

TMA

ISSN: 2421-0366



TECNICHE MEDICHE ASSOCIATE

3

Novembre 2015

Trimestrale di studio e di ricerca sulle medicine naturali

OLIO ESSENZIALE DI *MENTHA X PIPERITA* (HUDS) (LAMIACEAE) DI PANCALIERI (TO) VALUTAZIONE PRELIMINARE DELL'ATTIVITÀ ANTIFUNGINA E DELL'INTERAZIONE SINERGICA CON GLI ANTIMICOTICI DI SINTESI

Daniela Scalas, Janira Roana, Narcisa Mandras, Giuliana Banche, Valeria Allizond, Anna Maria Cuffini, Vivian Tullio

Introduzione

Al genere *Mentha* (*Lamiaceae*) appartengono numerose specie di piante erbacee perenni, conosciute in tutto il mondo per il loro impiego nell'industria alimentare, cosmetica e farmaceutica. La pianta è originaria dell'Europa e la sua coltivazione sembra risalire al XVIII secolo in Inghilterra (contea di Mitcham), con successiva diffusione in Asia, in Nord America ed in Australia. In Italia fu inizialmente utilizzata come pianta aromatica e solo in seguito coltivata su vaste estensioni in Piemonte, Veneto ed Emilia Romagna, alimentando una grande industria essenziale. Il notevole interesse nei confronti di questa pianta è dato dalla produzione dell'olio essenziale elaborato dalle ghiandole secretorie poste sotto l'epidermide delle foglie, costituito principalmente da un alcool secondario, il mentolo (50-60%) e da un chetone, il mentone (9-12%). In Piemonte, è particolarmente diffusa la coltivazione della *Mentha x piperita* L. (*Lamiaceae*), derivante da un ibrido spontaneo tra *M. aquatica* x *M. spicata*, per la produzione dell'olio essenziale di menta di Pancalieri. Tale denominazione viene utilizzata esclusivamente per indicare l'olio essenziale ottenuto dalla distillazione a corrente di vapore a bassa pressione dell'erba verde in pianta intera, proveniente dal cultivar *Mentha x piperita* varietà *officinalis* Sole, forma *rubescens* Camus, nota come Menta Italo-Mitcham. L'olio essenziale di menta di Pancalieri, per il gusto molto gradevole, il profumo finissimo e l'aroma molto intenso è altamente apprezzato dal punto di vista qualitativo, rappresentando uno dei prodotti di eccellenza del Piemonte. I

principali usi medicinali dell'olio essenziale di *Mentha x piperita* L., che derivano da un'antica tradizione, comprendono varie applicazioni per le proprietà aromatizzanti, digestive, carminative, antispasmodiche, diuretiche, rinfrescanti, antisettiche ed antinfiammatorie (1-2). Negli ultimi anni, inoltre, recenti dati della letteratura documentano la potenziale efficacia antimicrobica dell'olio essenziale *Mentha x piperita* L. nei confronti di batteri e funghi patogeni di rilevanza clinica (3-6). Per tale motivo, in considerazione del numero limitato di farmaci antifungini presenti sul mercato farmaceutico e delle problematiche legate all'insorgenza della farmaco-resistenza (e.g. agli azoli), in questo lavoro preliminare è stato intrapreso lo studio dell'attività antifungina *in vitro* dell'olio essenziale di menta di Pancalieri nei confronti di lieviti e funghi filamentosi dermatofiti. Inoltre, si è proceduto a valutare l'efficacia dell'uso combinato di alcuni antimicotici (itraconazolo e/o ketoconazolo) con l'olio essenziale di menta di Pancalieri, come possibile alternativa terapeutica.

Materiali e metodi

L'olio essenziale di menta di Pancalieri usato è di tipo commerciale (Erbe Aromatiche Pancalieri S.p.A, Torino, Italia), grezzo o non deterpenato. Gli standard antifungini itraconazolo e ketoconazolo (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) sono stati dissolti in DMSO e successivamente diluiti in RPMI 1640, con un range di concentrazioni finali compreso tra 0,015-8 µg/mL. L'attività antifungina è stata valutata nei confronti di 16 ceppi clinici di *Candida* spp. (*C.albicans*, *C.glabrata*, *C.krusei*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, *C.valida*, *C.lusitaniae*, *C.norvegensis*), 15 ceppi clinici di non-*Candida* spp. (*Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera japonica*, *Pichia carsonii*, *Sporobolomyces salmonicolor*), e 5 ceppi di funghi dermatofiti, di isolamento umano, di

cui 3 appartenenti al genere *Microsporum* (*M.canis*, *M.gypseum*) e 2 appartenenti al genere *Trichophyton* (*T.mentagrophytes*). Per valutare la MIC (Minima Concentrazione Inibente) e la MFC (Minima Concentrazione Fungicida) dell'olio essenziale di menta di Pancalieri nei confronti sia dei lieviti che dei funghi dermatofiti è stato utilizzato il metodo delle microdiluzioni in brodo secondo le linee guida CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute), opportunamente modificato per gli oli essenziali, con un inoculo fungino (blastoconi e conidi) pari a 2×10^3 UFC/mL e successiva incubazione per i lieviti a 30°C per 24-48 h (72 h per *C.neoformans*), mentre per i dermatofiti a T ambiente per 7 giorni. L'olio essenziale è stato diluito in RPMI 1640 addizionato con 0,5 % di Tween 80 ed il range di diluizioni finali dell'olio essenziale di menta di Pancalieri in microtiter a 96 pozzetti era compreso tra 1% e 0,0019% v/v. L'analisi dell'uso combinato dell'olio essenziale di menta di Pancalieri con gli antimicotici (itraconazolo e/o ketoconazolo) è stata effettuata mediante la tecnica delle diluizioni crociate e relativo calcolo dell'indice di concentrazione frazionata inibitoria (FICI). L'interazione è stata interpretata come segue: a) sinergica $FICI \leq 0,5$; b) nessuna interazione $FICI > 0,5-4$; c) antagonistica $FICI > 4$ (7).

Risultati e conclusioni

Dai risultati preliminari emerge che l'olio essenziale di menta di Pancalieri esercita una buona attività *in vitro* nei confronti di ceppi sia di *Candida spp.* che di non-*Candida spp.* In generale, le MIC si attestano su di un range di valori omogenei tra le varie specie fungine analizzate, pari a 0,25-1 % v/v, mentre le MFC risultano essere generalmente sovrapponibili o al più superiori di una sola diluizione rispetto alla MIC, indicando che l'olio essenziale di menta di Pancalieri esercita un'azione di tipo fungicida. Inoltre, merita sottolineare che l'olio essenziale di menta di Pancalieri è risultato molto efficace nell'inibire la crescita *in vitro* di *C.neoformans*, lievito capsulato, in quanto sono stati registrati valori di MIC inferiori a quelli ottenuti per i ceppi sopra menzionati, pari a 0,06-0,125% v/v, e valori di MFC nuovamente sovrapponibili alle MIC. Nel caso specifico di *Candida spp.*, recenti dati sperimentali correlano questa significativa attività antifungina dell'olio essenziale *Mentha x piperita* L. ad un'azione inibente diretta sulla biosintesi di ergosterolo cellulare, con un meccanismo analogo a quello degli azoli (3). Per quanto riguarda l'attività antimicotica

dell'olio essenziale di menta di Pancalieri nei confronti dei funghi dermatofiti, i risultati ottenuti evidenziano una buona attività *in vitro* di tipo fungistatico, con valori di MIC interessanti, sia dopo 3 (0,125% v/v) che 7 (range 0,5-1% v/v) giorni di incubazione. Infine, dai test di sinergia effettuati si rileva l'esistenza di una significativa interazione sinergica sia nel caso dell'associazione olio essenziale di menta di Pancalieri-itraconazolo vs. *C.neoformans* ($FICI=0,38$), sia nel caso dell'associazione olio essenziale di menta di Pancalieri-itraconazolo/ketoconazolo vs. *T.mentagrophytes* ($FICI=0,37$). Nel complesso, i buoni risultati preliminari ottenuti con i test sia di sensibilità *in vitro* che di sinergia con gli antimicotici di sintesi, sembrano essere decisamente incoraggianti, suggerendo la necessità di effettuare ulteriori studi per avvalorare l'impiego dell'olio essenziale di menta di Pancalieri come possibile adiuvante nella terapia delle infezioni fungine.



Bibliografia

1. Uribe E, Marin D, Vega-Galvez A, Quispe-Fuentes I, Rodriguez A. Assessment of vacuum-dried peppermint (*Mentha piperita* L.) as a source of natural antioxidants. *Food Chem* 2016.1;190:559-65.
2. McKay DL, Blumberg JB. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytother Res* 2006. 20(8):619-33.
3. Samber N, Khan A, Varma A, Manzoor N. Synergistic anti-candidal activity and mode of action of *Mentha piperita* essential oil and its major components. *Pharm Biol* 2015. 53(10):1496-504.
4. Saharkhiz MJ, Motamedi M, Zomorodian K, Pakshir K, Miri R, Hemyari K. Chemical Composition, Antifungal and Antibiofilm Activities of the Essential Oil of *Mentha piperita* L. *ISRN Pharm* 2012. 718645.
5. Ibrahim SY, Abd El-Salam MM. Anti-dermatophyte efficacy and environmental safety of some essential oils commercial and *in vitro* extracted pure and combined against four keratinophilic pathogenic fungi. *Environ Health Prev Med* 2015. 20(4):279-86.
6. Husain FM, Ahmad I, Khan MS, Ahmad E, Tahseen Q, Alshabib NA. Sub-MICs of *Mentha piperita* essential oil and menthol inhibits AHL mediated quorum sensing and biofilm of Gram-negative bacteria. *Front Microbiol* 2015. 6:420.
7. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 2003. 52(1):1.