

TMA

ISSN: 2421-0366



TECNICHE MEDICHE ASSOCIATE

3

Novembre 2015

Trimestrale di studio e di ricerca sulle medicine naturali

ATTIVITÀ ANTIBATTERICA, ANTIFUNGINA E ANTIVIRALE DELL'IDROLATO DI *CORIDOTHYMUS CAPITATUS* (L.) RCHB.

F. DI SCOGLITTI (RG)

Andreana Marino¹, Antonia Nostro¹, Narcisa Mandras², Daniela Scalas², Giovanna Ginestra¹, Peggy Marconi³, Daniele Piovan³, Natalizia Miceli¹, Maria Fernanda Taviano¹, Angela Filocamo¹, Giuseppe Bisignano¹, Vivian Tullio²

Coridothymus capitatus (L.) Rchb.f. è una pianta aromatica, appartenente alla famiglia delle Lamiaceae, comune nelle regioni più aride dell'area Mediterranea (Pignatti, 2011).³In Sicilia, *C. capitatus*, noto anche come Origanum spanish, cresce spontaneamente lungo le zone costiere e sulle pendici assolate e rocciose. Le foglie e i fiori di questo arbusto producono oli essenziali (OE), ricchi in polifenoli, importanti per l'industria cosmetica, farmaceutica e alimentare (Karousou *et al.*, 2005; Goren *et al.*, 2003).



Gli idrolati, considerati “prodotti di scarto” della distillazione degli OE, in genere meno tossici, possono mantenere le qualità benefiche e curative degli oli.

L'attività antimicrobica dell'idrolato di *C. capitatus* (L.) è stata valutata su batteri, lieviti e virus.

Materiale vegetale. I fiori di *C. capitatus* sono stati

raccolti in un'area classificata “Lauretum-Rosmarinetum” sita sui monti Iblei. Il Voucher specimen è stato depositato presso l'Orto Botanico di Catania. L'idrolato dei fiori, prodotto dall'azienda Exentiae S.r.l. (CT), è stato ottenuto mediante distillazione in corrente di vapore in continuo utilizzando una caldaia esterna e una colonna di circa 2 metri senza riciclo di acque di condensazione. Nell'idrolato la resa in OE è stata dello 0,6%. Profilo fitochimico. L'analisi fitochimica è stata eseguita mediante un gas cromatografo dotato di un rilevatore a ionizzazione di fiamma (FID) (GC-FID-Shimadzu mod. Q17-A) e uno spettrometro di massa (GC-MS-Shimadzu mod. GCMS-QP5050A). Tossicità. La tossicità è stata valutata mediante l'*Artemia salina* lethality bioassay ed il test di metabolizzazione dei sali di tetrazolio (MTT) su cellule Vero. Attività antimicrobica. I microrganismi test utilizzati sono stati batteri Gram-positivi e Gram-negativi ATCC, isolati clinici di *Staphylococcus aureus* (inclusi ceppi meticillino-resistenti-MRSA), isolati alimentari di *Listeria monocytogenes*, e lieviti ATCC (*Candida albicans*, *C. glabrata*) e isolati clinici (*C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. norvegensis*, *C. lusitaniae*, *C. valida*, *C. guilliermondii*). La Minima Concentrazione Inibente (MIC) di batteri e lieviti e, la Minima Concentrazione Battericida (MBC) e Fungicida (MFC) sono state determinate secondo le linee guida CLSI 2011. Le concentrazioni testate dell'idrolato erano incluse nel range 0,3%-0,019% (v/v). Le associazioni idrolato/farmaco sono state saggiate mediante il checkerboard test. In particolare l'associazione idrolato/gemifloxacina è stata saggiata sui ceppi di *S. aureus*, mentre quella idrolato/itraconazolo su *C. glabrata* e *C. krusei* resistenti all'itraconazolo. L'attività antivirale è stata analizzata mediante il saggio di riduzione delle placche e il test di resa.

I risultati delle analisi sono stati calcolati in termini

¹Dipartimento di Scienze del Farmaco e Prodotti per la Salute. Università di Messina, Italia, ²Dipartimento di Scienze della Sanità Pubblica e Pediatriche. Università di Torino, Italia, ³Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie. Università di Ferrara, Italia

di OE presente nell'idrolato allo 0,6%. I principali componenti identificati erano: carvacrolo (90,74%), p-cymene (2,10%) e β -caryophyllene (1,58%). L'idrolato non ha manifestato tossicità sui nauplii di *A. salina* ($LC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$), ed è risultato poco tossico nei confronti delle cellule Vero a concentrazioni comprese tra 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. Le MIC nei confronti dei batteri erano comprese tra 0,075% e 0,15% (v/v), le MBC tra 0,075% e 0,3% (v/v), escluso *P. aeruginosa* ($> 0,3\%$ v/v); contro i lieviti le MIC erano comprese tra 0,0375 e 0,15% (v/v), eccetto *C. norvegensis*, *C. lusitaniae* e *C. valida* (0,3% v/v), mentre le MFC tra 0,075% e 0,3% (v/v). L'effetto sia sui batteri che sui funghi, inclusi i ceppi resistenti, era microbica. Si sottolinea l'evidenza di un effetto sinergico dell'associazione idrolato/itraconazolo su *C. krusei* (FICI= 0,375), ma non su *C. glabrata*. Come effetto antivirale nei confronti di HSV, il pre-trattamento sia della particella virale che delle cellule con l'idrolato ha mostrato un'attività a concentrazioni comprese tra i 50-100 $\mu\text{g/mL}$. In entrambi i casi l'efficacia antivirale dell'idrolato si è rilevata significativa nei confronti di HSV-2 con una riduzione del numero delle placche di lisi nelle 48 h, rispettivamente del 40% o del 50% circa rispetto al virus o alle cellule non pretrattate con la sostanza in esame, mentre si è rilevata bassa o quasi nulla verso HSV-1.

L'idrolato di *C. capitatus* possiede un'elevata attività antimicrobica dovuta, probabilmente, alla elevata concentrazione di carvacrolo in esso contenuta. Il carvacrolo nell'OE di *C. capitatus* è, in genere, il fenolo dominante e la sua concentrazione è dipendente dall'habitat e dalle relative condizioni climatiche della zona geografica di produzione (Goren *et al.*, 2003). L'attività antimicrobica del carvacrolo, dovuta alla sua capacità di alterare (i) la membrana esterna dei batteri Gram-negativi e quella citoplasmatica dei batteri Gram-positivi, e (ii) la membrana citoplasmatica e mitocondriale dei lieviti, causa un aumento della permeabilità passiva e la conseguente morte cellulare (Gallucci *et al.*, 2014; Sienkiewicz *et al.*, 2013; Giordani *et al.*, 2004). Per quanto riguarda invece l'azione antivirale, l'idrolato sembra avere un effetto sull'infettività di HSV-2 sia agendo direttamente sulla particella virale (pericapside) sia agendo sulla membrana cellulare quando queste vengono pretrattate con la sostanza in esame, confermando così che l'azione antivirale è nel blocco dell'assorbimento e dell'entrata del virus nelle cellule. La maggiore attività nei confronti dell'infezione da HSV-2, ma non verso quella da

HSV-1, potrebbe essere dovuta ad una diversa affinità dei due sierotipi per specifici recettori cellulari. Non si evidenzia invece alcun effetto sul ciclo replicativo del virus poiché non si nota, rispetto all'infezione di controllo, alcuna riduzione delle placche di lisi quando la sostanza è aggiunta dopo l'infezione delle cellule con il virus. L'efficacia e la scarsa tossicità dimostrata dall'idrolato di *C. capitatus* evidenziano le potenzialità applicative di questo prodotto fitochimico sfruttabile come agente antimicrobico naturale per contrastare infezioni e resistenze o come conservante di prodotti alimentari, farmaceutici e cosmetici.

Bibliografia.

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI Document M100S21. Wayne, Pa, USA, 2011.
- Gallucci, M.N., Carezzano, M.E., Oliva, M.M., Demo, M.S., Pizzolitto, R.P., Zunino, M.P., Zygadlo, J.A., Dambolena, J.S. 2014. *In vitro* activity of natural phenolic compounds against fluconazole-resistant *Candida* species: a quantitative structure-activity relationship analysis. *J Appl Microbiol*, 116,795-804.
- Giordani, R., Regli, P., Kaloustian, J., Mikail, C., Abou, L., Portugal, H. 2004. Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytother. Res.* 18, 990-995
- Goren, A. C., Bilsela, G., Bilsela, M., Demira, H., Kocabas, E. E. 2003. Analysis of essential oil of *Coridothymus capitatus* (L.) and its antibacterial and antifungal activity. *Z Naturforsch*, 58c, 687-690.
- Karousou, R., Koureas, D. N., Kokkini, S. 2005. Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Phytochemistry*, 66, 2668-2673.
- Pignatti, S. 2011. Flora d'Italia, Vol. 2° ed. Edagricole
- Sienkiewicz, M., Lysakowska, M., Pastuszka, M., Bienias W., Kowalczyk, E. 2013. The potential of use basil and rosemary essential oils as effective antibacterial agents. *Molecules*, 18, 9334-9351.

