria monocytogenes*, un patogeno in grado di sviluppare in tutte le categorie di alimenti sopra riportate, e facilmente adattabile a condizioni micro-ambientali sfavorevoli, studi interessanti sono stati condotti applicando oli essenziali singolarmente, in combinazione tra loro o in associazione con altri composti antimicrobici come il chitosano, in prodotti carnei o ittici (6). Matrici complesse contenenti lipidi e un reticolo proteico rendono l'applicazione degli oli alquanto complessa. Inoltre è fondamentale che gli oli applicati non alterino il profilo sensoriale dell'alimento. Per alimenti liquidi meno complessi, le problematiche derivanti dall'aggiunta di oli essenziali sono più limitate. Ad esempio, ai succhi di frutta è possibile aggiungere oli agrumati o singoli componenti degli oli, come il limonene, sfruttando al meglio il loro naturale effetto antimicrobico senza modificare, o al limite arricchendo, il gusto del prodotto (10).

In conclusione, l'applicazione degli oli essenziali nella conservazione degli alimenti, risulta di interesse delle aziende alimentari, sia per quanto riguarda la garanzia della sicurezza dei prodotti, sia l'estensione della loro vita conservativa. L'applicazione di tali trattamenti è destinata ad aumentare nel tempo, per via sia della crescente richiesta di alimenti naturali (*green label*) da parte dei consumatori, che dell'interesse delle aziende nel ridurre l'impiego di additivi. Per questo motivo ai ricercatori è affidato l'importante compito di approfondire gli studi per migliorare l'efficacia e l'applicabilità degli oli essenziali come agenti bioconservanti.

## Bibliografia

1. Meng JH, Zhao SH, Doyle MP, Joseph SW. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM isolated from animals, food and humans. *J Food Prot* 1998;61:1511-4.
2. Smid EJ, Gorris LGM. Natural antimicrobials for food preservation. In: Rahman MS (Ed.) *Handbook of food preservation*. New York: MarcelDekker; 1999. p. 285-308.
3. Beuchat LR, Golden DA. Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol* 1989;43(1):134-42.
4. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food: a review. *Int J Food Microbiol* 2004;94(3):223-53.

5. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils-A review. *Food Chem Toxicol* 2008;46(2):446-75.
6. Paparella A, Serio A, Chaves López C, Mazzarrino G. Plant-based intervention strategies for *Listeria monocytogenes* control in foods. In: Méndez-Vilas (Ed.). *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Spain: Formatex; 2013. p. 1230-1246.
7. Serio A, Chaves López C, Martuscelli M, Mazzarrino G, Di Mattia C, Paparella A. Application of central composite design to evaluate the antilisterial activity of hydro-alcohol berry extract of *Myrtus communis* L. *LWT Food Sci Technol* 2014;58:116-23.
8. Pol IE, Mastwijk HC, Slump RA, Popa ME, Smid EJ. Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment and carvacrol. *J Food Prot* 2001;64:1012-8.
9. Tassou C, Drosinos EH, Nychas G-JE. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 degrees and 10 degrees C. *J Appl Bacteriol* 1995;78:593-600.
10. Espina L, García-Gonzalo D, Laglaoui A, Mackey MB, Pagán R. Synergistic combinations of high hydrostatic pressure and essential oils or their constituent and their use in preservation of fruit juices. *Int J Food Microbiol* 2013;161:23-30.

## POSSIBILI APPLICAZIONI DEGLI OLI ESSENZIALI IN MEDICINA VETERINARIA

Maurizio Scozzoli  
Centro Sperimentale APA-CT srl, Forlì

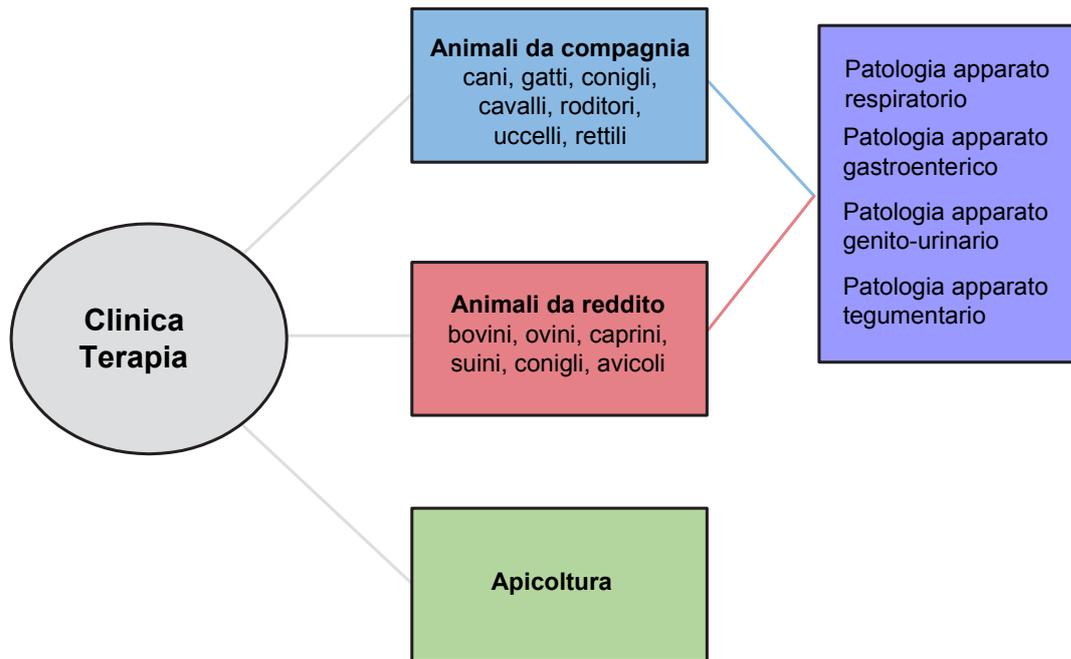
Le matrici vegetali e in particolare gli oli essenziali hanno rappresentato in passato una fonte inesauribile di sostanze attive utili alla medicina veterinaria per gli aspetti terapeutici e curativi. È stato sufficiente sfogliare un vecchio testo *Compendio di terapeutica veterinaria* di M.M. Kaufmann, professore di fisiologia e terapeutica nella Scuola Nazionale Veterinaria di Lione, tradotto e integrato con un ricettario dal Prof. Angelo Giangrieco assistente di Clinica Medica alla Regia Scuola Veterinaria di Napoli, edito nel 1887 per comprendere l'importanza degli oli essenziali nella pratica medico-veterinaria dell'epoca. Sono ampiamente trattate le cosiddette "sostanze aromatiche" e il testo riporta anche uno speciale capitolo denominato "Essenza di lavanda" dove sono descritte caratteristiche, effetti, indicazioni terapeutiche, modalità di somministrazione e dosi nelle diverse specie animali. Nel capitolo dei disinfettanti l'essenza di timo (rapporto 1/800) viene descritta come attiva nei confronti del "virus del carbonchio sintomatico" – il bacillo (*Bacillus anthracis*) osservato per la prima volta da Pollender e da Davaine e studiato da Koch (1876) e da Pasteur.

Negli ultimi decenni lo studio dei prodotti naturali ha subito un profondo cambiamento; l'interesse del mondo scientifico è stato, molto più che nel passato, fortemente motivato dalla bioattività delle sostanze indagate e dalla loro applicabilità in diversi settori quali quello medico-biologico, nutraceutico, alimentare, veterinario e mangimistico. Parallelamente allo sviluppo della fitochimica si è avuto un notevole incremento degli studi botanici, etnobotanici ed etnoveterinari, farmacologici, medici e veterinari che hanno contribuito alla conoscenza delle piante medicinali e dei loro usi, generando un lavoro interdisciplinare forse unico nel mondo scientifico.

Nel settore veterinario gli oli essenziali hanno ampi campi di applicazione: clinica e terapia degli animali da compagnia e di interesse zootecnico (Figura 1), formulazione mangimistica, tecnologia d'allevamento, conservazione e miglioramento della qualità dei prodotti di origine animale.

Le piante più comunemente utilizzate e che hanno o potrebbero avere maggiore interesse in ambito veterinario sono: *Citrus limon* L., *Citrus aurantium* L., *Citrus bergamia* Risso & A.Poit., *Eucalyptus globulus* Labill., *Cymbopogon* spp., *Pelargonium graveolens* L'Hér., *Melaleuca alternifolia* Cheel, *Melaleuca leucadendra* L., *Melaleuca viridiflora*, *Pinus sylvestris* L., *Cinnamomum zeylanicum* J.Presl, *Cinnamomum camphora* L., *Eugenia caryophyllata* Thunb., *Rosmarinus officinalis* L., *Thymus serpyllum* L., *Ocimum basilicum* L., *Ocimum gratissimum* L., *Satureja hortensis* L.(1), *Thymus vulgaris* L., *Origanum vulgare* L., *Origanum majorana* L., *Thymus capitatus* L., *Hyssopus officinalis* L., *Zataria multiflora* Boiss, *Lavandula angustifolia* Mill., *Melissa officinalis* L. e *Mentha* spp. L.

I numerosi composti chimici che costituiscono tali oli essenziali hanno attività antimicrobica intervenendo sulla struttura dei batteri responsabili di malattie infettive e nei confronti di miceti che colpiscono l'uomo e gli animali. I siti d'azione degli oli essenziali sono rappresentati prevalentemente dalle strutture di rivestimento della cellula batterica. La composizione per lo più complessa degli oli essenziali spiega il loro ampio spettro d'azione.



**Figura 1. Oli essenziali da piante della famiglia delle *Lamiaceae*: campi d'applicazione in medicina veterinaria**

Essi non agiscono specificamente su un unico meccanismo biologico o struttura microbica, ma su più elementi costitutivi e funzionali della cellula batterica, caratteristici dei Gram positivi e dei Gram negativi, così come dei lieviti e dei miceti. L'azione combinata di diversi elementi chimici, presenti contemporaneamente in un solo olio essenziale, permette di ottenere un effetto antibatterico o battericida riferibile all'azione sinergica su più strutture o funzioni cellulari.

L'indicazione più significativa è rappresentata dall'utilizzo nel campo delle malattie ad eziologia batterica e micotica: nelle patologie infettive dell'apparato respiratorio (micoplasmosi, pasteurellosi, sindromi influenzali, ecc.), gastroenterico (enteriti batteriche, clostridiosi, salmonellosi, colibacillosi, infezioni protozoarie, ecc.) e genito-urinario (vaginiti, ecc.). Per uso esterno anche sull'apparato tegumentario gli oli essenziali hanno numerose funzioni terapeutiche: applicazioni sulle lesioni cutanee di varia origine (ferite, piaghe, dermatiti, dermatomicosi (2), piodermiti, ecc.), affezioni della ghiandola mammaria (mastiti, ragadi del capezzolo, lesioni traumatiche, ecc.) e i trattamenti antiparassitari (pidocchi, pulci, zecche, acari, ecc.).

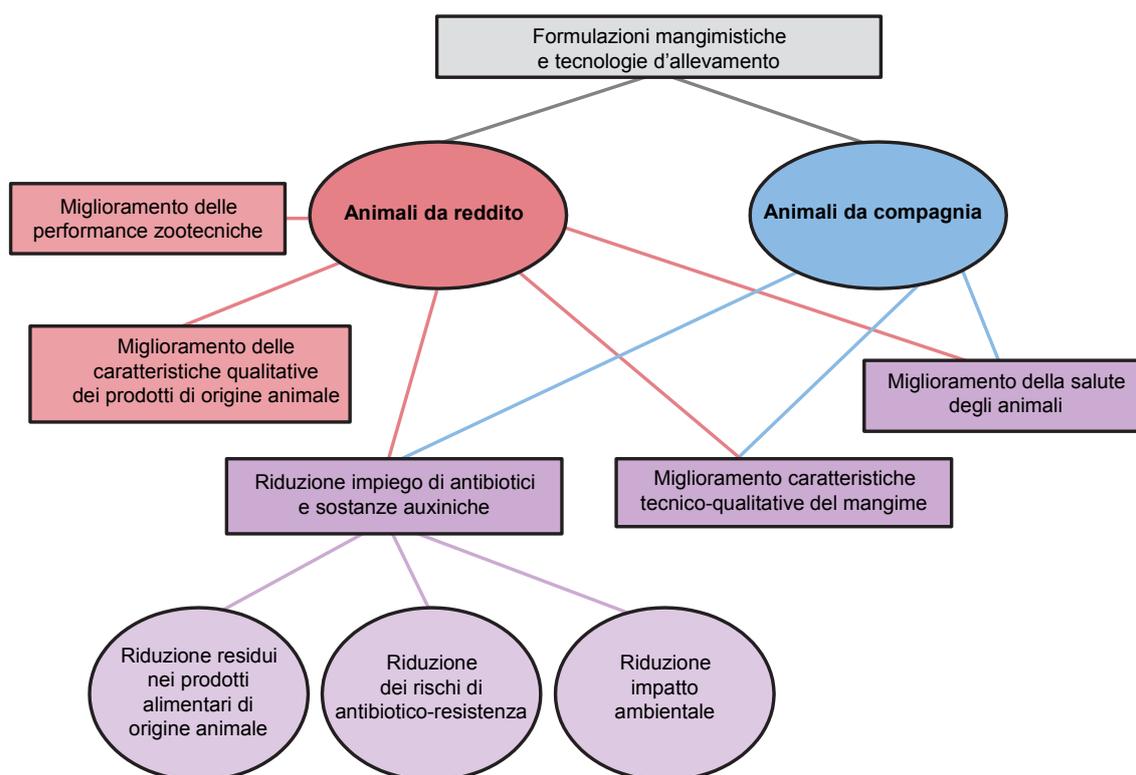
È stata evidenziata *in vivo* l'azione antimicotica di una miscela di oli essenziali su pecore colpite da *Trichophyton mentagrophytes* (3). Alcuni autori (4) hanno messo in evidenza l'efficacia di una miscela di oli essenziali nel trattamento della dermatite da *Malassezia dermatitis* nel cane. Anche un'infezione da *Microsporium canis* sul gatto è stata trattata con successo con una miscela di oli essenziali (5).

L'attività degli oli essenziali sui parassiti interni ed esterni e sugli insetti volanti possono essere un utile ausilio al controllo di numerose infestazioni che colpiscono tutte le specie animali. Alcuni oli essenziali sono stati testati per le loro attività antiparassitaria/repellente nei confronti di insetti e parassiti (*Dermanissus gallinae*) (6) e la capacità di controllare un parassita diffuso nell'allevamento avicolo, l'*Eimeria tenella* (7).

L'apicoltura potrebbe trovare negli oli essenziali un utile ausilio nel controllo di alcune importanti malattie ad eziologia batterica (*Paenibacillus larvae*, peste americana), fungina (*Ascosphaera apis*, covata calcificata) (8) e parassitaria (*Varroa destructor*, varroa) che provocano ingenti danni negli alveari. Alcuni oli essenziali sono già stati oggetto di test *in vitro* nei confronti di *Ascosphaera apis*: *Thymus vulgaris* e *Origanum vulgare* sono risultati tra i più attivi (9).

Nell'alimentazione animale si utilizzano dei prodotti, definiti additivi alimentari, che hanno lo scopo sia di migliorare le caratteristiche tecnico-qualitative del mangime, sia di ottimizzare i processi metabolico-digestivi dell'animale.

L'interesse nei confronti dell'impiego di sostanze naturali può essere considerato innovativo per gli animali da reddito (Figura 2).



**Figura 2. Formulazioni mangimistiche e tecnologie d'allevamento**

L'applicazione di tali sostanze ha avuto risultati positivi assecondando la crescente necessità di allevare e produrre rispettando il più possibile il benessere animale, l'ambiente e per garantire sicurezza e salubrità del prodotto finale, soprattutto per le problematiche che collegano l'uso massivo di molecole antibiotiche negli allevamenti zootecnici e le antibiotico-resistenze riscontrate negli animali e nell'uomo.

Negli ultimi anni la Comunità Europea ha vietato l'impiego dei gran parte degli antibiotici e degli auxinici come promotori di crescita nell'alimentazione zootecnica. In tale contesto è cresciuto l'interesse per l'impiego di additivi alimentari naturali che tutelino lo status sanitario

dell'apparato digerente e le sue capacità digestive, al fine di migliorare l'efficienza e la produttività zootecnica, presentando, nel contempo, maggiore sicurezza per l'uomo, per gli animali e per l'ambiente. L'olio essenziale di rosmarino (*Rosmarinus officinalis*) (10, 11) è utilizzato in numerose miscele mangimistiche come agente antiossidante in sostituzione di antiossidanti di sintesi (es. BHT e BHA) per la conservazione delle componenti lipidiche e vitaminiche sensibili all'ossidazione presenti nello stesso alimento zootecnico.

Nella letteratura scientifica numerosi lavori di ricerca mettono in evidenza l'azione antibatterica degli oli essenziali e gli effetti positivi sulle performance produttive di varie specie animali. Alcuni autori (12) hanno saggiato l'attività antimicrobica dell'olio essenziale di rosmarino e origano nei confronti di alcuni ceppi batterici (*Escherichia coli* e *Salmonella indiana*, *Staphylococcus aureus*) e hanno effettuato un test *in vivo* su polli da carne mettendo a confronto diete integrate o con oli essenziali o con avilamicina, molecola auxinica di sintesi. La prova non ha mostrato differenze significative nelle performance produttive lasciando intravedere la possibilità di utilizzare tali oli essenziali in sostituzione dell'auxinico di sintesi.

Polli alimentati con una dieta integrata con olio essenziale di rosmarino (13) hanno dato i migliori risultati in termini di performance produttive e allo stesso tempo hanno migliorato i parametri di qualità delle loro carni.

Sono stati valutati gli effetti dell'integrazione della dieta di polli da carne con oli essenziali di timo e altri estratti dimostrando che influiscono positivamente sulle performance zootecniche e sulla salute del pulcino (14). La somministrazione di una dieta integrata con olio essenziale di origano a conigli da carne ha aumentato la presenza di antiossidanti nella carne (15).

Nell'allevamento delle specie ittiche gli oli essenziali aprono un capitolo interessante nel controllo delle patologie a carattere batterico, micotico e parassitario riducendo l'impiego delle molecole di sintesi e il relativo impatto ambientale. Alcuni autori hanno saggiato l'attività di alcuni oli essenziali e loro miscele su agenti eziologici delle specie ittiche oggetto d'allevamento: ad esempio nei confronti di *Saprolegna parasitica* l'olio essenziale di *Zataria multiflora* (16) e di *Satureja montana*, *Thymus vulgaris*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare*, *Lavandula angustifolia*, *Melissa officinalis*, *Mentha piperita* (17).

Alcune piante aromatiche sono spezie aromatiche utilizzate in cucina e i loro oli essenziali per la loro gradevolezza e per le azioni antiossidanti, conservanti e inibenti la crescita batterica possono essere utilizzati all'interno di preparati di carne e nelle pellicole di rivestimento per favorire la conservazione e prolungare la *shelf-life* degli alimenti. Le possibilità applicative degli oli essenziali nell'ambito della medicina veterinaria sono molteplici e offrono soluzioni sicuramente interessanti in ambito clinico-terapeutico e nel comparto zootecnico-mangimistico al fine di migliorare il benessere e la salute degli animali, le performance produttive e, al tempo stesso, ridurre l'uso di antibiotici. Forse ancora non si possono ben valutare le potenzialità degli oli essenziali e, comunque, si possono considerare una "interessante opportunità" per incidere positivamente sulle problematiche relative ai residui negli alimenti destinati all'uomo, sull'antibiotico-resistenza in campo medico e veterinario ed, infine, sull'impatto ambientale legato all'utilizzo delle molecole di sintesi.

## Bibliografia

1. Nardoni S, Mugnaini L, Pistelli L, Leonardi M, Sanna V, Perrucci S, Pisseri F, Mancianti F. Clinical and mycological evaluation of an herbal antifungal formulation in canine *Malassezia dermatitis*. *J Mycol Med* 2014;pii: S1156-5233(14)00123-1.
2. Mugnaini L, Nardoni S, Pinto L, Pistelli L, Leonardi M, Pisseri F, Mancianti F. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of some essential oils against feline isolates of *Microsporium canis*. *J Mycol Med* 2012;22(2):179-84.

3. George DR, Sparagano OA, Port G, Okello E, Shiel RS, Guy JH. Repellence of plant essential oils to *Dermanyssus gallinae* and toxicity to the non-target invertebrate *Tenebrio molitor*. *Vet Parasitol* 2009;162(1-2):129-34.
4. Giannenas I, Florou-Paneri P, Papazahariadou M, Christaki E, Botsoglou NA, Spais AB. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. *Arch Tierernahr* 2003;57(2):99-106.
5. Frasnelli M, Scozzoli M, Mattarelli A. Covata calcificata: azione inibente *in vitro* di oli essenziali e loro miscele nei confronti di *Ascospaera apis*, potenziale utilizzo in apicoltura. *Natural I* 2013;127:39.
6. Kloucek P, Smid J, Flesar J, Havlik J, Titera D, Rada V, Drabek O, Kokoska L. *In vitro* inhibitory activity of essential oil vapors against *Ascospaera apis*. *Nat Prod Commun* 2012;7(2):253-6.
7. De Melo AA, Geraldine RM, Silveira MF, Torres MC, E Rezende CS, Fernandes TH, De Oliveira AN. Microbiological quality and other characteristics of refrigerated chicken meat in contact with cellulose acetate-based film incorporated with rosemary essential oil. *Braz J Microbiol* 2012;43(4):1419-27.
8. Estévez M, Ventanas S, Ramírez R, Cava R. Influence of the addition of rosemary essential oil on the volatiles pattern of porcine frankfurters. *J Agric Food Chem* 2005;53(21):8317-24.
9. Mathlouthi N, Bouzaïenne T, Oueslati I, Recoquillay F, Hamdi M, Urdaci M, Bergaoui R. Use of rosemary, oregano, and a commercial blend of essential oils in broiler chickens: *in vitro* antimicrobial activities and effects on growth performance. *J Anim Sci* 2012;90(3):813-23.
10. Yesilbag D, Eren M, Agel H, Kovanlikaya A, Balci F. Effects of dietary rosemary, rosemary volatile oil and vitamin E on broiler performance, meat quality and serum SOD activity. *Br Poult Sci* 2011;52(4):472-82.
11. Cross DE, McDevitt RM, Hillman K, Acamovic T. The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. *Br Poult Sci* 2007;48(4):496-506.
12. Botsoglou NA, Florou-Paneri P, Christaki E, Giannenas I, Spais AB. Performance of rabbits and oxidative stability of muscle tissues as affected by dietary supplementation with oregano essential oil. *Arch Anim Nutr* 2004; 58(3):209-18.
13. Khosravi AR, Shokri H, Sharifrohani M, Mousavi HE, Moosavi Z. Evaluation of the antifungal activity of *Zataria multiflora*, *Geranium herbarium*, and *Eucalyptus camaldolensis* essential oils on *Saprolegnia parasitica*-infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *Foodborne Pathog Dis* 2012;9(7):674-9.
14. Tampieri MP, Galuppi R, Carelle MS, Macchioni F, Cioni PL, Morelli I. Effect of selected essential oils and pure compounds on *Saprolegnia parasitica*. *Pharmaceutical Biology* 2003;41(8):584-91.
15. Carramiñana JJ, Rota C, Burillo J, Herrera A. Antibacterial efficiency of Spanish *Satureja montana* essential oil against *Listeria monocytogenes* among natural flora in minced pork. *J Food Prot* 2008;71(3):502-8.
16. Tampieri MP, Galuppi R, Carelle MS, Arvati A. Efficacia di oli essenziali nei confronti di alcuni dermatofiti: test *in vitro*. *Summa* 2006;6:31-5.
17. Mugnaini L, Nardoni S, Pistelli L, Leonardi M, Giuliotti L, Benvenuti MN, Pisseri F, Mancianti F. A herbal antifungal formulation of *Thymus serpyllum*, *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* for treating ovine dermatophytosis due to *Trichophyton mentagrophytes*. *Mycoses* 2013;56(3):333-7.

## OLI ESSENZIALI IN DERMATOLOGIA VETERINARIA

Francesca Pisseri  
Centro Italiano Medicina Integrata, Pisa

La dermatologia è un importante settore in clinica veterinaria, sia nell'ambito degli animali da affezione, sia in quello degli animali da allevamento e in ippatria.

La fitoterapia, e in particolare gli oli essenziali, ci offrono delle importanti opportunità terapeutiche in questo settore.

Si possono utilizzare per affezioni quali il pododerma localizzato o diffuso, la dermatite seborroica, le micosi, l'acne, le dermatiti furfuracee, le dermatopatie acute e quelle croniche con cute secca o seborroica in maniera alternativa o complementare alla terapia convenzionale.

In dermatologia la loro attività farmacologica può essere eziologica, andando a colpire batteri o miceti, e/o sintomatica, riducendo o risolvendo sintomi come il prurito; oppure possono agire stimolando i sistemi difensivi del paziente o come riequilibranti della cute, infatti, stimolano sia il sistema immunitario sia i cheratinociti al miglioramento delle difese locali, dello strato corneo e del materiale lipidico intercellulare.

Gli oli essenziali, in quanto fitocomplessi, esercitano diverse attività sul paziente e sull'organo ammalato, infatti i loro costituenti chimici agiscono sia singolarmente che in sinergia, determinando effetti terapeutici complessi e combinati.

La terapia in dermatologia può essere di tipo locale o sistemico, va tuttavia tenuto presente che essendo sostanze in gran parte volatili e liposolubili, anche in caso di applicazioni locali, vi può essere una certa diffusione sistemica sia per via inalatoria che per via cutanea.

L'utilizzo sistemico deve essere cauto, dato il basso indice terapeutico di alcuni oli essenziali.

Le principali attività terapeutiche degli oli essenziali per quanto riguarda la dermatologia sono: proprietà antinfiammatorie e decongestionanti (*Matricaria chamomilla*, *Rosmarinus officinalis*), proprietà immunomodulanti (*Citrus limon*, *Thymus vulgaris*), attività antimicrobiche (*Thymus* spp., *Citrus* spp., *Ocimum basilicum*), proprietà antifungine (*Melaleuca alternifolia*, *Thymus vulgaris*), attività antiossidanti (*Rosmarinus officinalis*, *Citrus lemon*), proprietà acaricide (*Eugenia caryophyllata*), proprietà sebo-riequilibranti (*Citrus* spp.).

Da ricordare le azioni olfattive, che implicano, oltre le percezioni legate alla profumazione, effetti neurologici e feromonalì, soprattutto su zone del cervello riguardanti le emozioni, e le proprietà psicotrope, con evidenti effetti sul comportamento sia umano che animale, entrambe possono contribuire al miglioramento di alcune patologie dermatologiche con base psicosomatica.

Per quanto riguarda le proprietà antimicrobiche esse sono state evidenziate anche nei confronti di alcuni ceppi antibiotico-resistenti.

La composizione e la qualità degli oli essenziali influenzano fortemente sia le loro potenzialità terapeutiche che i rischi tossicologici, quindi va posta particolare attenzione alla provenienza e al chemiotipo che si utilizza.

La scelta da parte del medico della terapia idonea, della posologia e delle modalità di impiego prevede lo studio delle qualità terapeutiche di ogni olio essenziale, del metodo di produzione, per esempio preferibilmente da raccolta spontanea o da coltivazione biologica, correlabili alle componenti studiate nella loro sinergia di azione, in relazione al caso clinico che si vuole affrontare.

Il *Tea Tree Oil* (olio essenziale di *Melaleuca alternifolia*) è sicuramente il più studiato e utilizzato in dermatologia, perché da diversi decenni sono stati finanziati e sostenuti dai Paesi produttori numerosi studi scientifici, che ne hanno arricchito le informazioni disponibili e il largo utilizzo da parte delle aziende.

Gli oli essenziali ricavati dalla nostra flora mediterranea hanno aspetti e potenzialità altrettanto interessanti, da approfondire.

## Prescrizione

Si prescrive un determinato olio essenziale, o una miscela di oli essenziali, in base alle evidenze cliniche in letteratura (sia nell'uomo che negli animali), agli utilizzi tradizionali e allo stato clinico del paziente.

La prescrizione, anche se riguarda una preparazione ad uso topico, può tenere presenti le caratteristiche del paziente nella sua totalità psico-fisica, in quanto le componenti volatili raggiungono il sistema olfattivo e in quanto, data la forte lipofilia, l'assorbimento transdermico può essere importante.

Per la prescrizione antibatterica e antifungina sarebbe auspicabile allestire degli aromatogrammi, in quanto può variare la sensibilità di diversi ceppi micotici o batterici agli oli essenziali.

È importante utilizzare opportuni veicoli per le somministrazioni, per quelle locali sono indicati gli oli vegetali, come l'olio di mandorle dolci, l'olio di semi di girasole, l'olio di sesamo, se si vuole un rapido e totale assorbimento dei principi attivi; sono più indicati gli oli minerali se si desidera che i principi attivi permangano per un tempo maggiore sulla superficie cutanea, per esempio nel caso di soluzioni repellenti per ectoparassiti.

## Dosaggi

Per applicazioni cutanee i dosaggi variano a seconda della patologia da trattare e del paziente, per esempio nei giovani e nelle zone dove il mantello è più rado saranno più diluite, le soluzioni vanno dal 2 al 12%, fino al 50% con alcuni oli essenziali, come il *Tea Tree Oil*. Per il condotto uditivo, da esperienze personali, le soluzioni vanno dallo 0,5% al 4%.

## Reazioni avverse

In caso di applicazione cutanea si può avere una irritazione diretta (reazione di tipo non immunitario), già alla prima applicazione, la reazione è rapida, e la sua severità dipende dalla concentrazione dell'irritante.

Vi può essere inoltre ipersensibilità, con reazioni di tipo immunitario, sia di tipo I, che comprende l'anafilassi e l'atopia, sia reazioni cellulo-mediate o l'ipersensibilità ritardata (risposta infiammatoria dopo 12-24 ore) con reazione di tipo eczematoso, come la dermatite da contatto.

Diverse componenti presentano tossicità generale, dose-dipendente, va posta quindi attenzione anche alla eventualità di ingestione da leccamento, in caso di applicazione di soluzioni concentrate.

In caso di applicazioni cutanee inappropriate a dosi molto elevate si sono riscontrati sintomi come depressione, incoordinazione e tremori muscolari.

In caso di dermatiti atopiche va valutato con attenzione l'utilizzo di oli essenziali che si sono dimostrati allergizzanti, da considerare che alcuni oli derivanti dalla famiglia delle Labiate hanno causato reazioni di ipersensibilità crociata.

## Utilizzo nelle micosi

Le micosi cutanee sono affezioni sostenute da funghi microscopici, di frequente riscontro in medicina sia umana, che veterinaria.

*Microsporum canis* è il dermatofita più frequentemente coinvolto in casi di micosi degli animali da compagnia e nell'uomo.

Le nostre esperienze riguardano *M. canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *M. gypseum*, *T. equinum*.

Le micosi si instaurano e si diffondono anche a causa dello squilibrio della cute stessa o, più in generale, dell'intero organismo (stress, carenze immunitarie, ecc.); gli oli essenziali grazie alla loro attività, non solo antimicotica ma anche favorente il ripristino dell'equilibrio cutaneo contribuiscono ad una migliore risoluzione della infezione.

È noto, infatti, come le infezioni batteriche intercorrenti, fenomeni infiammatori, alterazioni della cheratinizzazione, seborrea, favoriscano lo sviluppo dei miceti.

I prodotti convenzionali ad uso sistemico possono presentare problemi di epatotossicità, mentre i quelli ad uso topico non sempre determinano la risoluzione della patologia per difficoltà del principio attivo nel raggiungere concentrazioni tissutali attive.

In collaborazione con il gruppo di ricerca di Micologia del Dipartimento di Medicina Veterinaria e di Farmacia dell'Università di Pisa abbiamo testato la attività fungistatica e/o fungicida di alcuni oli essenziali derivanti da piante appartenenti alla fauna mediterranea quali l'olio essenziale di *Origanum vulgare* (origano), di *Citrus limon* (limone), di *Rosmarinus officinalis* (rosmarino), di *Thymus serpyllum* (timo bianco), oltre il più noto olio essenziale di *Melaleuca alternifolia* (*Tea Tree Oil*).

Tali oli contengono alcoli e fenoli, dotati di attività antifungina, le altre componenti, con attività antinfiammatoria, antibatterica, immunomodulante, lenitiva e antiossidante, contribuiscono alla risoluzione delle lesioni.

I risultati delle nostre ricerche sono stati interessanti: *in vitro* tali oli si sono dimostrati efficaci nel limitare la crescita di funghi patogeni come *M. canis* e *T. equinum*, presentando in alcuni casi anche attività fungicida.

Nella esperienza clinica li utilizziamo su cani, gatti, cavalli, pecore e bovini.

La prescrizione è spesso personalizzata, tuttavia la miscela che utilizziamo maggiormente è costituita da *Thymus serpyllum* 2%, *Origanum vulgare* 5%, *Rosmarinus officinalis* 5% diluiti in olio di mandorle dolci, applicata nei cavalli, bovini e pecore per 15 giorni una volta al giorno, nei piccoli animali per 30 giorni due volte al giorno.

I proprietari danno il loro consenso informato al trattamento.

La risposta clinica è ottima nella maggior parte dei casi, con risoluzione delle lesioni e controllo micologico negativo; qualche caso ha presentato reazione avversa rappresentata da lieve arrossamento.

## Utilizzo nelle dermatopatie correlate a *Malassezia* spp.

Altri funghi importanti in dermatologia umana e animale sono diverse specie di *Malassezia*, che possono provocare dermatiti seborroiche, non contagiose, ma con tendenza alla cronicizzazione, i cui sintomi clinici possono essere: alopecia, eritema localizzato o diffuso, forfora, prurito, papule, odore rancido della cute, lichenificazione, iperpigmentazione.

Frequentemente negli animali da compagnia questi funghi provocano otiti di difficile eradicazione. Abbiamo sperimentato miscele di oli essenziali di camomilla, lavanda, rosmarino e menta per le otiti del cane e del gatto sostenute da *Malassezia* spp., evidenziando una buona risposta terapeutica, soprattutto in caso di otiti acute.

Le molteplici attività degli oli essenziali possono quindi contribuire a risolvere otiti e dermatiti da *Malassezia* spp. non solo combattendo direttamente l'agente patogeno, ma anche regolando le manifestazioni patologiche e agendo sui vari fattori che contribuiscono al mantenimento della malattia come infiammazione, seborrea, infezioni batteriche e micotiche.

## Utilizzo dell'olio essenziale di *Rosmarinus officinalis* nelle dermatopatie

Riportiamo alcuni importanti aspetti dell'olio essenziale di *Rosmarinus officinalis*, che consideriamo di particolare importanza per le sue applicazioni in dermatologia veterinaria.

È antimicotico e antibatterico (sembrano essere più sensibili i Gram positivi).

È antiossidante, fotoprotettivo, radioprotettivo, seboriequilibrante. Favorisce la rigenerazione della cute e del pelo. Ha dimostrato proprietà antinfiammatorie, infatti, l'acido carnosico e il carnosolo sopprimono la risposta pro-infiammatoria e stimolano i leucociti polimorfonucleati.

La sua attività olfattiva ha dimostrato effetti stimolanti sulla attività locomotoria dei mammiferi e modificazioni di alcuni parametri dell'attività elettrica del cervello, azione principalmente stimolante, con aumento di attenzione, di memoria e di contentezza, riducendo lo stress e l'ansia negli studenti.

Vi sono 6 chemiotipi di *Rosmarinus officinalis*: il chemiotipo italiano, da noi utilizzato, è costituito prevalentemente da 1,8-cineolo e alfa-pinene.

Il chemiotipo a canfora è pericoloso poiché può essere convulsivante nei bambini, e ha un notevole assorbimento sia per via inalatoria sia transdermica.

Le possibili indicazioni in veterinaria sono le dermatopatie ad eziologia batterica, da dermatofiti, da *Malassezia* spp., dermatopatie di tipo secco o seborroiche, di tipo infiammatorio, acute o croniche.

## Conclusioni

In conclusione i vantaggi dell'utilizzo degli oli essenziali in dermatologia veterinaria sono la riduzione dei problemi di farmaco-resistenza, possibilità di utilizzo negli allevamenti biologici, facilità di applicazione, gradevolezza del profumo, ma soprattutto azione combinata del fitocomplesso, che agisce anche sui fattori predisponenti le varie patologie, il basso impatto ambientale.

La letteratura scientifica è ancora scarsa di studi clinici veterinari, e quindi si auspica lo sviluppo di ricerche in tal senso.

## Bibliografia di riferimento

- Mugnaini L, Nardoni S, Pistelli L, Leonardi M, Giuliotti L, Benvenuti MN, Pisseri F, Mancianti F. A herbal antifungal formulation of *Thymus serpyllum*, *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* for treating ovine dermatophytosis due to *Trichophyton mentagrophytes*. *Mycoses* 2013;56(3):333-7.
- Pisseri F, Bertoli A, Nardoni S, Pinto L, Pistelli L, Guidi G, Mancianti F. Antifungal activity of tea tree oil from *Melaleuca alternifolia* against *Trichophyton equinum*: An *in vivo* assay. *Phytomedicine* 2009;16(11):1056-8.
- Pisseri F, Bertoli A, Pistelli L. Essential oils in medicine: principles of therapy. *Parassitologia* 2008;50(1-2):89-91.
- Pisseri F, Nardoni S, Pistelli L, Bertoli A, Benvenuti N, Giuliotti L, Mancianti F. Oli essenziali per il trattamento di alcune dermatofitosi degli erbivori. In: *La gestione della salute nell'allevamento biologico*. Milano: Associazione Italiana di Zootecnia Biologica e Biodinamica; 2010. (I quaderni zoobiodi n. 4/2010). p. 83-4.
- Pisseri F. Aromaterapia clinica. In: *Atti del Convegno I farmaci fitoterapici in medicina veterinaria, un sapere tra scienza e tradizione*. 2009. Pisa, 15-16 maggio.
- Pisseri F. Gestione sanitaria dell'allevamento biologico, utilizzo della medicina omeopatica e della fitoterapia. *Buiatria* 2009;3:57-63.
- Pistelli L, Mancianti F, Bertoli A, Cioni PL, Leonardi M, Pisseri F, Mugnaini L, Nardoni S. Antimycotic activity of some aromatic plants essential oils against canine isolates *Malassezia pachydermatis*: an *in vitro* assay. *The Open Mycology Journal*, 2012;6:17-21.



*Serie Rapporti ISTISAN  
numero di maggio 2015, 1° Suppl.*

*Stampato in proprio  
Settore Attività Editoriali – Istituto Superiore di Sanità*

*Roma, maggio 2015*