

PRODUSE NATURALE CU ACȚIUNE ANTIMICROBIANĂ NATURAL PRODUCTS WITH ANTIMICROBIAL ACTIVITY

Iliora Oniga, Daniela Benedec, Anca Toiu, Daniela Hanganu

University of Medicine and Pharmacy «Iuliu Hatieganu» Cluj-Napoca

Rezumat. Compușii naturali reprezintă o alternativă importantă în tratamentul antiinfecțios, în contextul extinderii rezistenței microorganismelor patogene la acțiunea antibioticelor. Activitatea antibacteriană a acestor compuși se bazează pe diverse mecanisme: interferența în căile metabolice ale bacteriei prin inhibarea unor enzime, creșterea permeabilității membranei, împiedicarea formării de biofilm etc. Combinarea unor uleiuri volatile sau a unor componente ale acestora cu antibiotice reprezintă o strategie promițătoare în direcția combaterii rezistenței.

Pornind de la rezultatele unui număr mare de testări *in vitro*, se impune extinderea studiilor clinice care să confirme eficacitatea produselor naturale în tratamentul bolilor infecțioase.

Cuvinte cheie: antimicrobian, compuși naturali, ulei volatil.

Abstract. Natural compounds represent a major alternative in the treatment of infections, in the context of enlargement of the pathogenic microorganisms resistance. Antibacterial activity of these compounds is based on various mechanisms: interference in the metabolic pathways of bacteria by inhibiting the enzymes, increasing membrane permeability, preventing the biofilm formation etc. Combination of volatile oils or their major compounds with antibiotics represents a promising strategy to reduce antibiotic resistance. Using a large number of existing *in vitro* data, it is necessary to extend the clinical trials in order to confirm the efficacy of natural products to treat different infectious diseases.

Keywords: antimicrobial activity, natural compounds, volatile oil.

Introducere

Produsele naturale reprezintă o sursă importantă de materii prime cu acțiune antimicrobiană, cercetările actuale orientându-se tot mai mult spre descoperirea de noi agenți antiinfecțioși. Acest interes crescut pentru găsirea unor alternative terapeutice în tratamentul infecțiilor a fost determinat de extinderea rezistenței microorganismelor patogene la acțiunea antibioticelor cunoscute, mai ales datorită utilizării excesive a antibioterapiei (nu întotdeauna necesară). Antibio rezistența a fost declarată de European Center for Disease Control ca fiind una din problemele majore din domeniul sănătății, mecanismele de adaptare ale microorganismelor fiind din ce în ce mai complexe [1]. Bacteriile pot dobândi rezistență prin modificarea țintei de acțiune a antibioticului, prin distrugerea directă sau modificarea structurii antibioticului sub acțiunea unor enzime, prin efluxul antibioticelor din celulă, prin formarea de biofilm pe substratul tisular, intact sau alterat, sau chiar pe suprafața unor biomateriale medicale, cu inducerea rezistenței prin lipsa de penetrabilitate a antibioticelor în biofilm [1].

Cercetările efectuate asupra extractelor naturale au arătat că acestea conțin compuși care pot acționa împotriva agenților microbieni, prin diferite mecanisme: blocarea aderenței microorganismelor la anumite nivele celulare, cu rol în profilaxia infecțiilor; deteriorarea membranei celulare cu favorizarea pierderii de electroliți și conținut celular, determinând moartea celulei microbiene; inhibarea unor enzime care intervin în căile metabolice ale agentului patogen, cu scăderea virulenței; inhibarea sintezei de metaboliți esențiali (aminoacizi, acizi

grași); inhibarea replicării și transcripției acizilor nucleici; stimularea sistemului imunitar, a activității fagocitare și a celulelor imunocompetente etc. [2]

Studii recente au evidențiat existența unor compuși naturali capabili să reducă riscul de apariție a rezistenței, prin împiedicarea formării de biofilm, prin blocarea procesului de semnalizare intercelulară (quorum sensing), rezultate promițătoare obținându-se la asocierea substanțelor de origine naturală cu antibiotice. Astfel, intercalarea derivaților catechinici din ceaiul verde (*Thea sinensis*) în membrana citoplasmatică de *S. aureus*, inclusiv *S. aureus* metilino-rezistent (MRSA), a împiedicat formarea de biofilm și a reversat sensibilitatea la beta-lactamine a tulpinilor de MRSA izolate clinic, determinând creșterea sensibilității la oxacilină [3]. Ajoen-ul este un compus sulfurat din usturoi, care prezintă activitate de inhibare a semnalizării intercelulare (QSI), asocierea cu tobramicina determinând un efect sinergic asupra tulpinilor de *P. aeruginosa* [1].

Structurile chimice ale compușilor naturali cu potențial antimicrobian sunt foarte variate, cele mai multe studii în această direcție fiind realizate asupra uleiurilor volatile, a compușilor polifenolici (flavonoide, taninuri) și terpenici (saponine, steroide, carotenoide).

Acțiunea antimicrobiană a uleiurilor volatile

Numeroase studii *in vitro* au demonstrat acțiunea antimicrobiană a uleiurilor volatile, acestea acționând în principal prin destabilizarea membranei celulare, denaturarea proteinelor plasmactice și inactivarea unor enzime bacteriene. Compușii lipofili din compoziția ulei-

iurilor volatile interacționează cu polizaharidele, acizii grași și fosfolipidele din structura membranei celulare, aceasta devine mai permeabilă, determinând pierderea de constituenți celulari și moartea bacteriei. În cele mai multe studii, bacteriile Gram-pozitive s-au dovedit mai rezistente la acțiunea uleiurilor volatile, decât bacteriile Gram-negative [4].

S-a constatat în urma a numeroase studii *in vitro*, că cei mai activi compuși din uleiurile volatile sunt fenolii (timolul, carvacrolul, eugenolul), aldehidele (citrulul, aldehida cinamică), alcoolii terpenici (terpineolul). Cele mai active uleiuri volatile s-au dovedit a fi cele de *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Melaleuca alternifolia*, *Cinnamomum sp.*, *Eugenia caryophyllata*, *Eucalyptus globulus* ș.a. [5].

Mai multe testări *in vitro* ale uleiurilor volatile au evidențiat o activitate antibacteriană comparabilă cu a unor antibiotice testate în aceleași condiții, uneori fiind chiar superioară. Exemple în acest sens sunt redate în tabelul 1 [6].

Testări ale componentelor uleiurilor volatile au arătat că, de exemplu, carvacrolul acționează specific asupra unor tulpini de *Staphylococcus aureus* și *S. epidermidis*, împiedicând formarea de biofilm. Geraniolul a arătat o bună activitate privind modularea rezistenței pentru câteva bacterii Gram-negative (*Enterobacter aerogenes*, *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), prin inhibarea mecanismelor de eflux, efectele fiind mai evidente la asocierea cu cloramfenicol, beta-lactamine și fluorochinolone [4].

Combinarea unor uleiuri volatile sau a unor componente ale acestora cu antibiotice reprezintă o strategie promițătoare în direcția combaterii rezistenței și a reducerii dozei terapeutice de antibiotic. Astfel, s-a constatat o activitate antibacteriană sinergică la asocierea uleiului volatil de *Pelargonium graveolens* cu norfloxacină și respectiv cu gentamicina asupra speciilor bacteriene *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Escherichia coli* și *Staphylococcus aureus*, iar uleiul volatil din frunze de *Croton zehntneri* a potențat activitatea gentamicinei asupra bacteriei *Pse-*

udomonas aeruginosa. Asocierea uleiului volatil de ore-gano cu fluorochinolone, doxiciclină sau lincomicină a condus la efecte sinergice asupra *E.coli*. Alte raportări au evidențiat efecte sinergice la asocierea uleiului volatil de rosmarin cu ciprofloxacina asupra *Klebsiella pneumoniae*, a uleiului volatil de lămâi cu amikacina asupra *Acinetobacter spp.* sau a uleiului volatil de coriandru asociat cu cloramfenicol, ciprofloxacina, gentamicina sau tetraciclină asupra *Acinetobacter baumannii* [7].

Uleiul volatil de eucalipt, cel de tea tree (*Melaleuca alternifolia*) și timolul, au demonstrat o acțiune sinergică la asocierea cu clorhexidină digluconat împotriva biofilmului unor tulpini de *S. epidermidis*, reducând astfel riscul infecțiilor asociate cu utilizarea dispozitivelor medicale. *S. epidermidis* este frecvent cauza unor infecții nosocomiale, datorită capacității de aderare, sub formă de agregate încorporate în biofilm, devenind astfel rezistent la acțiunea unor agenți dezinfectanți sau antibacterieni. Enterococii vancomicino-rezistenți, o altă cauză a infecțiilor nosocomiale, au fost inhibați *in vitro* de către uleiuri volatile de eucalipt, lămâi, portocale și bergamot. Mecanismul de acțiune a avut la bază distrugerea membranei și a homeostaziei celulare, determinând moartea bacteriei [4].

Prin asocierea unor componente din uleiuri volatile cu doxiciclina, s-a observat efectul sinergic împotriva unor bacterii Gram negative (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*). Pentru o mai bună administrare și pentru a proteja compușii lipofili, eugenolul, carvacrolul și aldehida cinamică au fost incluse în nanocapsule lipidice. În urma asocierii cu doxiciclina, valorile CMI au scăzut de 2 până la 4 ori, cele mai bune efecte fiind observate asupra *E. coli* și *A. baumannii*. Componentele lipofile ale uleiurilor volatile au degradat membrana celulară și au determinat pierderea de ioni și molecule, urmată de moartea bacteriei. Uleiurile volatile au favorizat creșterea concentrației de doxiciclină în celulă prin diferite mecanisme (facilitând pătrunderea prin membrana alterată și împiedicând eliminarea sa din

Tabel 1. Activitatea antibacteriană a unor uleiuri volatile

Specia medicinală	Bacterii Gram-pozitive	Bacterii Gram-negative	Activitate antibacteriană
<i>Thymus vulgaris</i> , <i>Eucalyptus globulus</i> (uv)	MRSA, <i>S. aureus</i>	-	> vancomicina, metilina, cloramfenicol, gentamicina (MRSA)
<i>Origanum vulgare</i> , <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Eugenia caryophyllata</i> (uv)	-	<i>E. coli</i>	Oregano>cimbru>cuișoare
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> (EE 50%, uv)	<i>Bacillus sp.</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella sp.</i>	ulei >extract
<i>Melissa officinalis</i> – (uv)	<i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>K.pneumoniae</i> , <i>S. enterica</i>	acțiune intensă ~ ampicilina (<i>S. aureus</i>) > ac. nalidixic (<i>P. aeruginosa</i>)

Legendă: > = acțiune superioară, > = acțiune inferioară, ~ = acțiune echivalentă
EE – extract etanolic; uv – ulei volatil;

celulă), ceea ce ar putea explica efectul lor sinergic. Atât efectul bactericid al uleiurilor volatile cât și sinergismul de acțiune cu antibioticele au fost confirmate prin mai multe tehnici; prin microscopie electronică s-a observat dezintegrarea peretelui celular bacterian și eliminarea conținutului celular [8].

Cele mai multe studii care au evaluat activitatea antimicrobiană a uleiurilor volatile s-au realizat *in vitro*, testărilor clinice fiind mult mai reduse. În acest sens, substanțe izolate din uleiuri volatile au fost încorporate în forme farmaceutice destinate aplicării externe – creme, loțiuni, soluții, sau au fost incluse în lipozomi – pentru tratamentul infecțiilor cutanate sau în scop cosmetic, iar altele se utilizează sub formă de soluții pentru inhalării în cadrul infecțiilor respiratorii. Studii mai recente au demonstrat acțiunea uleiurilor volatile ca agenți care favorizează pătrunderea antisepticelor în celule, crescând astfel activitatea lor antimicrobiană, inclusiv asupra unor specii rezistente. O eventuală administrare orală a uleiurilor volatile trebuie însă să țină cont de riscul toxic pe care îl pot dezvolta unele componente (în special cetonele monoterpenice, fenolii) [4].

Cele mai multe studii clinice care folosesc uleiuri volatile sunt orientate spre utilizarea topică, la nivel cutanat sau pe mucoase. Uleiul volatil de *Melaleuca alternifolia* (tea-tree oil) este cunoscut pentru potențialul său antimicrobian, având un spectru larg de acțiune, datorat în principal componentei sale majoritare, un alcool monoterpenic denumit terpinen-4-ol. Studii *in vitro* au demonstrat activitatea uleiului de tea-tree asupra tulpinilor de *Propionibacterium acnes*, o bacterie implicată în unele forme de acnee. Nu există date care să ateste mecanismul de acțiune al uleiului volatil de tea-tree, dar se presupune o posibilă afectare a biofilmului format de *P. acnes*, în analogie cu constatarea acestui mecanism în cazul testării pe *Staphylococcus aureus*. Un studiu statistic realizat on-line a arătat că preparatele cu ulei volatil de tea-tree se folosesc frecvent în tratamentul local al acneei (cauzată de prezența bacteriei *P. acnes*), pentru acțiunea antibacteriană și antiinflamatoare [9]. Mai multe studii clinice au urmărit eficacitatea acestui ulei volatil (sub formă de gel 5%) în tratamentul local al acneei ușoare și medii, timp de 4-8 săptămâni, constatându-se o diminuare a numărului de leziuni inflamatorii cu 23-62%. Rezultatele au fost comparabile cu cele obținute în tratamentul local cu peroxid de benzoil (gel 2,5-5%), respectiv cu eritromicină (gel 2%), în unele cazuri fiind semnificativ mai bune comparativ cu un placebo. Efectele secundare au fost cele caracteristice tratamentului topic antiacneic (prurit, descumare, senzație de arsură, înroșirea și uscarea pielii etc.), cu o rată de manifestare mai scăzută în cazul utilizării preparatelor cu ulei volatil [9].

Un alt studiu a urmărit efectele unor preparate de uz local cu ulei volatil de *Ocimum gratissimum* în diferite concentrații (0,5%, 1%, 2% și 5%), comparativ cu un pre-

parat cu peroxid de benzoil 10% și respectiv cu placebo, la pacienți cu acnee, timp de 4 săptămâni. Preparatul recomandat pentru tratamentul acneei, pe baza rezultatelor obținute, a fost cel cu 2% ulei volatil în cetomacrogol, luând în considerare eficiența terapeutică și efectele secundare mai reduse [10].

Acțiunea antimicrobiană a produselor naturale cu compuși polifenolici

Principiile active din clasa polifenolilor sunt larg răspândite în plante, fiind valorificate în terapie pentru o gamă foarte largă de proprietăți. Dintre acestea, o bună activitate antimicrobiană au arătat derivații benzenici de tip fenol, flavonoidele, unele taninuri, derivații de acid cafeic etc.

Frunzele de *Arctostaphylos uva-ursi* (familia *Ericaceae*), strugurii ursului și frunzele de *Vaccinium vitis-idaea* (familia *Ericaceae*), merișor, conțin derivați de hidrochinonă (arbutozidă, metilarbutozidă), taninuri, proantocianidoli, glicozide flavonoidice, triterpene pentaciclice [11, 12]. *Arbutozida și derivații se hidrolizează la hidrochinonă, care este compusul activ cu acțiune antibacteriană demonstrată pe bacterii din genurile Escherichia, Enterobacter, Klebsiella, Proteus, Staphylococcus, Pseudomonas, Citrobacter. Extractul de Uvae ursi folium s-a dovedit mai eficient decât arbutozida izolată, prezentând proprietăți antiseptice și astringente, cu aplicații în tratamentul infecțiilor urinare [11]. Fructele unor specii de Vaccinium (V. macrocarpon, V. corymbosum, V. myrtillus, V. oxycoccus) conțin proantocianidine oligomere care acționează indirect, prin mecanism antiadeziv fimbriar, împiedicând aderarea bacteriilor de mucoasa vezicii urinare, mai ales împotriva tulpinilor de E. coli. Numeroase studii au dovedit eficiența terapeutică a extractelor obținute din fructele de V. macrocarpon (cranberry), mai bogate în proantocianidoli de tip A decât alte fructe de Vaccinium sp. [11, 12, 13]. Sucul din fructe de V. macrocarpon administrat femeilor însărcinate a determinat o reducere semnificativă statistic a frecvenței de apariție a infecțiilor urinare și a bacteriuriei asimptomatice. Monitorizarea siguranței administrării acestor fructe a arătat absența reacțiilor adverse, produsul fiind astfel recomandat în prevenirea infecțiilor urinare din timpul sarcinii și la femeile care alăptează [14].*

Propolisul are acțiune bacteriostatică și bactericidă bazată pe inhibarea motilității bacteriei, inhibarea activității unor enzime bacteriene și afectarea permeabilității membranei citoplasmatică. De exemplu, galangina și acidul cafeic din propolis inhibă creșterea și proliferarea bacteriilor prin mecanisme de inhibare enzimatică, flavonoidele afectează potențialul de membrană și pot cauza alterarea permeabilității membranei celulare bacteriene [15]. Numeroase studii susțin faptul că propolisul este mai activ pe bacteriile Gram-pozitive (*S. aureus*, *Enterococcus sp.* și *B. cereus*) și mai puțin activ (parțial pe *P.*

aeruginosa, *E. coli*) sau chiar inactiv (*K. pneumoniae*) pe cele Gram-negative. Mai multe studii au raportat o activitate sinergică semnificativă a propolisului la asocierea cu diferite antibiotice, inclusiv asupra tulpinilor rezistente la benzilpenicilină, tetraciclină și eritromicină, ceea ce poate constitui o alternativă în prevenirea și contracararea rezistenței bacteriene [16].

Eficacitatea antibacteriană a propolisului a fost urmărită și clinic, majoritatea studiilor fiind focalizate pe utilizarea locală, cu predilecție în stomatologie și afecțiuni ORL. Diversitatea și complexitatea compoziției chimice a propolisului creează însă dificultăți în ceea ce privește standardizarea preparatelor, elucidarea mecanismelor de acțiune și interpretarea rezultatelor.

Cercetări recente au sugerat că fitoterapia poate contribui favorabil în tratamentul infecției cu *Helicobacter pylori*, un potențial ulcerogen. În acest sens s-au raportat o serie de specii, extracte purificate sau compuși izolați (cvercitol, catechine, izoflavone etc.) cu acțiune anti-*H. pylori* determinată *in vitro* [17]. Creșterea rezistenței *H. pylori* la antibiotice (claritromicină, amoxicilină, metronidazol, levofloxacină) și reacțiile adverse ale acestora, justifică încercările de a descoperi tratamente alternative

bazate pe utilizarea unor resurse naturale. Dintre acestea, cele mai studiate au fost: semințele de *Nigella sativa*, uleiul de măsline, inflorescențele de brocoli, afinele, propolisul, curcuma, usturoiul, ceaiul verde, pentru care acțiunea anti-*H. pylori* a fost confirmată *in vitro*, *in vivo* pe animale de laborator și uneori clinic [18].

Concluzii

Existența unui număr mare de studii care au demonstrat efectele antibacteriene *in vitro* ale multor extracte din plante sau uleiuri volatile, arată că acestea reprezintă o sursă importantă de materii prime care pot fi valorificate în terapia antiinfecțioasă. Există însă mult mai puține studii clinice care să confirme eficacitatea acestor produse naturale în tratamentul bolilor infecțioase și aceasta poate să fie o direcție de interes pentru cercetarea farmaceutică actuală. Pentru ca rezultatele să fie reproductibile, este foarte important ca în aceste studii să fie bine definiți anumiți parametri, cu referire la materia primă, identificarea corectă a materialului vegetal, tehnicile utilizate pentru extracție și prelucrare, concentrația de principii active.

Bibliografie

- Lazăr V, Colța T, Măruțescu L, Dițu L-M, Chifiriuc MC. New antiinfectious strategy based on antimicrobial and quorum sensing inhibitors from vegetal extracts and propolis. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education, 2014, Vol II, A. Méndez-Vilas, Ed. Formatec, 1209-1219
- Dhama K, Tiwari R, Chakraborty S, Saminathan M, Kumar A, Karthik K, et al. Evidence based antibacterial potentials of medicinal plants and herbs countering bacterial pathogens especially in the era of emerging drug resistance: an integrated update. *International Journal of Pharmacology* 2014; 10(1):1-43.
- Taylor PW. Alternative natural sources for a new generation of antibacterial agents. *Int J Antimicrob Agents* 2013;42(3):195-201.
- Solórzano-Santos F, Miranda-Novales MG. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol*. 2012;23(2):136-41.
- Raut JS, Karuppaiyl SM. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products* 2014, 62: 250–264
- Abdallah EM. Plants: An alternative source for antimicrobials. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2011, 1(6): 16-20.
- Yap PS, Yiap BC, Ping HC, Lim SH. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *The Open Microbiology Journal*. 2014, 8: 6-14.
- Valcourt C, Saulnier P, Umerska A, Zanelli MP, Montagu A, Rossines E, et al. Synergistic interactions between doxycycline and terpenic components of essential oils encapsulated within lipid nanocapsules against gram negative bacteria. *Int J Pharm*. 2016 10;498 (1-2):23-31.
- Hammer KA. Treatment of acne with tea tree oil (melaleuca) products: a review of efficacy, tolerability and potential modes of action. *Int J Antimicrob Agents*. 2015 Feb;45(2):106-10
- Martin KW, Ernst E. Herbal medicines for treatment of bacterial infections: a review of controlled clinical trials. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51(2):241-6.
- Hăncianu M, Stănescu U, Aprotosoiaie C. *Bazele farmaceutice, farmacologice și clinice ale fitoterapiei*. Vol. 3, Iași: Ed. Gr. T. Popa, 2008.
- Patel A, Shenouda N, Tallis G. PDR for Herbal Medicines. Ed.4, Montvale: Ed. Thomson Healthcare, 2007
- Head KA. *Natural approaches to prevention and treatment of infections of the lower urinary tract*. *Altern Med Rev* 2008; 13(3):227-44.
- Dugoua JJ, Seely D, Perri D, et al. Safety and efficacy of cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) during pregnancy and lactation. *Can J Clin Pharmacol* 2008;15:e80-e86
- Wojtyczka RD, Dziedzic A, Idzik D, Kępa M, Kubina R, Kabała-Dzik A, et al. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* clinical isolates to propolis extract alone or in combination with antimicrobial drugs. *Molecules*, 2013, 8(8): 9623-9640
- Bogdanov S. Propolis: Composition, health, medicine: A review. *Bee product science*, 2015, www.bee-hexagon.net. (aprilie 2016)
- Safavi M, Sabourian R, Foroumadi A. Treatment of *Helicobacter pylori* infection. *World J Clin Cases* 2016, 4(1):5-19.
- Murali MR, Naveen SV, Son CG, Raghavendran HRB. Current knowledge on alleviating *Helicobacter pylori* infections through the use of some commonly known natural products: bench to bedside. *Integr Med Res* 2014, 3: 111–118.