

Attività antibatterica di oli essenziali verso microrganismi patogeni

Paola Mattarelli

Dip.to di Scienze e Tecnologie Agroalimentari,
Università di Bologna
Viale G. Fanin 44, Bologna



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA DI BOLOGNA

OPEN DAY

**La Medicina Veterinaria
incontra la Fitoterapia**

Evento di promozione del Master di II° livello in Fitoterapia Veterinaria

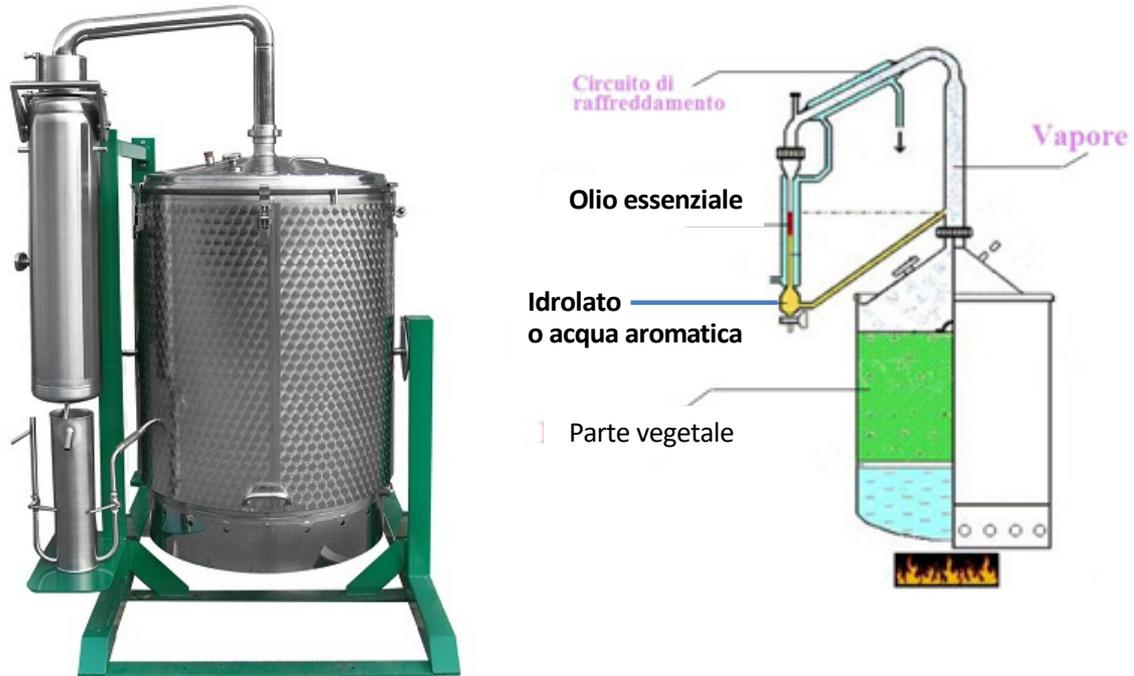
Imola, 12 dicembre 2023

Oli essenziali

“Miscela di composti organici differenti, ottenuti per distillazione in corrente di vapore di piante aromatiche o per spremitura dell’epicarpo (flavedo) dei frutti (esperidii) del genere *Citrus*”



Distillazione in corrente di vapore



Distillazione dell'olio essenziale di *Monarda didyma*



Distillazione in corrente di vapore di steli, foglie e fiori (ottobre).

Il tempo di distillazione è di circa 1 ora. La resa media è di circa 3-4 ml per Kg (0.3-0.4%) di pianta

L'olio essenziale viene conservato in bottiglie di vetro scuro (al riparo dalla luce) e a temperatura $<25\text{ }^{\circ}\text{C}$

Oli essenziali: chimica

- Gli O.E. sono una miscela molto complessa di composti organici
- Volatili alle temperature di distillazione, e lipofili
- A temperatura ambiente sono generalmente liquidi e poco viscosi (con eccezioni)
- Densità' < 1, indice di rifrazione elevato
- Insolubili quasi totalmente in acqua e solubili in olii e solventi organici
- Poco colorati ma con molte eccezioni (es. *Matricaria chamomilla*)



Componenti oli essenziali

■ Terpenoidi

◆ *Citrus sp.*, *Melaleuca alternifolia* (albero del te'), Conifere, *Myrtus communis*, *Matricaria recutita*, *Lavandula sp.*

Antiflogistici, antimicotici, eudermici, cicatrizzanti

■ Alcoli

◆ *Menta sp.*, *Pelargonium graveolens*, *Myrtus communis*, *Citrus aurantium*, *Rosmarinum officinalis*, *Origanum vulgare*, *Citrus sp.*, *Lavandula sp.*

Antimicrobici, antimicotici

■ Fenoli

◆ *Thymus vulgaris*, *Syzygium aromaticum*, *Origanum vulgare*

Antimicrobici maggiori

■ Ossidi

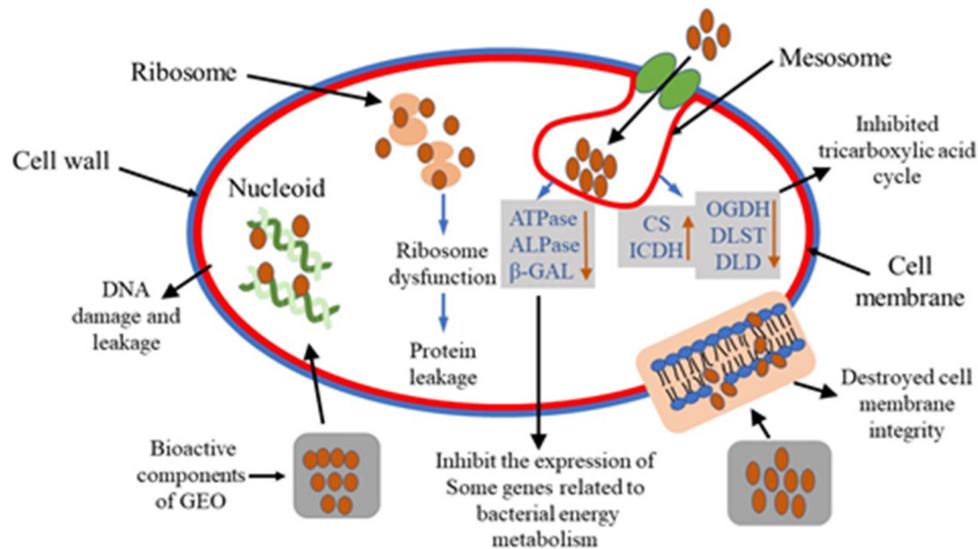
◆ *Eucalyptus sp.*, *Thymus vulgaris*, *Lavandula sp.*, *Melaleuca alternifolia*

Antivirali, antimicotici, balsamici

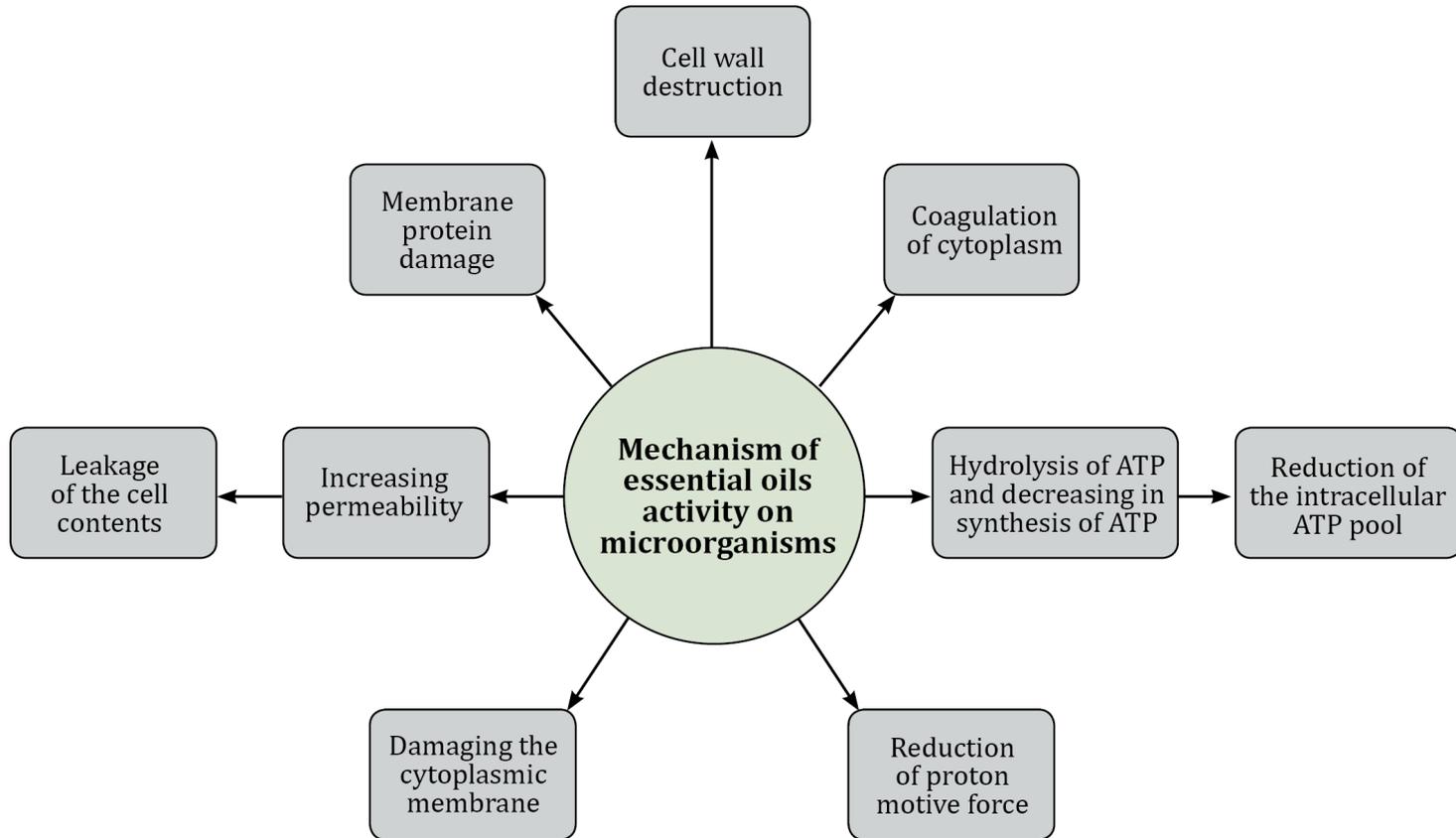


Attività antimicrobica

- Evidenze sperimentali *in vitro* ed *in vivo*
- Fenoli, alcoli, aldeidi aromatiche
- Agiscono a livello di membrana, parete cellulare e funzionalità cellulare
- Attività ad ampio spettro
- Scarsa propensione a fenomeni di resistenza
- Attività sinergica oli essenziali \leftrightarrow antibiotici sintetici



Meccanismi di azione degli oli essenziali



Meccanismi d'azione con danni sia strutturali sia funzionali agli organelli vitali batterici



Attività' spasmolitica/carminativa

- O.E. *Mentha x piperita* inibisce contrazioni muscolatura liscia intestinale
- *Mentha*, *Salvia officinalis* e *Rosmarinus officinalis* sono antispasmodici (*Mentha* specialmente a livello dell'ileo)
- Utili in sindromi infiammatorie intestinali (capsule gastroresistenti)

SNC

- Attività' ansiolitica di O.E. *Lavandula sp.* e di neroli (O.E. *Citrus aurantium* fiori)
- O.E. *Salvia officinalis* possibile anti acetilcolinesterasi (memoria) ma attenzione al chemotipo e ad effetti estrogenizzanti
- Attività' interessanti su memoria e cognizione da O.E. di *Rosmarinus* (CT 1,8 cineolo) e O.E. *Mentha x piperita*



Espettorante/mucolitica/balsamica

- O.E. *Eucalyptus globulus* (negli adulti e non asmatici),
Mentha x piperita, *Tymus officinalis* CT timolo
- O.E. *Lavandula* (broncodilatatrice)
- Tutti gli O.E antibatterici non irritanti

Chemotipi e chemotipizzazione

Variabilita' su base genetica con forte componente ambientale

Thymus vulgaris

- CT timolo/carvacrolo potente antibatterico ampio spettro, respiratorio
- CT geraniolo antibatterico ben tollerato, intestinale, urinario
- CT linalolo / α -terpineolo antibatterico-fungino, nelle mucose, antiflogistico
- CT *p*-cimene solo uso esterno, antidolorifico
- CT tujanolo antimicrobico, antivirale *Herpes s. e z.*



Thymus capitatus

- CT carvacrolo molto potente, di difficile gestione

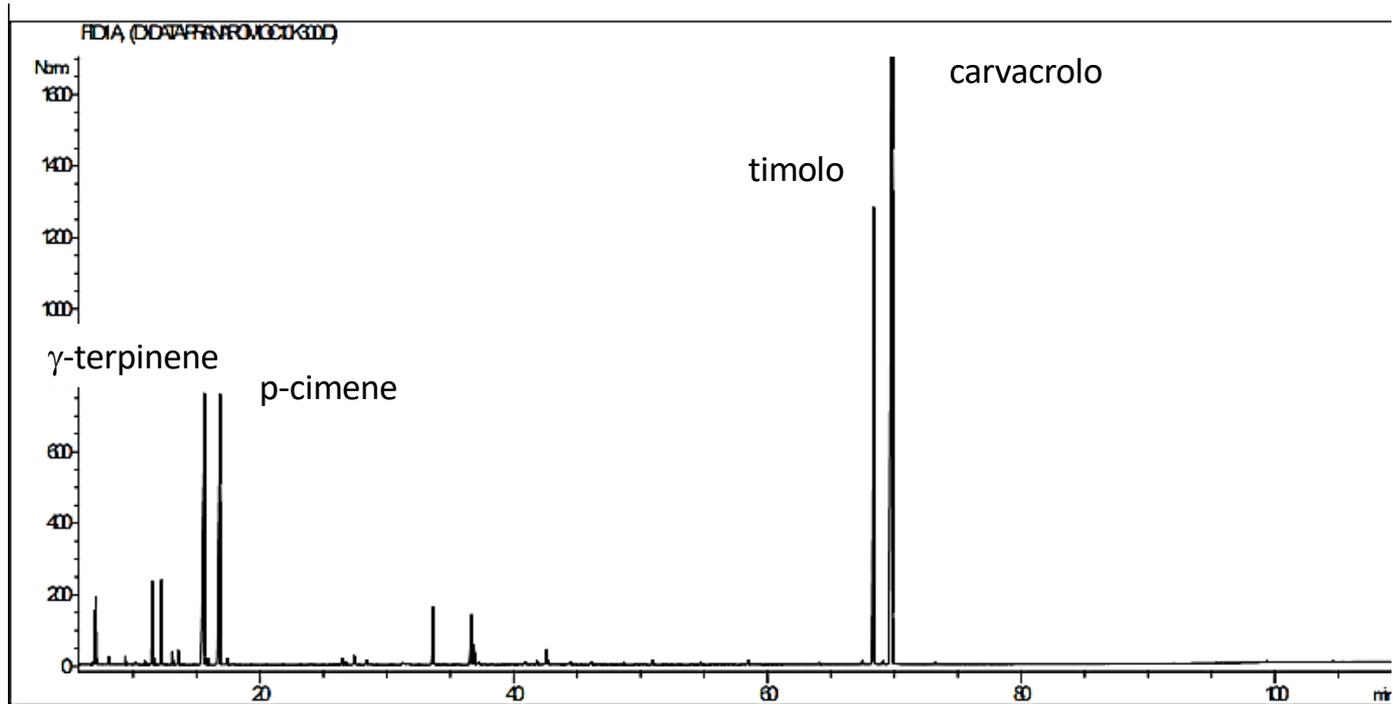


Rosmarinum officinalis

- CT canfora solo uso esterno, decontratturante muscolare
- CT verbenone drenante, antisteatotico, epatoprotettore
- CT 1,8 cineolo espettorante, mucolitico



Chemotipo: analisi gascromatografica

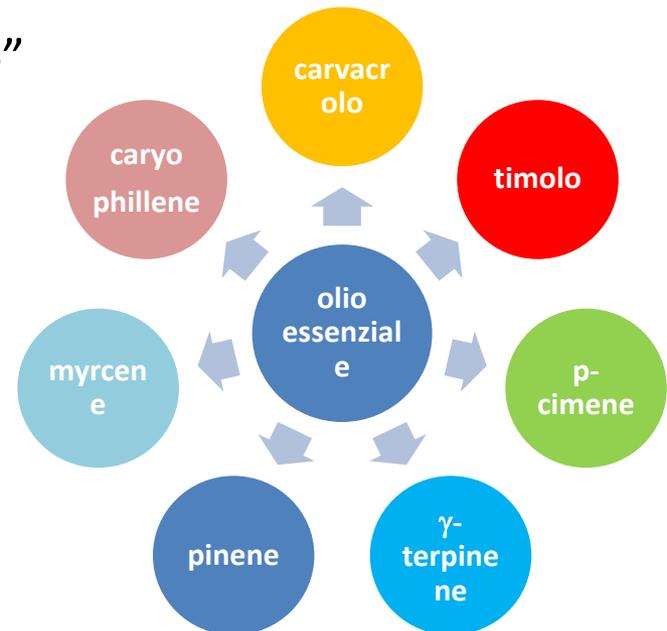


Gas cromatografia dell'olio essenziale di *Origanum compactum*



Fitocomplesso

- Fitocomplesso nel fitocomplesso
 - Insieme di tutte le componenti di una droga, responsabili complessivamente della attività terapeutica/biologica della pianta
- Azione sinergica delle varie componenti
 - The (teina e tannini)
- Difficoltà identificazione “principio attivo”



Composti natural-identici

Composti **natural-identici** sono di origine artificiale ma con la struttura chimica identica al composto/i maggiori presenti negli oli

Oli essenziali fitocomplesso con costituenti. maggiori e minori impossibile da ricostituire in laboratorio

Rischio: possibilità di selezione di antibiotico-resistenza nei microrganismi



Oli essenziali: tossicità

- Potenzialmente molto tossici:
 - *Artemisia absinthium* neurotossico
 - *Peumus boldus* neurotossico
 - *Acorus calamus* cancerogeno
 - *Cinnamomum camphora* cancerogeno, neurotossico
 - *Juniperus sabina* embriotossico, abortifacente
 - *Petroselinum crispum* epatotossico
 - *Tanacetum vulgare* neurotossico
 - *Thuia occidentalis* neurotossico
 - CT estragolo, CT pulegone, CT tujone, CT pinocanfone
- Fototossicità (furanocumarine; bergamotto, limetta, arancio, limone)
- Sensibilizzazione (limonene, pinene, aldeide cinnamica)
- Irritazione (fenoli, aldeide cinnamica)



CA22109 - Medicinal plants for animal health care: Translating tradition into modern veterinary medicine (MedPlants4Vet)

COST ACTION (Gruppo di lavoro europeo per l'individuazione del percorso per validare sostanze naturali (oli essenziali) per l'uso veterinario)

L'uso delle piante medicinali in veterinaria è storicamente parte indispensabile della domesticazione. A livello globale, esse sono ancora importanti per il controllo delle malattie animali. Tuttavia, sul mercato europeo attuale esistono solo **pochi prodotti veterinari a base di erbe registrati**.

Nonostante ciò, **la domanda di prodotti naturali che supportano la salute e il benessere degli animali sta aumentando nell'era post-antibiotica**. Questo è in linea con gli obiettivi dei piani d'azione nazionali e internazionali sulla resistenza antimicrobica e con il paradigma **One Health**, che si occupa non solo degli animali da allevamento, ma anche degli animali domestici che vivono in prossimità e contatto con i loro proprietari. I prodotti a base di erbe sono fondamentali nel raggiungere questi obiettivi.

Action Details

- MoU - 019/23
- CSO Approval date - 12/05/2023
- Start date - 12/10/2023
- End date - 12/10/2027



Working group of COST ACTION MedPlantVeterinary

1. Legal status of herbal veterinary medicinal products (HVMP) in Europe
Dr Michael WALKENHORST
2. Former and current registered HVMP in Europe
Dr Filip ŠTRBAC
3. European tradition of the use of medicinal plants to control animal diseases
Dr Smaragda SOTIRAKI
4. Safety, quality assurance, risk assessment and sustainability of HVMP
Dr Attila HUNYADI
5. Policy and stakeholder management
Dr Panagiota LIGDA



EMA (European Medicines Agency) equivalente FDA (Food and Drug Administration)

Valuta le evidenze scientifiche presenti

Definisce se sono validi e sufficienti per poter attribuire il claim di attività terapeutica alla preparazione (farmaco o integratore) che contengono quella sostanza

Esempi

Menta

Lavanda

Melaleuca (tea tree oil)





EUROPEAN MEDICINES AGENCY
SCIENCE MEDICINES HEALTH

15 January 2020
EMA/HMPC/522410/2013
Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC)

European Union herbal monograph on *Mentha x piperita* L., aetheroleum

Final – Revision 1

Initial assessment	
Discussion in Working Party on European Union monographs and European Union list (MLWP)	January 2007 March 2007 May 2007
Adoption by Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) for release for consultation	8 May 2007
End of consultation (deadline for comments)	15 August 2007
Re-discussion in MLWP	October 2007
Adoption by HMPC Monograph (EMA/HMPC/349466/2006) AR (EMA/HMPC/349465/2006) List of references (EMA/HMPC/199469/2007) Overview of comments received during the public consultation (EMA/HMPC/494410/2007) HMPC Opinion (EMA/HMPC/453712/2007)	31 October 2007



European Union herbal monograph on *Mentha x piperita* L., aetheroleum

1. Name of the medicinal product

To be specified for the individual finished product.

2. Qualitative and quantitative composition^{1, 2}

Well-established use	Traditional use
With regard to the marketing authorisation application of Article 10(a) of Directive 2001/83/EC <i>Mentha x piperita</i> L., aetheroleum (peppermint oil) i) Herbal substance Not applicable ii) Herbal preparation Essential oil	With regard to the registration application of Article 16d(1) of Directive 2001/83/EC <i>Mentha x piperita</i> L., aetheroleum (peppermint oil) i) Herbal substance Not applicable ii) Herbal preparation Essential oil

3. Pharmaceutical form

Well-established use	Traditional use
Herbal preparations in solid gastro-resistant dosage forms for oral use. Herbal preparations in liquid or semi-solid dosage forms for cutaneous use. The pharmaceutical form should be described by the European Pharmacopoeia full standard term.	Herbal preparations in liquid or solid dosage forms for oral and oromucosal use. Herbal preparations in liquid dosage forms for inhalation. Herbal preparations in liquid or semi-solid dosage forms for cutaneous or transdermal use. The pharmaceutical form should be described by the European Pharmacopoeia full standard term.

4. Clinical particulars

4.1. Therapeutic indications

Well-established use	Traditional use
Indication 1) Herbal medicinal product for the symptomatic relief of minor spasms of the gastrointestinal tract, flatulence and abdominal pain, especially in patients with irritable bowel syndrome. Indication 2) Herbal medicinal product for the symptomatic relief of mild tension type headache.	Indication 1) Traditional herbal medicinal product used for the relief of symptoms in coughs and colds. Indication 2) Traditional herbal medicinal product used for the symptomatic relief of localised muscle pain. Indication 3) Traditional herbal medicinal product used for the symptomatic relief of localised pruritic conditions in intact skin. The product is a traditional herbal medicinal product for use in specified indications exclusively based upon long-standing use.

4.2. Posology and method of administration

Well-established use	Traditional use
Posology Indication 1) Adolescents, adults and elderly 0.2–0.4 ml in solid gastro-resistant dosage forms.	Posology Indication 1) Inhalation Adolescents, adults and elderly



4.7. Effects on ability to drive and use machines

Well-established use	Traditional use
No studies on the effect on the ability to drive and use machines have been performed.	No studies on the effect on the ability to drive and use machines have been performed.

European Union herbal monograph on *Mentha x piperita* L., aetheroleum
EMA/HMPC/522410/2013

Page 8/12

4.8. Undesirable effects

Well-established use	Traditional use
<p>Indication 1)</p> <p>Urine and stools with an odour of menthol were observed; dysuria and inflammation of the glans of the penis have been reported. The frequency is not known.</p> <p>Allergic reactions to menthol were reported, with</p>	<p>Indication 1)</p> <p><u>Inhalation</u></p> <p>Apnoea, broncho- and laryngo-constriction in hypersensitive patients have been reported. The frequency is not known.</p>

5.2. Pharmacokinetic properties

Well-established use	Traditional use
<p>Indication 1)</p> <p>Menthol and other terpenic constituents of peppermint oil are fat-soluble and rapidly absorbed at the proximal small intestinal tract. To some extent, they are excreted in the form of glucuronides. The peak menthol urinary excretion levels were lower and secretion delayed with the modified-release preparations, compared with the immediate release preparations.</p> <p>In one clinical study with peppermint oil and one clinical study with menthol, some inhibition of CYP3A4 activity has been described.</p> <p>Indication 2)</p> <p>No data available.</p>	<p>Not required as per Article 16c (1)(a)(iii) of Directive 2001/83/EC.</p>

5.3. Preclinical safety data³

Well-established use	Traditional use
<p>Peppermint oil was negative in two <i>in vitro</i> genotoxicity tests, the Ames test, the mouse lymphoma assay and in the <i>in vivo</i> combined micronucleus/Comet assay (liver, kidney and bladder mucosa cells) in female rats.</p>	<p>Peppermint oil was negative in two <i>in vitro</i> genotoxicity tests, the Ames test, the mouse lymphoma assay and in the <i>in vivo</i> combined micronucleus/Comet assay (liver, kidney and bladder mucosa cells) in female rats.</p>

4.3. Contraindications

Well-established use	Traditional use
<p>Indication 1)</p> <p>Hypersensitivity to peppermint oil or menthol.</p> <p>Patients with liver disease, cholangitis, achlorhydria, gallstones and any other biliary disorders.</p> <p>Indication 2)</p> <p>Hypersensitivity to peppermint oil or menthol.</p>	<p>Indication 1, 2 and 3)</p> <p>Children under 2 years of age, because menthol can induce reflex apnoea and laryngospasm.</p> <p>Children with history of seizures (febrile or not).</p> <p>Hypersensitivity to peppermint oil or menthol.</p>

European Union herbal monograph on *Mentha x piperita* L., aetheroleum
EMA/HMPC/S22410/2013

Page 6/12

4.5. Interactions with other medicinal products and other forms of interaction

Well-established use	Traditional use
<p>Indication 1)</p> <p>Use of food or antacids administered at the same time could cause early release of the capsule content. Other medicinal products used to decrease stomach acid, such as histamine-2 blockers and proton pump inhibitors may cause premature dissolution of the enteric coating and should be avoided.</p> <p>Indication 2)</p> <p>None reported</p>	<p>None reported</p>

4.4. Special warnings and precautions for use

Well-established use	Traditional use
<p>Indication 1)</p> <p>The use in children under 8 years of age is not recommended due to a lack of data on safety and efficacy.</p>	<p>Indication 1)</p> <p><u>Oral and oromucosal use</u></p> <p>Patients who already suffer from heartburn or hiatal hernia, have sometimes an exacerbation of</p>

4.6. Fertility, pregnancy and lactation

Well-established use	Traditional use
<p>Indication 1)</p> <p>Safety during pregnancy and lactation has not been established. In the absence of sufficient data, the use during pregnancy and lactation is not recommended.</p>	<p>Safety during pregnancy and lactation has not been established. In the absence of sufficient data, the use during pregnancy and lactation is not recommended.</p> <p>No fertility data available.</p>

27 March 2012
EMA/HMPC/143181/2010
Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC)

Community herbal monograph on *Lavandula angustifolia* Miller, aetheroleum

Final

Discussion in Working Party on Community monographs and Community list (MLWP)	May 2010 July 2010 November 2010 January 2011
Adoption by Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) for release for consultation	27 January 2011
End of consultation	15 June 2011
Rediscussion in Working Party on Community monographs and Community list (MLWP)	September 2011 November 2011
Adoption by Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC)	27 March 2012



Community herbal monograph on *Lavandula angustifolia* Miller, aetheroleum

1. Name of the medicinal product

To be specified for the individual finished product.

2. Qualitative and quantitative composition^{1,2}

Well-established use	Traditional use
	<p>With regard to the registration application of Article 16d(1) of Directive 2001/83/EC as amended</p> <p><i>Lavandula angustifolia</i> Miller, aetheroleum (lavender oil)</p> <p>i) Herbal substance</p> <p>Not applicable.</p> <p>ii) Herbal preparations</p> <p>Essential oil obtained by steam distillation from the flowering tops of <i>Lavandula angustifolia</i> Miller</p>



3. Pharmaceutical form

Well-established use	Traditional use
	<p>Herbal preparation in liquid dosage form for oral use and as a bath additive.</p> <p>The pharmaceutical form should be described by the European Pharmacopoeia full standard term.</p>

4. Clinical particulars

4.1. Therapeutic indications

Well-established use	Traditional use
	<p>Traditional herbal medicinal product for relief of mild symptoms of mental stress and exhaustion and to aid sleep.</p> <p>The product is a traditional herbal medicinal product for use in the specified indication</p>



4.2. Posology and method of administration

Well-established use	Traditional use
	<p>Posology</p> <p><i>Adolescents, adults and elderly</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Oral use <p>Daily dose³: 20–80 mg</p> <ul style="list-style-type: none">• Use as bath additive <p>1 to 3 g per full bath once daily</p> <p>The use in children under 12 years of age is not recommended (see section 4.4 'Special warnings and precautions for use').</p>

Melaleuca alternifolia (Maiden & Bet.) Cheel “Tea-tree oil”

- Myrtaceae
- Originaria dell Australia orientale
- Cresce in zone umide
- L'olio essenziale e' ricavato dalle foglie
 - **terpinen-4-olo***
 - α -terpineolo
 - **γ -terpinene**
 - **α -terpinene**
 - 1-8 cineolo
- Battericida, eudermico, micocida; utile nelle onicomicosi, infezioni alte vie aeree, otiti esterne, cistiti, dermatofiti

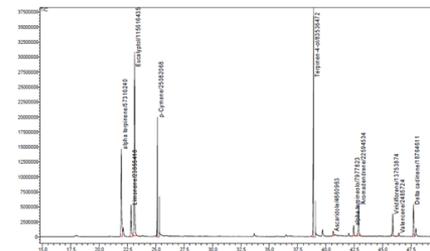


Fig.1



Individuare gli oli essenziali in base alle loro attività per il target di interesse

- In vitro attività ANTIMICROBICA verso i patogeni di interesse dell'animale target per saggiare la MIC e l'MBC. Es. mastite delle vacche: *Streptococcus epidermiditis*, *S. agalactiae*, *S. uberis*, *Staphilococcus aureus*
- Es. suinetti in svezzamento: *E. coli*, *Salmonella*
- In vitro attività ANTIBIOFILM verso i patogeni di interesse per saggiare la dose-risposta
- Es. acquacoltura: *Yersina ruckeri*, *Tenacibaculum*, *Pseudomonas anguillicola*
- In vitro attività ANTI QUORUM SENSING verso i patogeni di interesse per saggiare la dose-risposta
- Attività di SINERGISMO di più oli insieme o di antibiotici ed oli insieme mediante checkerboard



Casi studio

Oli essenziali - microbiota intestinale

Oli essenziali - patogeni, antibiotico resistenza e biofilm

Oli essenziali - acquacoltura



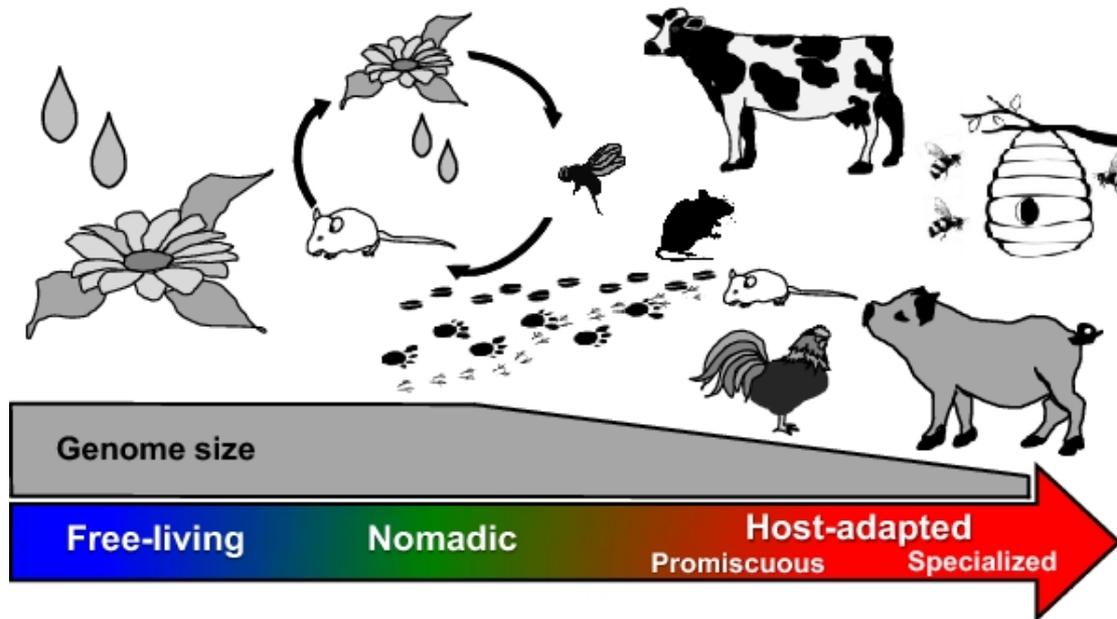
Oli essenziali e microbiota intestinale



Vicinanza degli oli essenziali all'uomo e agli animali

A causa del contatto con oli essenziali o con piante dell'ambiente naturale è ipotizzabile che si siano verificati eventi per cui il microbiota ha evoluto meccanismi per proteggersi dall'attività antimicrobica degli oli essenziali

Meccanismi tali per cui l'attività antimicrobica degli oli essenziali è possibile sia spostata verso i patogeni ma non verso quelli benefici



Animal Microbiome, Anatomy of Digestive tract and Diet

Insectivores Carnivores Nonruminant herbivores Ruminant herbivores Omnivores Humans

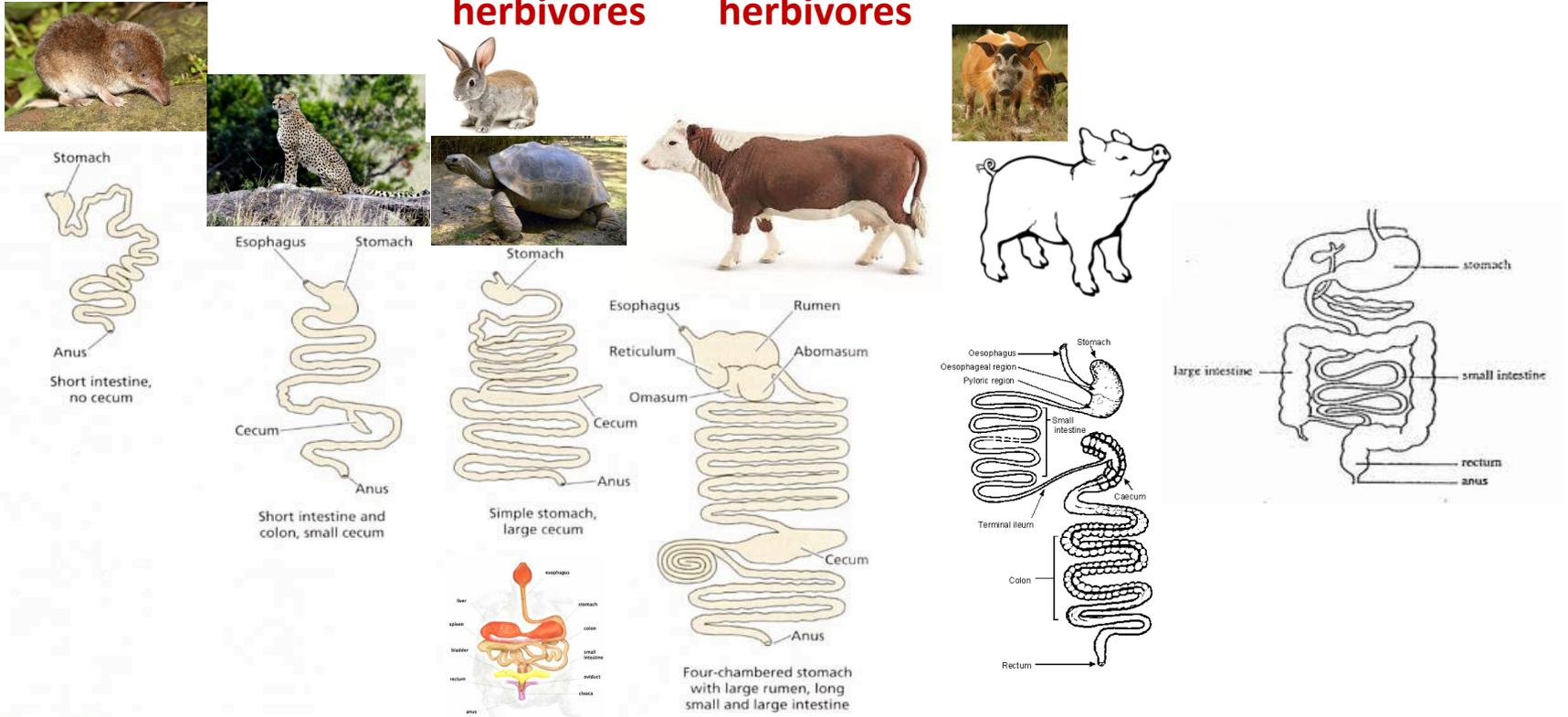
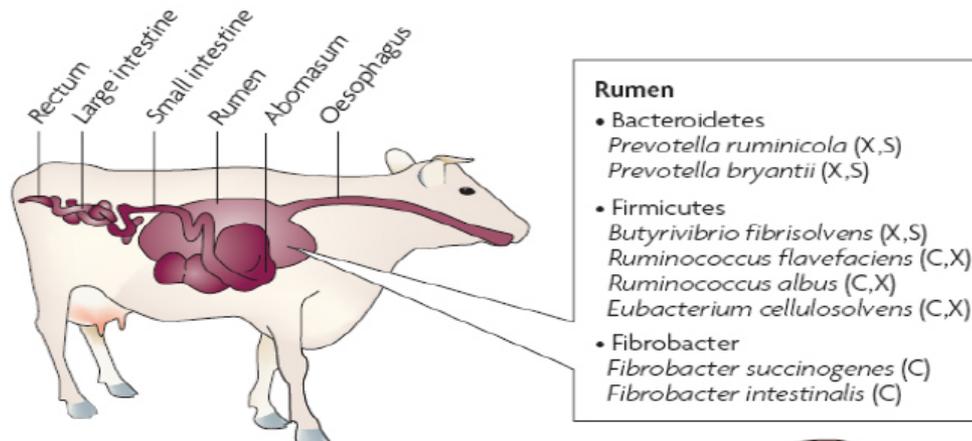


Figure 7.2 Digestive system. The digestive systems of mammals, illustrating the differences in morphology that correspond to different diets. Adapted from Hickman et al., 1995, Integrated Principles of Zoology, 10th ed., Wm. C. Brown Publishers.



Microbiota nei ruminanti

Gut microbiota has a powerful metabolic action in ruminants: herbivores derive 70% of their energy intake from *microbial breakdown* of dietary plant polysaccharides



HJ Flint et al. Nature Review Microbiol 2008 27

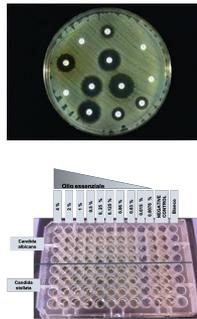


Infezione/
Patologia/
Stress
Terapia
antibiotici

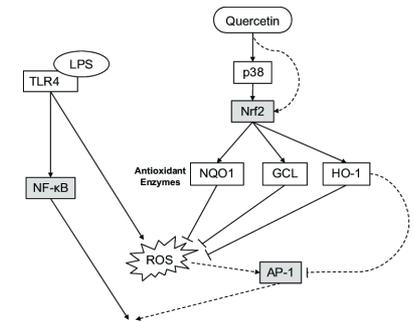


Oli essenziali: effetti sul microbiota intestinale

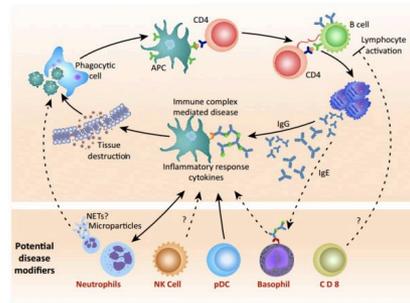
Proprietà antimicrobiche (microrganismi antibiotico resistenti) e antibiofilm



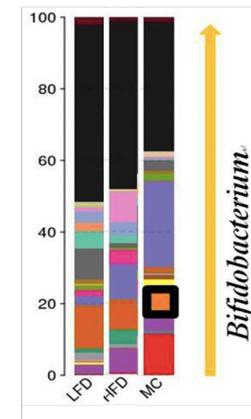
Proprietà antiossidanti



Proprietà antiinfiammatorie



Proprietà selettiva nella soppressione dei batteri patogeni e stimolazione dei batteri benefici



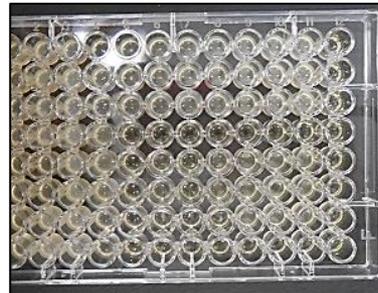
Attività antimicrobica differenziale di alcuni oli essenziali sul microbiota «benefico» e «potenzialmente patogeno» in animali e uomo



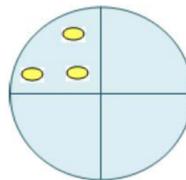
Valutazione dell'attività antibatterica

MIC = Minimal Inhibitory Concentration

Allestimento delle prove in microbrodo diluizioni secondo le linee guida EUCAST

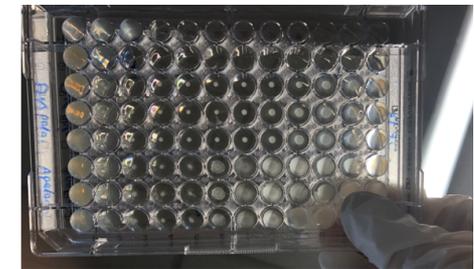


24 h (T24)
o 48 h (T48)



MIC

Valutazione dell'attività inibente la crescita dei batteri



MBC

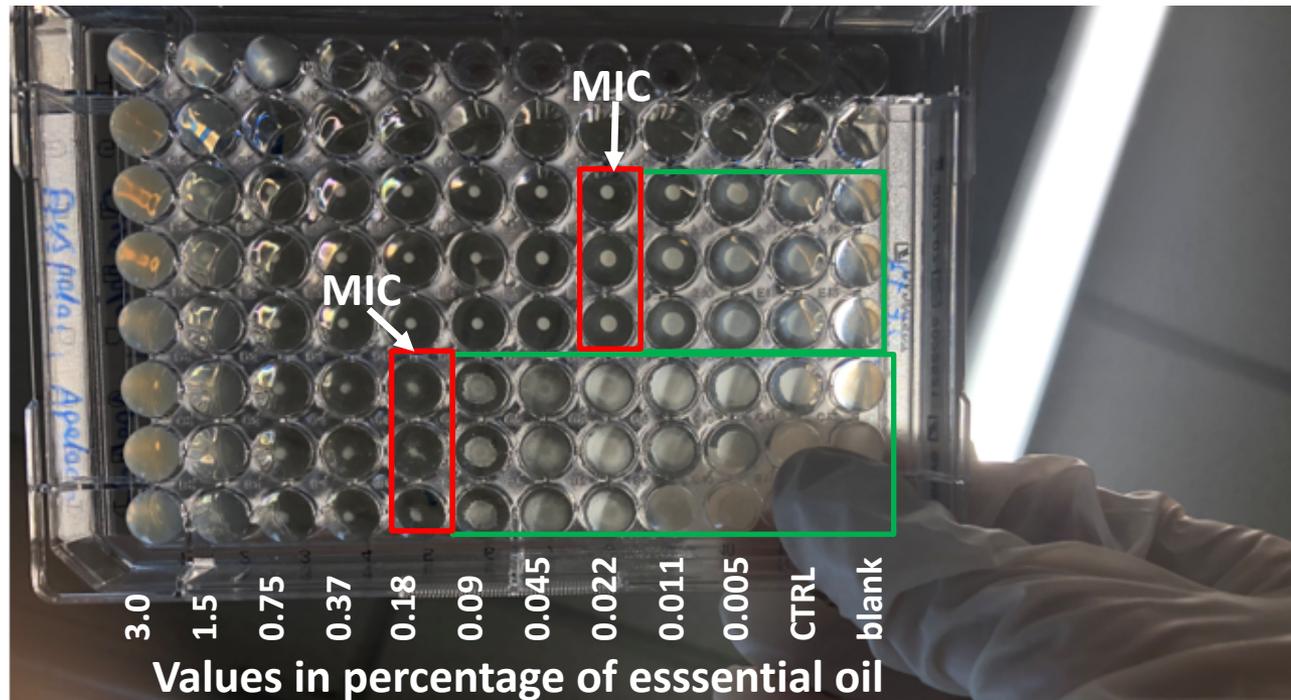
Valutazione dell'attività battericida



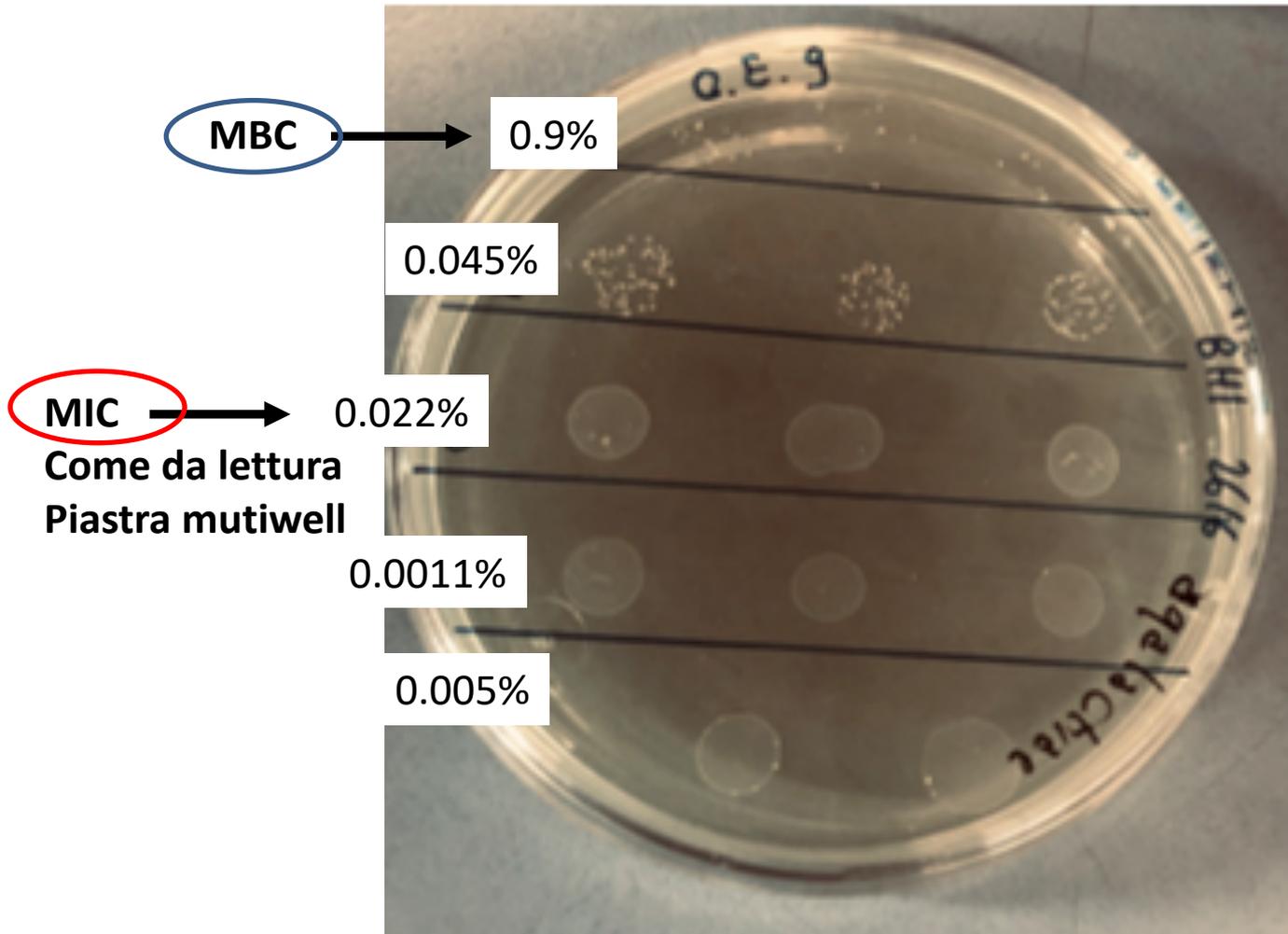
Esempio di MIC in microbrodo diluizione

Streptococcus agalactiae

Streptococcus dysgalactiae



Esempio di MBC in microbrodo diluizione



S. agalactiae

Oli essenziali e microrganismi benefici

		Oli Essenziali					
		<i>Monarda didyma</i>	<i>Monarda fistulosa</i>	<i>Satureja montana</i>	<i>Coridothymus capitatus</i>	<i>Origanum heracleoticum</i>	
<i>Bifidobacterium</i> sp.	<i>Bifidobacterium longum subsp. infantis</i>	Feci di neonato	2	1	1	2	2
	<i>Bifidobacterium longum subsp. lonum</i>	Feci di adulto	2	2	2	2	2
	<i>Bifidobacterium longum subsp. suis</i>	Feci di maiale	2	1	1	2	2
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Feci di neonato	1	2	1	2	2
	<i>Bifidobacterium breve</i>	Feci di neonato	1	1	2	2	2
	<i>Bifidobacterium thrrmacidophilum</i> (6 ceppi)	Feci di potamocero (suide)	2	1	2	2	2
	<i>Bifidobacterium sp.</i> (6 ceppi)	Feci di potamocero (suide)	2	1	1	2	2
<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Latte fermentato tradizionale	2	2	2	1	1
	<i>Lactobacillus casei</i>	Latte fermentato tradizionale	2	2	2	2	2
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Latte fermentato tradizionale	1	2	1	2	1
	<i>Saccharomyces. cerevisiae 14.3</i>	Feci uomo	2	2	2	1	1
<i>Saccharomyces</i> sp.	<i>S. cerevisiae 14.10</i>	Feci uomo	2	1	2	1	1
	<i>Saccharomyces boulardii 466</i>	Prodotto commerciale	2	1	2	2	2
	<i>S. boulardii</i>	Prodotto commerciale	2	1	2	2	2



Oli essenziali e microrganismi benefici

	Specie benefiche	Isolati da	Oli Essenziali				
			<i>Monarda didyma</i>	<i>Monarda fistulosa</i>	<i>Satureja montana</i>	<i>Coridothymus capitatus</i>	<i>Origanum heracleoticum</i>
Bifidobacterium sp.	<i>Bifidobacterium longum subsp. infantis</i>	Feci di neonato	2	1	1	2	2
	<i>Bifidobacterium longum subsp. lonum</i>	Feci di adulto	2	2	2	2	2
	<i>Bifidobacterium longum subsp.</i>					2	2
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>					2	2
	<i>Bifidobacterium breve</i>					2	2
	<i>Bifidobacterium thrrmacidoph</i> (6 ceppi)					2	2
	<i>Bifidobacterium sp.</i> (6 ceppi)					2	2
Lactobacillus sp.	<i>Lactobacillus plantarum</i>					1	1
	<i>Lactobacillus casei</i>	Latte fermentato tradizionale	2	2	2	2	2
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Latte fermentato tradizionale	1	2	1	2	1
	<i>Saccharomyces. cerevisiae 14.3</i>	Feci uomo	2	2	2	1	1
Saccharomyces sp.	<i>S. cerevisiae 14.10</i>	Feci uomo	2	1	2	1	1
	<i>Saccharomyces boulardii 466</i>	Prodotto commerciale	2	1	2	2	2
	<i>S. boulardii</i>	Prodotto commerciale	2	1	2	2	2

MIC = 1 - 2 %

Oli essenziali e microrganismi patogeni

Specie patogene	Isolati da	Oli Essenziali				
		<i>Monarda didyma</i>	<i>Monarda fistulosa</i>	<i>Satureja montana</i>	<i>Coridothymus capitatus</i>	<i>Origanum heracleoticum</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	Feci suino	0.5	0.5	0.25	0.5	0.5
<i>Escherichia coli</i>	Feci uomo	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
<i>Escherichia coli</i>	Feci suino	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
<i>Staphylococcus aureus</i>	Feci uomo	0.25	0.25	0.125	0.25	0.25
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>montevideo</i>	Carcassa broiler	ND	ND	ND	0.5	ND
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar. <i>thyphimurium</i> (6 ceppi)	Busto quaglia	ND	ND	ND	0.5	ND
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>infantis</i> (3 ceppi)	Sovrascarpe operatore broiler	ND	ND	ND	0.5	ND
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>agona</i>	Busto quaglia	ND	ND	ND	0.25	ND
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>blockley</i>	Sovrascarpe operatore broiler	ND	ND	ND	0.25	ND
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>derby</i>	Busto quaglia	ND	ND	ND	0.25	ND
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>kapemba</i>	Feci suino	ND	ND	ND	0.5	ND
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>kentucky</i>	Carcassa pulcino	ND	ND	ND	0.5	ND
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>kottbus</i>	Feci ovaiola	ND	ND	ND	0.5	ND
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>livingstone</i>	Carne fresca tacchino	ND	ND	ND	0.5	ND
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>ohio</i>	Feci ovaiola	ND	ND	ND	0.125	ND
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>tenesse</i>	Sovrascarpe operatore broiler	ND	ND	ND	0.125	ND



Oli essenziali e microrganismi patogeni

Specie patogene	Isolati da	Oli Essenziali				
		<i>Monarda didyma</i>	<i>Monarda fistulosa</i>	<i>Satureja montana</i>	<i>Coridothymus capitatus</i>	<i>Origanum heracleoticum</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	Feci suino	0.5	0.5	0.25	0.5	0.5
<i>Escherichia coli</i>	Feci uomo	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
<i>Staphylococcus aureus</i>	Feci uomo	0.25	0.25	0.125	0.25	0.25
<i>Escherichia coli</i>	Feci suino	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar montevideo	Carcassa broiler	ND	ND	ND	0.5	ND
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar. thyphimurium (0.5	ND
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar infantis (3 ceppi					0.5	ND
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar agona					0.25	ND
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar blockley					0.25	ND
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar derby					0.25	ND
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar kapemba					0.5	ND
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar kentuchy					0.5	ND
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar kottbus	Feci ovaiola	ND	ND	ND	0.5	ND
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar livingstone	Carne fresca tacchino	ND	ND	ND	0.5	ND
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar ohio	Feci ovaiola	ND	ND	ND	0.125	ND
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar tenesse	Sovrascarpe operatore broiler	ND	ND	ND	0.125	ND

MIC = 0.125 – 0.5 %



**Microrganismi
benefici**

**MIC = 1-2%
(10-20 mg/ml)**

**Microrganismi
patogeni**

**MIC = 0.125 – 0.5 %
(1.25-5 mg/ml)**

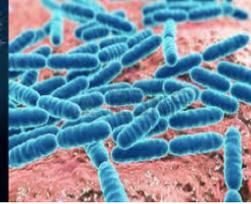
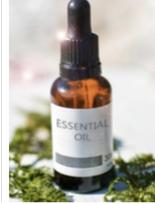


Essential oils have different effects on human pathogenic and commensal bacteria in mixed faecal fermentations compared with pure cultures

Dinesh Thapa,¹ Petra Louis,¹ Riccardo Losa,² Béatrice Zweifel²
and R. John Wallace¹

- Componenti dell'OE a date concentrazioni sono attive contro i patogeni nel piccolo intestino ma non inibiscono i batteri benefici del colon distale
- Riduzione dell'attività di enzimi coinvolti in processi infiammatori e dei mediatori dell'infiammazione





antibiotics



Article

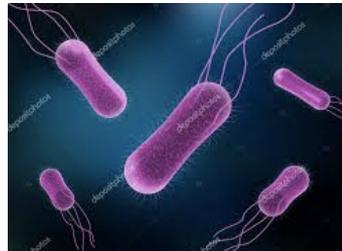
Origanum vulgare Essential Oil vs. a Commercial Mixture of Essential Oils: In Vitro Effectiveness on *Salmonella* spp. from Poultry and Swine Intensive Livestock

Maura Di Vito ^{1,2,†}, Margherita Cacaci ^{2,3,†}, Lorenzo Barbanti ¹ , Cecilia Martini ² ,
Maurizio Sanguinetti ^{2,3,*}, Stefania Benvenuti ⁴ , Giovanni Tosi ⁵, Laura Fiorentini ⁵,
Maurizio Scozzoli ⁶, Francesca Bugli ^{2,3,†} and Paola Mattarelli ^{1,†} 



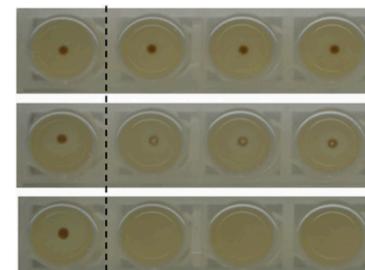
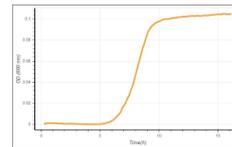
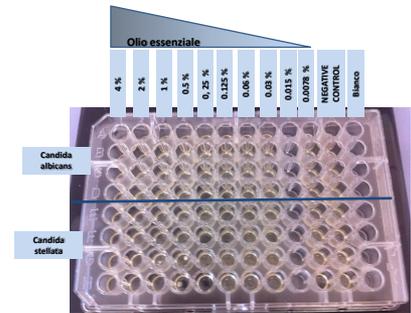
Scopo dello studio

- Valutazione attività antimicrobica degli oli essenziali singoli (*Origanum vulgare* e *Lavandula hybrida*) e miscelati (formulazione commerciale GR-OLI) nei confronti di *Salmonella* isolata da pollame e suini
- Individuazione di un prodotto a base di oli essenziali in grado di risurre la crescita di *Salmonella*



Metodi

- Concentrazione inibitoria minima (MIC) secondo le linee guida EUCAST
- Influenza sulle curve di crescita microbica
- Attività nei confronti dei biofilm (inibizione della formazione e attività sui biofilm formati)
- Adesione batterica alle cellule eucariotiche intestinali



MIC antibiotici verso *Salmonelle* «di campo»

Ceppo	SPECIE	Amoxicillina/A .clavulonico	Piperacillina/t azobactam	Cefotaxime	Ceftazidime	Cefepime	Ertapenem	Imipenem	Meropenem	Amikacina	Gentamicina	Trimetoprim/S ulfametossazo lo
5659	<i>S. tiphymurium</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5655	<i>S. infantis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
5653	<i>S. tiphymurium</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5559	<i>S. infantis</i>	S	S	R	I	I	S	S	S	S	S	S
5340	<i>S. tiphymurium</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5338	<i>S. tiphymurium</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3666	<i>S. tiphymurium</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
3866	<i>S. tiphymurium</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4991	<i>S. tiphymurium</i> monofasica	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
24833	<i>S. tiphymurium</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
301778	<i>S. tiphymurium</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
309136	<i>S. infantis</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
54529	<i>S. infantis</i>	R	S	R	I	R	S	S	S	S	S	S
281122	<i>S. tiphymurium</i> monofasica	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
22741/3	<i>S. tiphymurium</i> monofasica	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
158851	<i>S. tiphymurium</i> monofasica	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	R
22775	<i>S. tiphymurium</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
127881	<i>S. tiphymurium</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
19173	<i>S. tiphymurium</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
343104/3	<i>S. tiphymurium</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
325963	<i>S. tiphymurium</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
365065	<i>S. infantis</i>	R	S	R	I	R	S	S	S	S	S	R
60705	<i>S. infantis</i>	R	S	R	I	R	S	S	S	S	S	R
50839	<i>S. infantis</i>	R	S	R	I	R	S	S	S	S	S	R
77581	<i>S. infantis</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
82717	<i>S. infantis</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
74414	<i>S. infantis</i>	S	S	R	I	R	S	S	S	S	S	R
30954	<i>S. infantis</i>	R	S	R	I	R	S	S	S	S	S	R
72996	<i>S. infantis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

*microorganismi forniti da Istituto Zooprofilattico «Ubertini» di Forlì



MIC di oli essenziali verso salmonelle

		Miscela di oli essenziali*	<i>Oreganum vulgare</i>
		Valori espressi come percentuali	
<i>Species**</i>	Isolata da:		
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar montevideo	Carcassa broiler	0.5	0.5
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar. thyphimurium (6 ceppi)	Busto quaglia	0.5	0.25
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar infantis (3 ceppi)	Sovrascarpe operatore broiler	0.5	0.5
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar agona	Busto quaglia	0.25	0.125
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar blockley	Sovrascarpe operatore broiler	0.25	0.5
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar derby	Busto quaglia	0.25	0.5
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar kapemba	Suino	0.5	0.5
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar kentucky	Carcassa pulcino	0.5	0.5
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar kottbus	Feci ovaiola	0.5	0.25
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar livingstone	Carne fresca tacchino	0.5	0.5
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar ohio	Feci ovaiola	0.125	0.5
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar tenesse	Sovrascarpe operatore broiler	0.125	0.5



Attività antimicrobica di oli essenziali verso *Salmonella*

Oli singoli

- *Origanum vulgare*
- *Lavandula hybrida*

Miscela di oli (GR-OLI*)

Eucalyptus globulus O.E.,
Satureja montana O.E.,
Citrus aurantium var.
Dulcis O.E.,
Thymus vulgaris O.E.

Melaleuca alternifolia O.E.,
Citrus limon O.E.,
Lavandula hybrida O.E.,
Melaleuca cajeputi O.E.,
Origanum vulgare O.E.

Dispersed in vegetal oil authorized for
 veterinary use

	Single essential oils (%)		Blended oil (%)
	<i>O. vulgare</i>	<i>L. hybrida</i>	GR-OLI
MIC90	0.5	>4	0.25



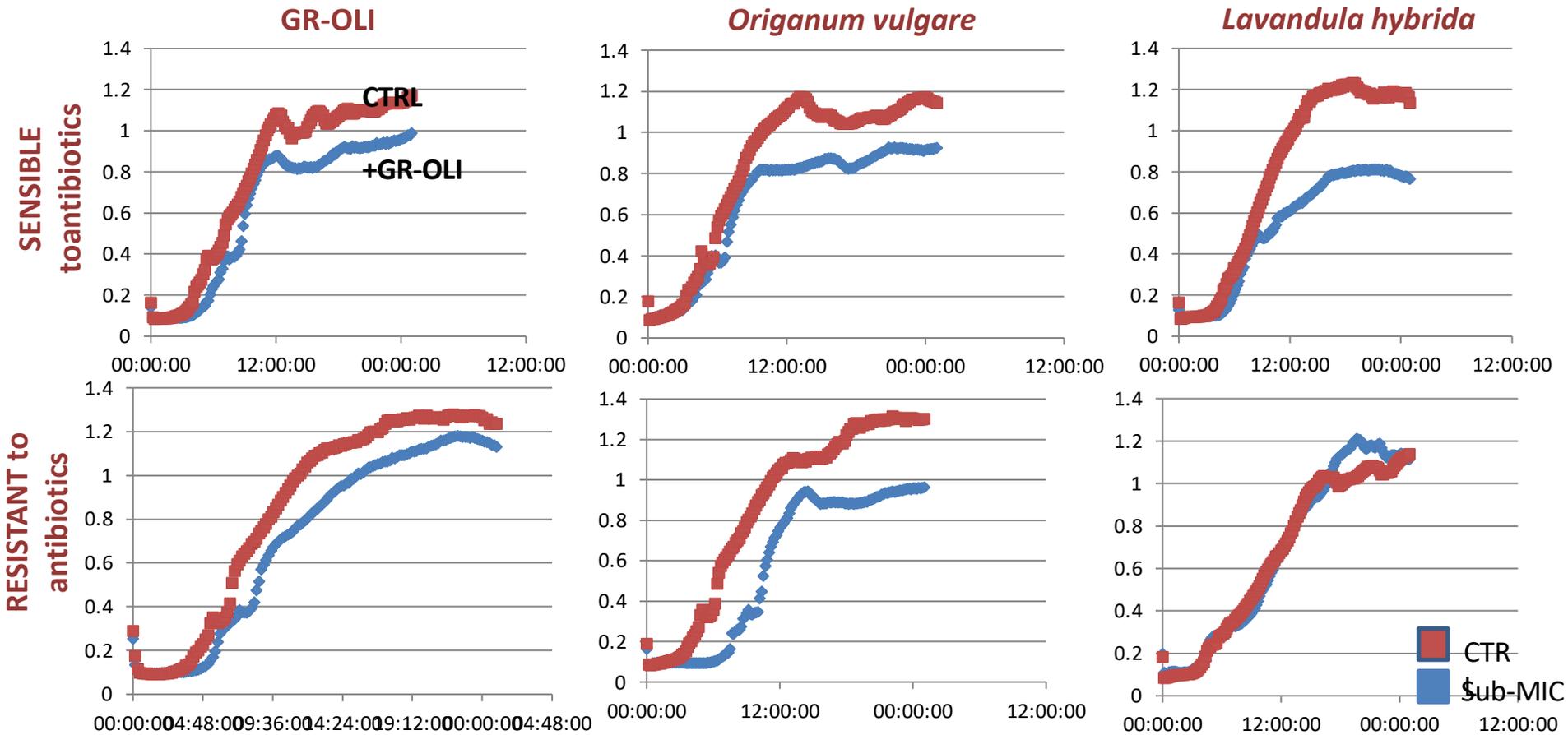
Confronto MIC verso benefici e patobionti

	GR-OLI	<i>O. vulgare</i>	<i>L. intermedia</i>
<i>Salmonella spp</i>	0.25%	0,5%	>4%

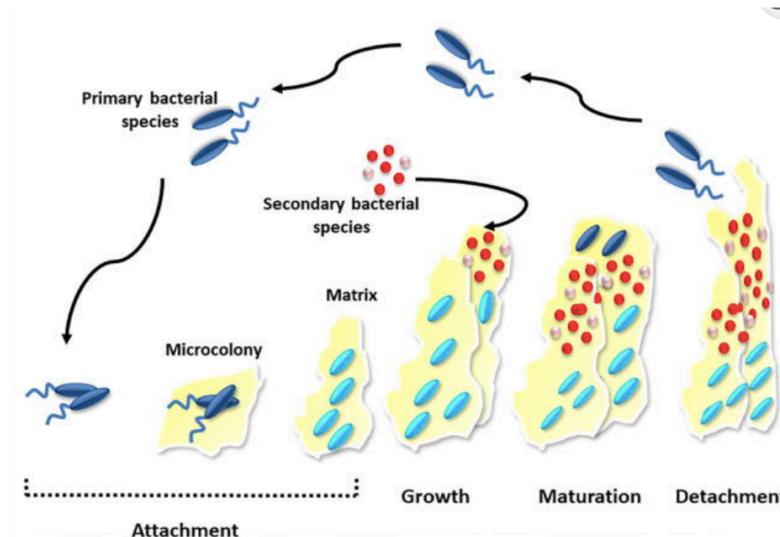
	GR-OLI	<i>O. vulgare</i>	<i>L. intermedia</i>
<i>S. cerevisiae</i> 14.10	2%	1%	≥4%
<i>S. boulardii</i> 466	2%	≥2%	2%
<i>Bifidobacterium</i> <i>PTM5</i>	≥2%	≥2%	ND
<i>Lacticaseibacillus</i> <i>casei</i>	≥2%	2%	>4



Curve di crescita di *Salmonella*



Biofilm



Le cellule interne al biofilm aumentano la loro resistenza a fattori di stress

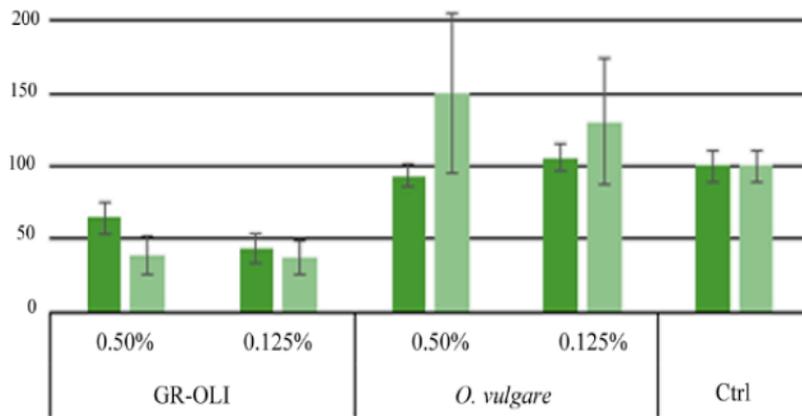
Tolleranza agli antibiotici - sottopopolazioni varianti all'interno dei biofilm protette dal trattamento antibiotico (MIC da 2 a 16 volte più alte)

Un antibiotico può colpire efficacemente determinate popolazioni di cellule, ma lasciare vitali le cellule rimanenti, consentendo loro di ripopolare i biofilm quando il trattamento viene interrotto

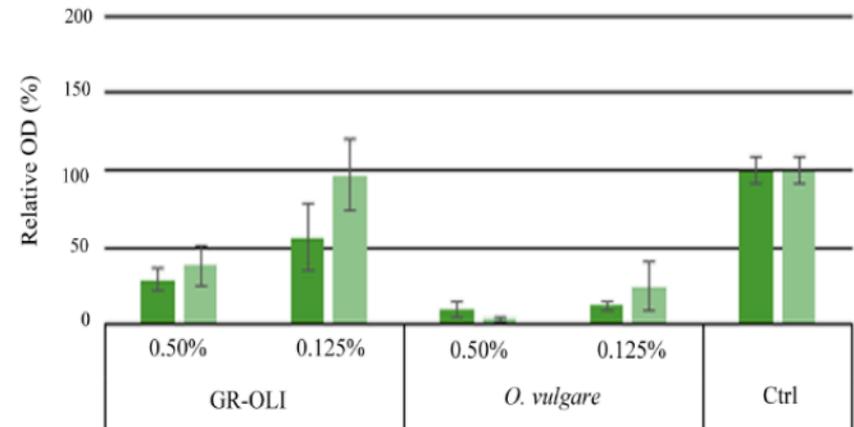
Queste sottopopolazioni resistenti agli antibiotici possono moltiplicarsi diventando importanti per le infezioni

Biofilm

Inibizione formazione biofilm



Inibizione biofilm formato



-  *S. enterica* subsp. *enterica* ser Tiphymurium
-  *S. enterica* subsp. *enterica* ser Infantis

Test di adesione a cellule intestinali Caco-2

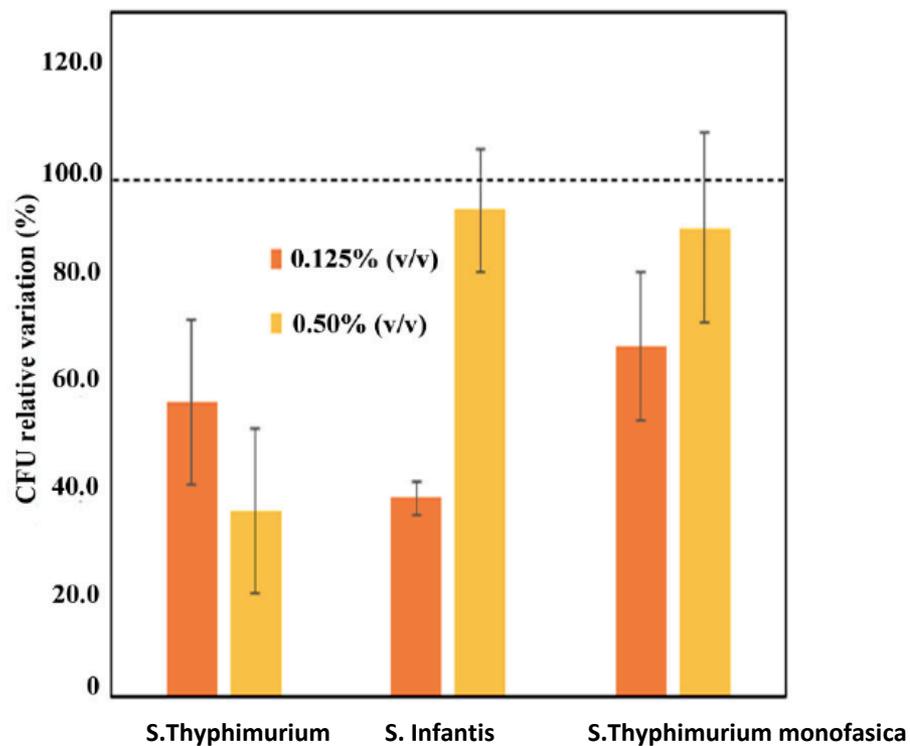
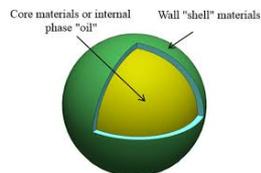


Figure 2. Control-related ratios of the CFU count recovered from GR-OLI-treated bacteria strains (S.T. = *S. Typhimurium*, S. I. = *S. Infantis*, mono S. T. = monophasic *S. Typhimurium*) after the adhesion to the Caco-2 monolayer. Vertical bars indicate \pm standard errors.

Conclusioni

- La resistenza agli antibiotici sta aumentando continuamente e l'utilizzo degli oli essenziali negli allevamenti può contribuire a ridurre l'ampio impiego degli antibiotici
- L'olio essenziale di *O. vulgare* e la formulazione GR-OLI hanno mostrato attività modulatrice sulla crescita di Salmonella quando utilizzati a dosi sub-MIC su ceppi resistenti e sensibili, a differenza di *L. hybrida*
- La formulazione GR-OLI ha mostrato una maggiore attività nell'inibire la formazione del biofilm e nella disgregazione del biofilm formato rispetto a *O. vulgare*
- Se ulteriormente confermata su un ampio numero di ceppi clinici di Salmonella in studi in vitro e confermata in studi in vivo, la formulazione GR-OLI può rappresentare una buona strategia per il controllo della salmonellosi nel pollame e nei suini



Oli microincapsulati



Da questo studio ...

Capacità degli oli di contrastare sia direttamente i ceppi patogeni sia il biofilm di ceppi patogeni

Viene confermata la maggiore sensibilità agli OE dei microrganismi patogeni rispetto ai commensali

Gli OE possono quindi essere considerati eccellenti candidati nella prevenzione e trattamento delle disbiosi e potenziali agenti terapeutici



Oli essenziali in acquacoltura



Scopo del presente studio

- Comparare l'attività antimicrobica di 11 oli essenziali singoli e 2 formulazioni in miscela (formulato Br e Gl) verso patogeni isolati in campo in pesci



Patogeni saggiati

Specie	Ceppo	Patologia
<i>Yersinia ruckeri</i>	ITT 100/16*	Yersiniosis/Enteric Redmouth Disease
<i>Vibrio harveyi</i>	ITT 11/16*	Vibriosis by <i>Vibrio harveyi</i>
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	ITT 210/B/2 1 *	Photobacteriosis
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	ATCC 33658	Forunculosis
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	ITT 108/15/ D *	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i> infection associated with Winter Disease
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	ITT 314/17/ A *	Tenacibaculosis



Composizione oli essenziali

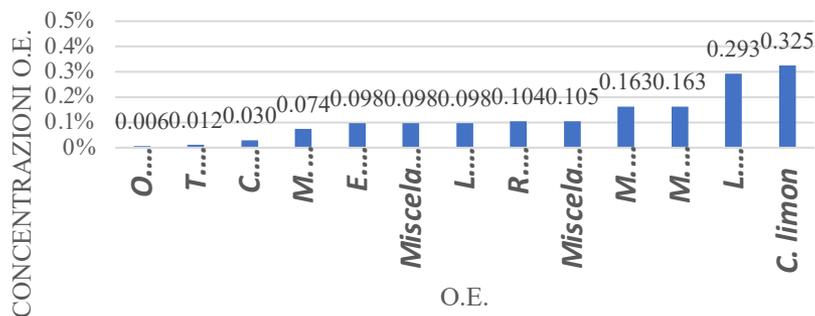
11 OLI ESSENZIALI PURI E DUE MISCELE (GL e BR)

Oli essenziali	Componenti principali
<i>Origanum vulgare</i>	carvacrolo
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Alpha-terpinene, gamma-terpinene. Terpinen-4-ol
<i>Melaleuca leucadendron</i>	1,8-cineolo
<i>Eucalyptus globulus</i>	1,8-cineolo
<i>Mentha piperita</i>	mentone, mentolo
<i>Lavandula angustifolia</i>	linalolo, linalyl acetate
<i>Lavandula hybrida</i>	linalolo, linalyl acetate
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	eugenolo, linalolo
<i>Rosmarinus officinalis</i>	1,8-cineolo, canfora
<i>Citrus limon</i>	beta-pinene, limonene, terpinolene
<i>Thymus vulgaris</i>	timolo, carvacrolo

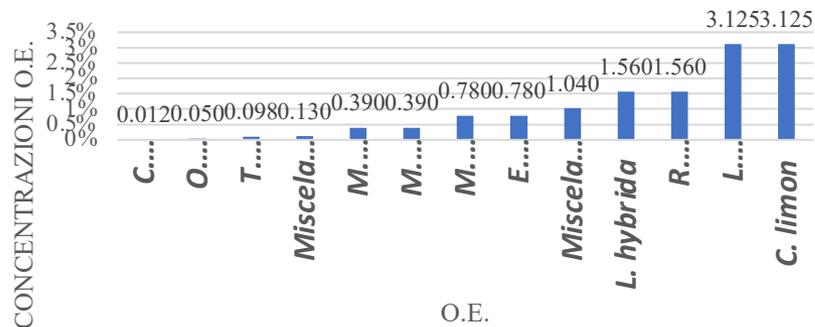


MIC ceppi «di campo»

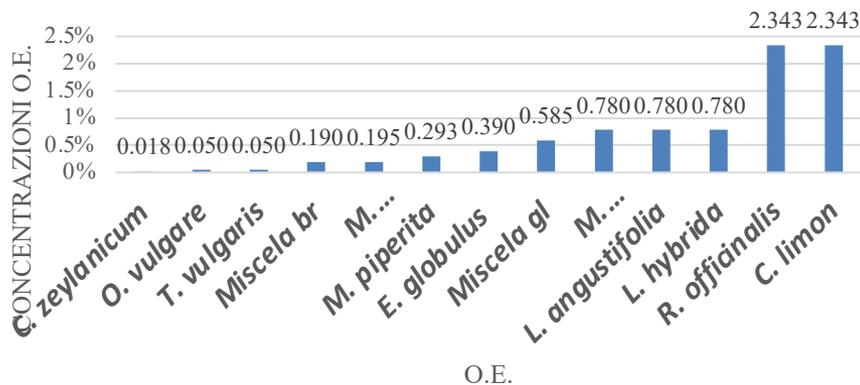
MIC *Aeromonas salmonicida*



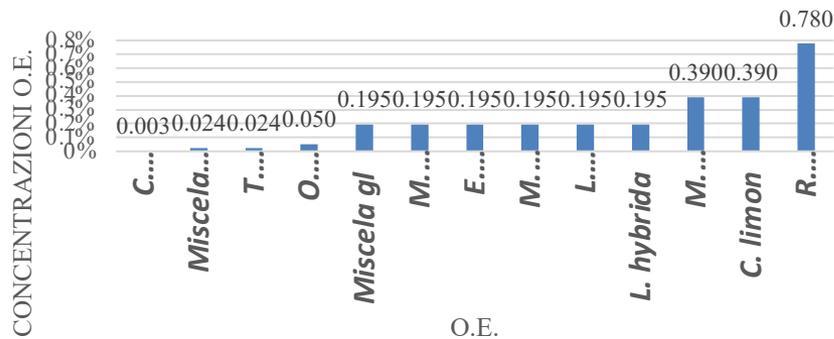
MIC *Vibrio harveyi*



MIC *Yersinia ruckeri*

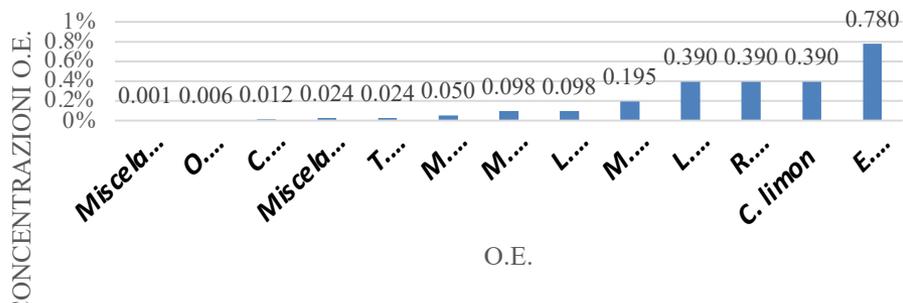


MIC *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*

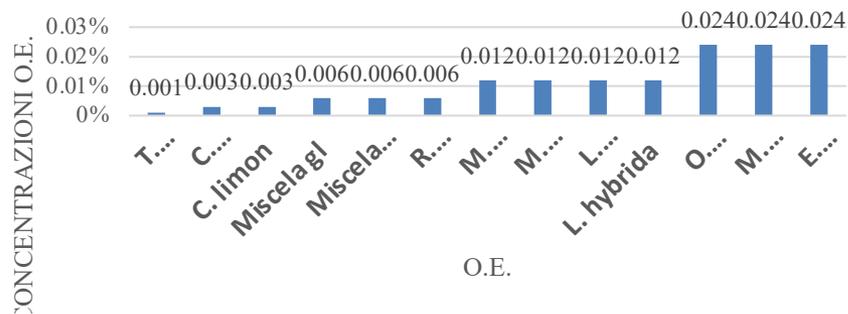


MIC ceppi «di campo»

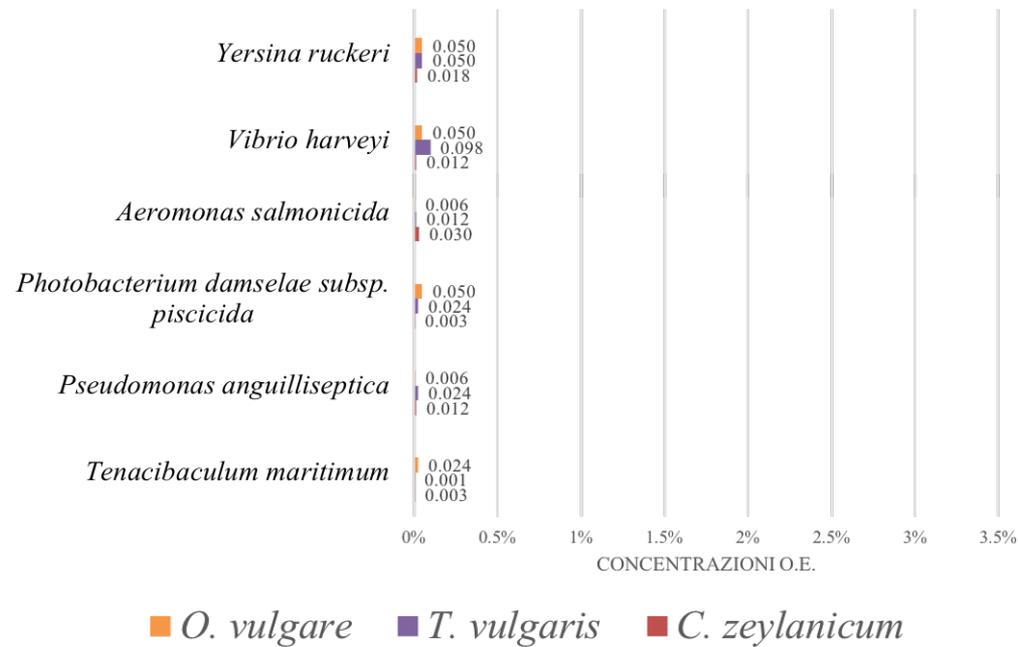
MIC *Pseudomonas anguilliseptica*



MIC *Tenacibaculum maritimum*



Oli essenziali più attivi: cannella, timo e origano



Biofilm e carapaci di gamberetti

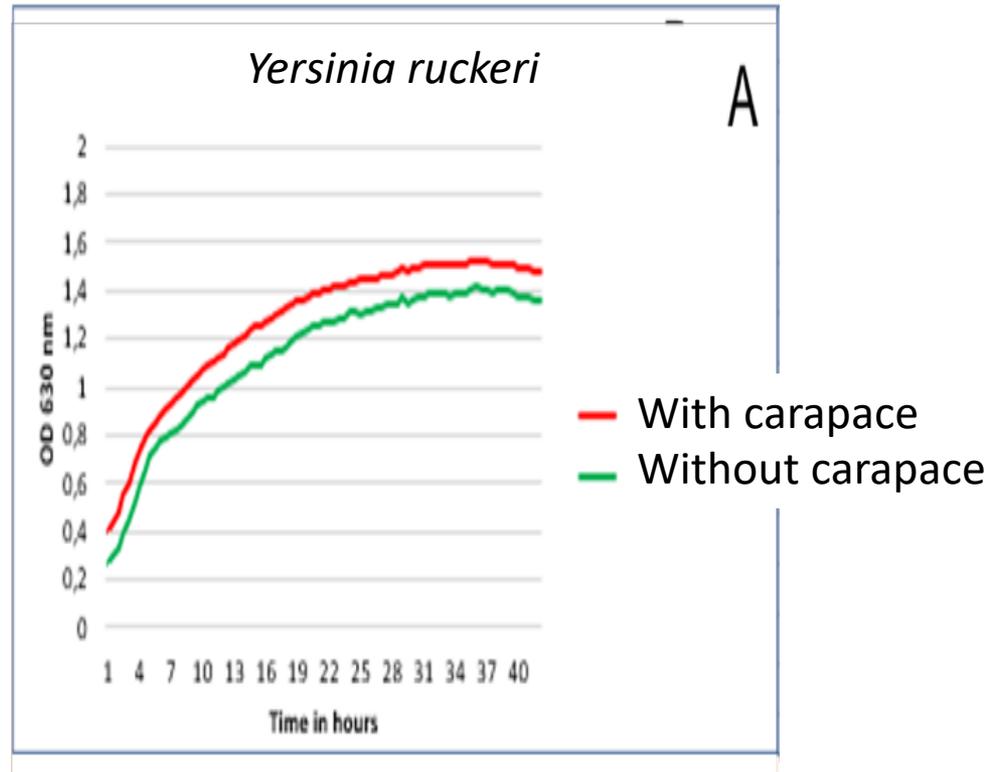
crescita dei microrganismi con e senza l'aggiunta di carapaci sterilizzati ottenuti da gamberetti

Analisi in piastre di polistirene da 24 pozzetti, in cui i batteri sono stati inoculati in una sospensione di 0.5 McFarland diluita 1:100

I microrganismi coltivati sia con che senza l'aggiunta di carapace sono stati sottoposti a test di MIC utilizzando una miscela commerciale di oli essenziali denominata MIX GL



Biofilm con e senza carapace di gamberetti



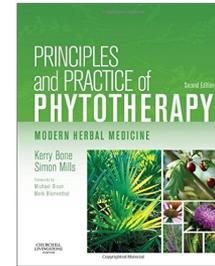
Take home message



Gli oli essenziali sono importanti nell'interazione fra ospite e microrganismi che è fondamentale per mantenere un equilibrio fra immunità e salute

Gli oli essenziali sono un promettente supporto alle terapia antibiotica ed alla prevenzione delle infezioni

Alcuni testi



Phytotherapy Research

Edited by: Elizabeth M. Williamson, Angelo A Izzo, Sung Hoon-Kim and Rajan Radhakrishnan

Journal of natural products

Editor-in-Chief: A. Douglas Kinghorn

Phytomedicine

International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology Editor-in-Chief: Thomas Efferth

Journal of Ethnopharmacology

An Interdisciplinary Journal Devoted to Indigenous Drugs Editor-in-Chief: A.M. Viljoen

Grazie!

