

ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΓΧΥΜΑΤΩΝ

A. Μπατρίνου*, M. Κατσιγίνη, Γ. Σιδέρη, Δ. Χούχουλα, Σ. Παπαθεοδώρου, Ε. Στρατή, Β. Σινάνογλου

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Αθήνα, Ελλάδα
(*batrinou@uniwa.gr)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η *Candida* είναι μία ζύμη που αποτελεί έναν από τους πιο κοινούς αιτιολογικούς παράγοντες των ευκαιριακών μυκητιάσεων σε παγκόσμιο επίπεδο. Στα πλαίσια της αναζήτησης νέων αναδυόμενων αντιμικροβιακών ενώσεων με υψηλή αποτελεσματικότητα έναντι των στοματικών μυκητιάσεων, με χαμηλή τοξικότητα και με ελάχιστη περιβαλλοντική επιβάρυνση εξετάζεται η χρήση ροφημάτων από βότανα. Πολλές μελέτες έχουν εδραιώσει τις ευεργετικές επιδράσεις (αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αναλγητικές, νευροπροστατευτικές, αντικαρκινογόνες) πολλών φυτικών εκχυλισμάτων. Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκαν 3 βότανα, η *Mentha spicata* (δυόσμος), η *Mentha pulegium* (φλισκούνη) και το *Thymus capitatus* (θυμάρι), των οποίων τα εγχύματα έχουν αναλυθεί ως προς το ολικό φαινολικό περιεχόμενο, την αντιριζική και την αντιοξειδωτική τους δράση και έχουν βρεθεί να έχουν υψηλές τιμές. Αξιολογήθηκε η αντιμυκητιακή δράση των συγκεκριμένων βοτάνων σε ένα στέλεχος *Candida albicans* που απομονώθηκε από την στοματική κοιλότητα υγιούς ατόμου και ταυτοποιήθηκε με API 20CAUX. Η αντιμυκητιακή ανάλυση έγινε με αυτόματη νεφελομετρία (Bioscreen C) σε πόσιμα εγχύματα των βοτάνων (παρασκευάστηκαν εγχύματα από τα βότανα σε ξηρή μορφή που αφέθηκαν σε νερό θερμοκρασίας βρασμού για 15 λεπτά). Όλα τα εγχύματα των βοτάνων που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία έδειξαν αντιμυκητιακή δράση ενώ η υψηλότερη ανασταλτική δράση παρατηρήθηκε από το *Thymus capitatus* (θυμάρι). Η δυνατότητα χρήσης φυτικών εγχυμάτων ως φυσικών αντιμικροβιακών ενώσεων έναντι της ανάπτυξης *Candida albicans* χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η *Candida albicans* είναι μία ζύμη που συχνά προκαλεί ευκαιριακές μυκητιάσεις στην στοματική κοιλότητα και μπορεί να είναι ιδιαίτερα ανθεκτική σε φαρμακευτικές θεραπείες. Πολλές έρευνες έχουν εστιάσει στην αναζήτηση φυσικών αντιμικροβιακών ενώσεων από βότανα για την αντιμετώπιση των στοματικών μυκητιάσεων οι οποίες έχουν χαμηλή τοξικότητα και υψηλή αποτελεσματικότητα στην διατήρηση της στοματικής υγείας^[1]. Οι πολυφαινόλες και άλλες αντιοξειδωτικές ενώσεις που περιέχονται στα βότανα έχουν πολλαπλές ευεργετικές επιδράσεις (αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αναλγητικές, νευροπροστατευτικές, αντικαρκινογόνες)^[2]. Τα φυτικά εκχυλίσματα, τα αιθέρια έλαια, τα αφεψήματα και τα εγχύματα αν και έχουν διαφορετικές περιεκτικότητες στα ευεργετικά αυτά συστατικά διατηρούν την αντιμικροβιακή τους δράση.

ΣΤΟΧΟΙ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Στην παρούσα εργασία παρασκευάστηκαν τα εγχύματα από 3 βότανα, *Mentha spicata* (δυόσμος), *Mentha pulegium* (φλισκούνη) και *Thymus capitatus* (θυμάρι) και μελετήθηκε η αντιμυκητιακή δράση των εγχυμάτων τους στην ζύμη *Candida albicans* με την μέθοδο της αυτόματης νεφελομετρίας. Επιλέχθηκαν τα 3 συγκεκριμένα βότανα γιατί σε πρόσφατη μελέτη^[3] έχει αναλυθεί το ολικό φαινολικό περιεχόμενο, η αντιριζική και η αντιοξειδωτική δράση των εγχυμάτων τους και βρέθηκαν υψηλές τιμές. Οι υψηλές συγκεντρώσεις πολυφαινολών και

αντιοξειδωτικών παραγόντων σε φυτικά εκχυλίσματα έχουν συσχετιστεί σε πολλές μελέτες με αντιμικροβιακή δράση έναντι gram θετικών, gram αρνητικών βακτηρίων και μυκήτων^[4].

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Αξιολογήθηκε η αντιμυκητιακή δράση των 3 συγκεκριμένων βοτάνων σε ένα στέλεχος *Candida albicans* που απομονώθηκε από την στοματική κοιλότητα υγιούς ατόμου και ταυτοποιήθηκε με API 20CAUX (Biomerieux). Τα βότανα *Mentha spicata* (δυόσμος), *Mentha pulegium* (φλισκούνη) και *Thymus capitatus* (θυμάρι) προέρχονταν από την Ελληνική αγορά. Τα εγχύματα παρασκευάστηκαν από τα βότανα σε ξηρή μορφή: 60 ml νερό τοποθετήθηκε σε λύχνο μέχρι βρασμού και αφού απομακρύνθηκε προστέθηκαν 2 γρ. από το κάθε βότανο, παρέμειναν σε ηρεμία για 15 min και τέλος έγινε διήθηση στο κάθε έγχυμα. Ελαιώρημα ζύμης (κλίμακα θολρότητας McFarland 0,5) εμβολιάστηκε σε συγκεντρώσεις 50 και 100μL σε υπόστρωμα Sabouraud broth και προστέθηκε η αντίστοιχη ποσότητα (50 και 100μL) του εγχύματος.

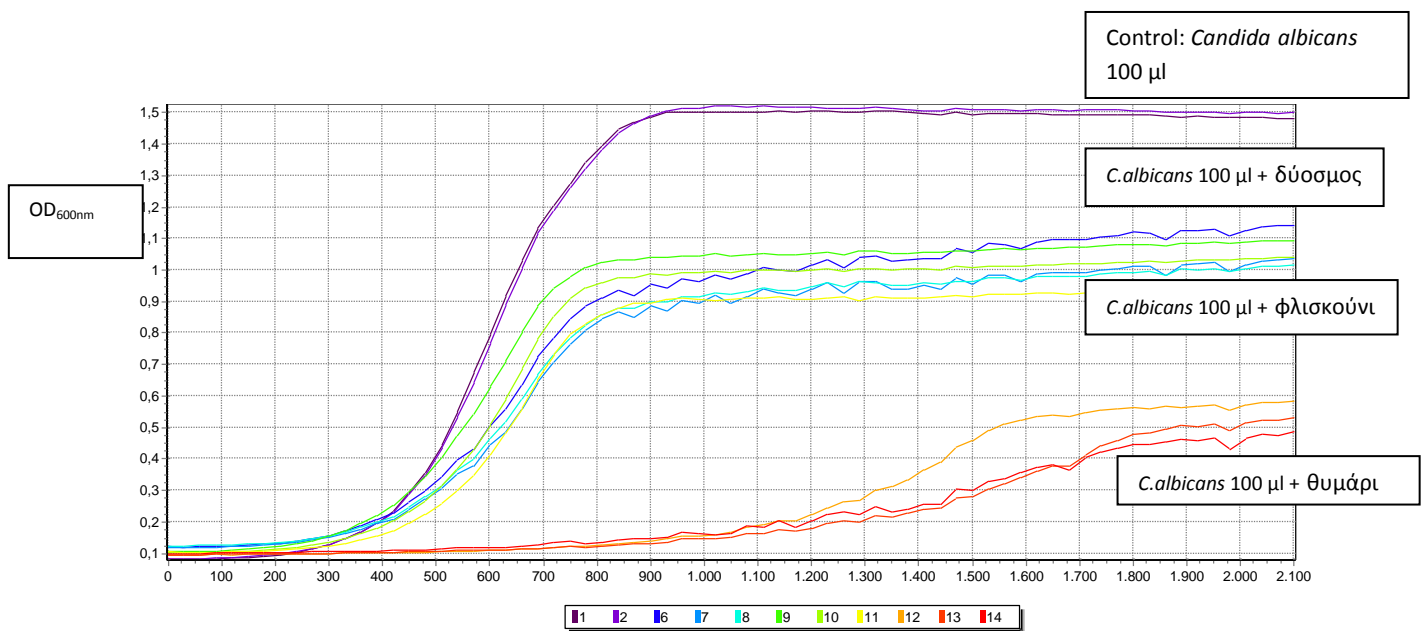
Η αντιμυκητιακή ανάλυση έγινε με αυτόματη νεφελομετρία (Bioscreen C) κατά την οποία καταμετρήθηκε η οπτική πυκνότητα OD_{600nm} των δειγμάτων για κάθε 30 min επί 24h και σχεδιάστηκε η καμπύλη ανάπτυξης του μικροοργανισμού για κάθε δείγμα ($OD=f(t)$). Όλες οι δοκιμές έγιναν σε 3 επαναλήψεις. Η αναστολή της ανάπτυξης του μικροοργανισμού εκφράζεται με την μείωση της ειδικής ταχύτητας πολλαπλασιασμού μ (specific growth rate) και παρατηρείται ως μείωση της κλίσης της καμπύλης στην λογαριθμική φάση ανάπτυξης. Η ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\mu = \frac{2,303 (\text{Log}OD2 - \text{Log}OD1)}{t2 - t1} \quad (1)$$

όπου επιλέχθηκαν οι χρόνοι κατά τους οποίους παρατηρήθηκε διπλασιασμός της οπτικής πυκνότητας ($OD2=2*OD1$).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

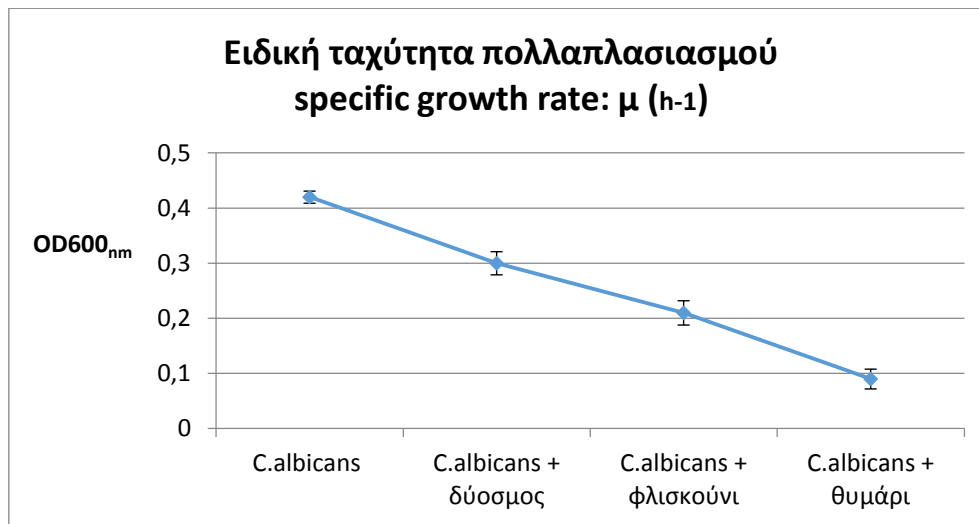
Όλα τα εγχύματα των βοτάνων που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία έδειξαν μυκοστατική δράση (αναστολή της ανάπτυξης του μύκητα) όπως φαίνεται από τις καμπύλες ανάπτυξης στο Σχήμα 1. Στο σχήμα 1 παρατηρείται μείωση της κλίσης της ευθείας κατά την λογαριθμική φάση σε όλες τις καμπύλες που έχουν προκύψει από την ανάπτυξη της *C.albicans* παρουσία των εγχυμάτων των βοτάνων σε σύγκριση με την καμπύλη ανάπτυξης της *C.albicans* απουσία οποιουδήποτε παράγοντα (control). Η κλίση της ευθείας κατά την λογαριθμική φάση αντιστοιχεί στην ταχύτητα πολλαπλασιασμού του μικροοργανισμού και εκφράζεται με την ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού μ (specific growth rate). Οι ειδικές ταχύτητες πολλαπλασιασμού (πίνακας 1) δείχνουν στατιστικά σημαντική μείωση της ανάπτυξης της *C.albicans* με την παρουσία εγχυμάτων από δυόσμο, φλισκούνη και θυμάρι σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (control). Η υψηλότερη μυκοστατική δράση παρατηρήθηκε από το *Thymus capitatus* (θυμάρι).



Σχήμα 1. Οι καμπύλες ανάπτυξης *Candida albicans* σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα απουσία και παρουσία των εγχυμάτων όπως καταμετρήθηκαν με αυτόματη νεφελομετρία στο BIOSCREEN. Η μυκοστατική δράση των εγχυμάτων παρατηρείται ως μείωση της κλίσης της καμπύλης κατά την λογαριθμική φάση (log phase) ανάπτυξης του μικροοργανισμού και ως αύξηση της φάσης προσαρμογής (lag phase) όπως φαίνεται χαρακτηριστικά στις καμπύλες ανάπτυξης του μικροοργανισμού που έχει προστεθεί θυμάρι.

Πίνακας 1. Οι ειδικές ταχύτητες πολλαπλασιασμού μ της *Candida albicans* σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (*Sabouraud broth*) απουσία και παρουσία των εγχυμάτων (SD =τυπική απόκλιση)

Μικροοργανισμός	Εγχυμα (100 μ L)	μ (h^{-1})	SD
<i>C. albicans</i>	-	0,42	0,011
<i>C. albicans</i>	<i>Mentha spicata</i>	0,3	0,021
<i>C. albicans</i>	<i>Mentha pulegium</i>	0,21	0,022
<i>C. albicans</i>	<i>Thymus capitatus</i>	0,09	0,018



Σχήμα 2. Η ειδική ταχύτητα πολλαπλασιασμού (μ) της *C.albicans* με την παρουσία εγχυμάτων από δυόσμο, φλισκούνη και θυμάρι δείχνει σημαντική μείωση, γεγονός που υποδηλώνει μυκοστατική δράση των εγχυμάτων. Η μη επικάλυψη των γραμμών σφαλμάτων δείχνει στατιστικά σημαντικές διαφορές.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα εγχύματα της *Mentha spicata* (δυόσμος), *Mentha pulegium* (φλισκούνη) και *Thymus capitatus* (θυμάρι) έδειξαν μυκοστατική δράση έναντι του μύκητα *Candida albicans* με την μέθοδο της αυτόματης νεφελομετρίας. Η υψηλότερη μυκοστατική δράση παρατηρήθηκε από το *Thymus capitatus* (θυμάρι). Η πολλά υποσχόμενη δυνατότητα χρήσης φυτικών εγχυμάτων ως φυσικών αντιμικροβιακών ενώσεων έναντι της ανάπτυξης *Candida albicans* χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Samadi et al. (2019) Antifungal efficacy of herbs, J Oral Biol Craniofac Res. 2019 Jan-Mar; 9(1):28-32. doi: 10.1016/j.jobcr.2018.06.002. Epub 2018 Jun 7D.
- [2] Webster et al. (2008) Journal of Ethnopharmacology, 115 , 140–146
- [3] Fotakis et al. (2016) Food Chemistry 211, 963–971
- [4] Cordery et al. (2018) Journal of Agriculture and Environmental Sciences, 7, 76-89