

CERCETĂRI ASUPRA ACȚIUNII ANTIMICOTICE A ULEIULUI VOLATIL PROVENIT DIN ACHILLEA MILLEFOLIUM *

Adriana Popovici, dr. M. Péter, C. Csedő

Testarea clinică a unui unguent hidrofili, conținând acetat de hidrocortizon, vitamina A și ulei volatil, provenit din Achillea millefolium (coada șoricelului), ne-a atras atenția asupra unui remarcabil efect antimicotic, pe lângă acțiunea antiinflamatoare și cicatrizantă scontată (5, 19). Acest fapt ne-a determinat să examinăm in vitro activitatea antifungică a acestui ulei volatil, în scopul îmbogățirii sortimentului de produse antimicotice necesare în tratamentul micozelor superficiale și profunde.

S-a urmărit acțiunea asupra unor levuri, mucegaiuri și dermatofiți a uleiului volatil ca atare, și inclus în diferite baze de unguent, alături de alte substanțe capabile să potențeze acțiunea antifungică.

Partea experimentală

1. Determinarea activității antimicotice a uleiului volatil.

Uleiul volatil utilizat pentru testarea activității antimicotice s-a obținut prin distilare (F. R. VIII) din florile plantei Achillea millefolium, colectată în 1969 (Întreprinderea de plante medicinale, București) și care conține 2% azulene, determinate după procedeul Kaiser și Stahl modificat (9, 18, 21).

S-a aplicat o cantitate de 0,01 ml ulei volatil ($2 \cdot 10^{-4}$ g azulenă) pe rondelile de hîrtie de filtru sterile, cu diametrul de 12 mm, pe suprafața unor plăci Petri conținînd mediu Sabouraud. Concentrația germeilor celor 11 tulpini a fost de $3 \cdot 10^7$ celule/ml. Tabelul nr. 1 redă intensitatea efectului antimicotic urmărit, după 4 zile de la menținerea preparatelor la o temperatură de $24^{\circ} \pm 2^{\circ}C$.

Metoda difuzimetrică utilizată a permis evidențierea netă a proprietăților antifungice ale uleiului volatil, care s-a dovedit extrem de activ in vitro, în concentrații de 0,01 ml, asupra unor ciuperci patogene din grupul dermatofiților (Trichophyton), levuri (Candida, Saccharomyces) și al altor fungi. Este însă inactiv asupra unor mucegaiuri (Penicillium și Aspergillus).

2. Cercetarea comparativă a intensității efectului antimicotic al uleiului volatil în raport cu natura vehiculului.

S-au utilizat 6 baze de unguent sterile (tabelul nr. 2) în cantitate de 500 mg. conținînd 0,10 ml ulei volatil, care au fost etalate pe suprafața rondelilor de hîrtie de filtru și aplicate pe mediul Sabouraud, însămințat cu ciuperci patogene în con-

* Lucrare prezentată la Consfătuirea „Valorificarea superioară a plantelor medicinale”. U.S.S.M. Tirgu Mureș, 4 iulie 1970.

centrația 1,5.10⁷ celule/ml. Diametrul mediu, rezultat prin 3 determinări, al zonei de inhibiție, apreciat după 4 zile de incubație la 24°±2°C, este redat în fig nr 1. 2 și 3

Tabelul nr. 1

Testarea activității fungistatice a uleiului volatil de coada șoricelului (Aetheroleum millefolium) în cantitate de 0,01 ml (0,0002 g azulene)

| Nr. crt. | Microorganismul test | Intensitatea acțiunii fungistatice |
|----------|--------------------------|------------------------------------|
| 1. | Candida albicans | +++ |
| 2. | Saccharomyces cerevisiae | ++++ |
| 3. | Rhodotorula rubra | ++++ |
| 4. | Geotrichum candidum | +++ |
| 5. | Geotrichum loubieri | +++ |
| 6. | Pulularia pululans | +++ |
| 7. | Aspergillus niger | - |
| 8. | Penicillium notatum | - |
| 9. | Trichophyton rubrum | ++++ |
| 10. | Acho-ion | - |
| 11. | Alternaria tenuis | ++++ |

Legenda: ++++ = foarte activ
 +++ = activ
 - = inactiv

Tabelul nr. 2

Compoziția bazelor de unguent utilizate în studiul acțiunii antimicotice a uleiului volatil

| Denumirea ingredientelor | I. | II. | III. | IV. | V. | VI. |
|--------------------------|----|-----|------|-------|----|-------|
| Adeps lanae | - | 20 | - | - | - | - |
| Alcoholum cetylicum | - | - | 25 | - | - | 5 |
| Alc. cetostearylicum | - | - | - | 15 | - | - |
| Aqua destilata | - | 20 | - | 52,50 | 85 | 10 |
| Cera alba | - | 5 | - | - | - | - |
| Cholesterolum | - | 5 | - | - | - | - |
| Cetaceum | - | 25 | - | - | - | - |
| Glycerolum | - | - | - | - | 10 | - |
| Methylcelulosum | - | - | - | - | 5 | - |
| Nalaurylsulfuricum | - | - | - | 2,50 | - | - |
| Paraffinum liquidum | 40 | 25 | 20 | 10 | - | - |
| Propyenglycolum | - | - | - | 20 | - | - |
| Polyaethylenglycolum 400 | - | - | - | - | - | 47,50 |
| Polyaethylenglycolum 400 | - | - | - | - | - | 47,50 |
| Tween 80 | - | - | 10 | - | - | - |
| Vaselinum | 60 | 20 | 45 | - | - | - |

Intensitatea acțiunii antimicotice este dependentă de tipul bazei de unguent și a microorganismului testat. Astfel, o eliberare foarte intensă care se traduce printr-o zonă de inhibiție puternică, se constată la bazele polietilenglicoli (baza nr. 6), față de toate tu-pinile testate. Intensitatea cedării uleiului volatil este constantă la toate ciupercile patogene din gelurile de hidrocarburi și medie din bazele hidrofiele

Zone de inhibiție mai scăzute s-au înregistrat din lipogeluri. Dintre microorganismele testate, Candida a fost mai puțin influențată prin aplicarea lipogelului și chiar nemodificată prin aplicarea unguentului hidrofil neionic și anionic (nr. 3 și 4), care inhibă difuziunea uleiului volatil.

Creșterea dermatofitelor din genul Trichophyton este împiedicată în mare măsură prin aplicarea unguentelor cu polietilenglicol și geluri de hidrocarburi (fig. nr. 3) și mai puțin de unguentele hidrofile și lipogelurile cu ulei volatil. Romazulanul aplicat sub formă de soluție, în cantitate de 0,02 ml (corespunzător unei cantități de 8.10⁻⁶ g azulen și 0,00012 g ulei volatil de mușetei), a manifestat un efect inhibitor față de Trichophyton rubrum și Alternaria tenuis.

3. *Influența altor substanțe medicamentoase asupra activității fungistatice a uleiului volatil inclus în baze de unguent.*

Pentru a se aprecia gradul în care unele substanțe potențează activitatea antimicrobică s-au inclus (tab. 3): acetat de hidrocortizon (AHC), vitamina A, prednison, urotropină sau uree în 2 baze de unguent.

Cu scopul de a cerceta fracțiunea din uleiul volatil responsabilă de activitatea antimicrobică s-au izolat azulele, prin separare cromatografică în strat sub-

Tabelul nr. 3
Preparate combinate utilizate în studiul activității antimicrobice
a uleiului volatil

| Nr. experienței | Ingredientele bazei or de unguent utilizate | Hormoni corticosteroidi % g unguent | Vitamina A UI % g unguent | Aetheroleum mil'efolium % g unguent | Methenaminum % g unguent | Ureea % g unguent | Azulene % g soluție |
|-----------------|---|-------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|--------------------------|-------------------|---------------------|
| I. | Baza de unguent nr. 1. | AHC 3 | — | — | — | — | — |
| II. | Glycerolum monost. 15 g | AHC 3 | 1 · 10 ⁷ | — | — | — | — |
| III. | Glycerolum 25 g Paraffinum liq. 20 g | AHC 3 | — | 20 | — | — | — |
| IV. | Polysorbatum 80 10 g | AHC 3 | 1 · 10 ⁷ | 20 | — | — | — |
| V. | Propylenglycolum 10 g | — | — | 20 | — | — | — |
| VI. | Aqua destilata 20 g | — | — | — | 3,3 | — | — |
| VII. | — | — | — | 20 | 3,3 | — | — |
| VIII. | — | AHC 3 | 1 · 10 ⁷ | 20 | 3,3 | — | — |
| IX. | — | Prednison 0,30 | — | — | — | — | — |
| X. | Baza de unguent nr. 2. | — | — | 20 | — | — | — |
| XI. | PEG 4000 47,50 g PEG 400 47,50 g | — | — | 20 | 3,3 | — | — |
| XII. | Alc. cetylicum 5,0 g Aqua dest. 10,00 g | — | — | — | — | 3,5 | — |
| XIII. | Sol. benzenică | — | — | — | — | — | 2 |

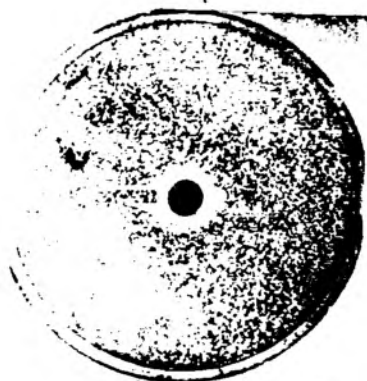


Fig. nr. 1: Efectul antimicotic al uleiului volatil (Aetheroleum millefolium) inclus în hidrogeluri. *Candida albicans*

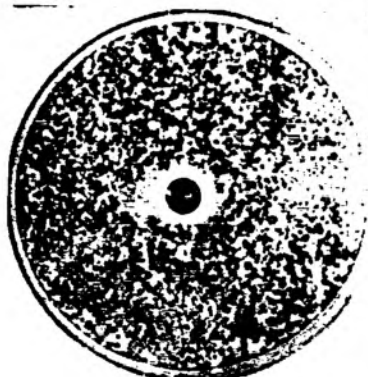


Fig. nr. 2: Efectul antimicotic al uleiului volatil (Aetheroleum millefolium) inclus în hidrogeluri. *Geotrichum candidum*

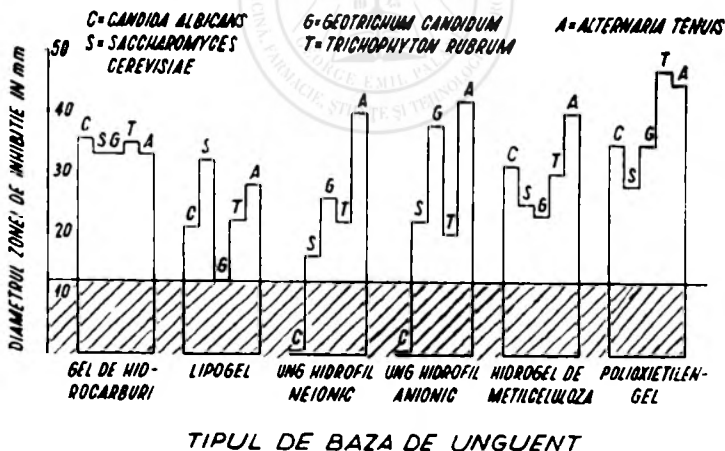


Fig. nr. 3: Variația acțiunii antimicotice a uleiului volatil provenit din *Achillea millefolium* în funcție de tipul bazei de unguent

ADRIANA POPOVICI ȘI COLAB.: CERCETĂRI ASUPRA ACȚIUNII ANTIMICO-
TICE A ULEIULUI VOLATIL PROVENIT DIN *ACHILLEA MILLEFOLIUM*

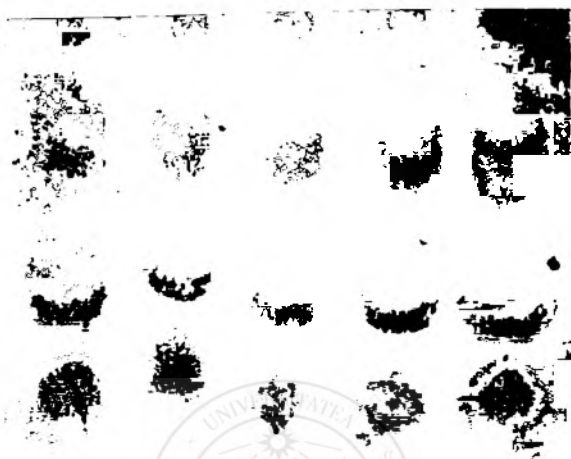


Fig. nr. 4: Separarea cromatografică a componentelor din
Aetheroleum millefolium



Fig. nr. 5: C=Candida albicans, S= Saccharomyces cerevisiae, G=Geotrichum candidum

țire (3, 8, 23, 24), utilizând ca absorbant un amestec de silicagel (Merck) cu sulfat de calciu (p. a.) (85:15), iar ca agent de migrare benzen (p. a.). Spotul albastru, corespunzător distanței maxime de migrare, a fost izolat și extras cu benzen (fig. nr. 4).

Activitatea antimicotică a unguente'or etalate în cantitate de 500 mg pe mediul Sabouraud, cit și cea a soluției benzenice de azulene, s-a testat asupra următorilor fungi: *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* și *Geotrichum candidum*. Concentrația substanțelor folosite, cit și inhibiția asupra creșterii tulpinilor sînt redată în fig. nr. 5.

Din aceste date se observă că, acțiunea antimicotică a acetatului de hidrocortizon în concentrație de 0,015 grame este redusă la toate cele 3 tulpini de levuri cercetate (exp. I), nu se modifică prin adaos de vitamina A (exp. II), dar acțiunea uleiului volatil este potențată prin adaosul acestor substanțe (exp. III—IV). Unguentul nr. 1 care conține numai ulei volatil (exp. V) prezintă o zonă de inhibiție mare față de toate tulpinile cercetate. Adaosul de urotropină la unguentul nr. 1, asociat de AHC, vitamina A, ulei volatil (exp. VIII) sau fără AHC (exp. VII), potențează acțiunea antimicotică, în timp ce introducerea urotropinei singure (3,5%) în unguentul hidrofîl (nr. 1) nu formează o zonă de inhibiție față de *Candida*, iar la *Saccharomyces* și *Geotrichum* o zonă foarte redusă, la care după 48 de ore accelerează chiar creșterea.

Comparativ cu acțiunea AHC, prednisonul 0,30% în unguent hidrofîl nr. 1 nu a avut nici un efect asupra lui *Geotrichum candidum*, o acțiune foarte slabă asupra *Candidei* și *Saccharomyces cerevisiae*, constatîndu-se de asemenea și în acest caz o accelerare a dezvoltării fungilor (exp. IX) ca de altfel și la unguentele cu AHC.

Difuziunea marcată a uleiului volatil favorizată de baza cu polietilenglicoli (nr. 2) a dat zone de inhibiție mari (exp. X), care au crescut prin adaosul de urotropină (exp. XI), dar nu și a ureei (exp. XII). Azulele în concentrație de 0,002 g, deci corespunzătoare uleiului volatil experimentat (exp. XIII), au inhibat creșterea culturii de *Geotrichum candidum* și *Saccharomyces cerevisiae* dar nu și a culturii de *Candida*.

Discuția rezultatelor

Uleiul volatil din planta *Achillea millefolium* a fost testat experimental în clinic de numeroși cercetători, pentru remarcabilul său efect antiinflamator, identic cu a celui provenit din *Matricaria chamomilla* (12, 15, 16, 18, 20, 22). Încercările de separare a componentilor săi foarte numeroși, au avut scopul de a stabili fracțiunea responsabilă de această acțiune. Prin cercetările noastre am pus în evidență efectul antimicotic al acestui preparat, care este activ asupra dermatofitilor, levurilor și altor fungi, dar lipsit de acțiune asupra mucegaiurilor.

Deoarece localizarea efectivă a micoze'or superficiale și profunde cuprinde pielea, fanerele și mucoasele, am considerat oportună utilizarea acestui preparat pentru aplicare externă, sub formă de unguent. Intensitatea activității fungistatice, este dependentă de tipul bazei de unguent. Astfel bazele cu polietilenglicoli permit difuziunea intensă a uleiului volatil, la toate ciupercile patogene studiate, în timp ce unele baze hidrofîle anionice sau neionice au avut un efect inhibitor asupra difuziunii și activității fitoncide, fiind chiar fără acțiune asupra *Candidei*. De asemenea difuziunea din geluri de hidrocarburi este bună și apropiată de aceea din hidrogeluri. *Bilups* (2), de asemenea, confirmă efectul pozitiv în testările microbiologice ale hidrogelurilor.

În ultimul timp s-a revenit, în mod repetat, asupra avantajelor multiple ale polietilenglicolelor, printre care se numără: aspectul estetic, utilizarea lor în tratamentul pieii păroase sau sensibile față de grăsimi, sînt lavabile. Higroscopicitatea lor explică tendința spre uscare și acțiunea astringentă, acțiuni care pot fi oprite prin adaos de 10% apă (7, 13, 14, 27), în prezența alcoolului cetilic. După observațiile lui Cox (6) efectuate asupra dezvoltării unor bacterii ca *Escherichia*

coli, *Serratia marcescens*, *Aerobacter aerogenes*, în prezența soluțiilor cu polietilenglicoli diferiți, activitatea inhibitoare pe care ele o exercită este în funcție de greutatea lor moleculară — fiind mai intensă în prezența polietilenglicolilor cu o greutate moleculară joasă (200) — cât și de existența unei concentrații mărite de PEG (peste 30%). PEG-urile cu greutatea moleculară mare pătrund prin membrana bacteriană foarte încet sau deloc, și nu pătrund în citoplasmă, în timp ce PEG-urile cu greutate moleculară joasă sînt capabile să pătrundă prin peretele celular, precipitînd proteinele microbiene, în raport cu concentrația în PEG și pH-ul mediului. Alte studii atestă efectul favorabil al propilenglicolului în soluție, alături de corticosteroidi (17).

Corticoterapia externă s-a impus din ce în ce mai mult în tratamentul micozelor, deși aplicată singură, micșorează capacitatea de apărare locală. Este posibil că unele ciuperci au proprietatea de a modifica steroizii oxidativ sau reductiv (27).

Terbet ca și *Lester* (cit. 27) constată chiar că cortizonul accelerează creșterea fungilor în mediul de cultură, fapt constatat și în experiențele noastre. AHC 3% a părut mai activ, comparativ cu prednisonul în concentrație de 0,23%. Literatura indică (27) că dezoxicorticosteronul 12 mg% este un fungistatic activ. Inhibarea dezvoltării unor dermatofiti ca *Trichophyton rubrum*, sub influența corticosteroidilor, este urmată de o diminuare a capacității de asimilare a glucozei de către miceli.

Utilizarea preparatelor combinate urmărește înlăturarea simptomelor alergice provocate de către corticosteroidi și instalarea unei acțiuni prompte antimicrobiene. *Hopf* (11, 27) susține că unguentele antimicotice cu corticosteroidi sînt superioare unguentelor antimicotice, fapt constatat și de noi atât in vitro, cât și clinic (5, 19).

Hexametilentetramina, care prin hidroliză acidă formează formaldehida, s-a remarcat în studiul nostru printr-o activitate antimicrobică deosebită în asociație cu AHC, ulei volatil și vitamina A în unguent; hidrofii cu polietilenglicoli (fig. nr 5). Singură s-a dovedit inactivă față de *Candida*, după cum constată și *Zimmerman* și *Schönborn* (27), și slab antimicrobică față de *Geotrichum* și *Saccharomyces Ureea* ca și tripsina, utilizate pentru acțiunea lor litică asupra țesuturilor devitalizate și asanarea focarelor purulente (26), au manifestat o slabă acțiune antimicrobică.

Pe baza rezultatelor obținute se constată că, fracțiunea din *Aetheroleum millefolii*, responsabilă în mare parte de activitatea antimicrobică este azulena. Faptul că apare inactivă față de *Candida*, ne convinge că alături de această componentă activă, la efectul antimicrobic contribuie complexul de principii active al uleiului volatil, fără a neglija aportul util al unui preparat complex, combinat, care determină un spectru mai larg și mai intens de eficacitate antifungică.

Concluzii

1. Verificarea acțiunii antimicrobice a uleiului volatil din *Achillea millefolium* in vitro a arătat că este activ în concentrații foarte mici asupra unor ciuperci (levuri, dermatofiti, fungi) și inactiv față de altele.
2. Efectul antimicrobic al uleiului volatil inclus în diferite baze de unguent este favorizat de bazele cu polietilenglicoli.
3. Utilizarea preparatelor combinate antimicrobice cu corticosteroidi, urotropină, azulene, intensifică eficacitatea antifungică.

Sosit la redacție: 17 iulie 1970.

Bibliografie

1. ALTERAS I., COJOCARU I., POPESCU LUCIA, MUSCUREL ELENA: *Produce farmaceutice* (1970), 46; 2. BILLUPS F., NORMAN R., SAGER W.: *American J. of Pharmacy* (1965), 137. 2. 57; 3. BAJUSZ E.: *Die Pharmazie* (1956), 11. 3, 179.

4. BERGER T.: Handbuch der Drogenkunde, Ed. Wilh. Maudrich, Wien, 1949, 243;
5. BUȚIU O., POPOVICI ADRIANA, DONATH ANGELA: Cercetări privind valorificarea unor extracte vegetale și a unor vitamine în tratamentul dermatologic extern. Comunicare U.S.S.M., Secția dermatologie, iunie, 1970;
6. COX S.: J. Gen Microbiol. (1966), 45, 275;
7. CHANDRANNONDNAININIT WINITA, SOMMERS BLANCHE: J. Ph. Sciences (1966), 55, II, 1221;
8. CRIȘAN M.: Practica farmaceutică (1968), 3—4, 55;
9. CSEDÓ C., PÉTER H MARIA, MONYA MARIA: Îndrumător pentru lucrări practice de farmacognozie, Tîrgu Mureș, 1967;
10. GOLDBERG S., CMUELLER EVANGELYNE, EIGEN E., SALVATORE J. DESALVA: J. Ph Science (1969), 58, 8, 938;
11. GEIB R., PANAITESCU GH.: Tratamentul antiinflamator nespecific, Ed. Medicală, București, 1965;
12. GAMMERMAN F.: Manual de farmacognozie, Ed. de Stat pentru lit. științ., București, 1952;
13. GSTIRNER F.: Einführung in die Arzneibereitung, Ed. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft MBH, Stuttgart, 1968;
14. GSTIRNER F.: Pharm. Ztg. (1960), 49, 1438;
15. IURACEC A.: Contribuții la cercetarea valorii curative a mușetelului spontan din România, 1960, 15, 8—12, 500;
16. LIGETI G.: Gyógyszerészet (1959), 9, 331;
17. OLITZKY I.: J. Ph. Sciences (1965), 54, 5, 787;
18. POPOVICI ADRIANA, LUPȘA MARIANA: Rev. Med. (1969), 15, 1, 19;
19. POPOVICI ADRIANA: Contribuții la studiul unor noi formule de unguente de penetrație și de resorbție cu hormoni și vitamine. Teză de doctorat, 1969, Cluj;
20. RÁCZ KOTILLA ELISABETA, RÁCZ G., KOVALSKY E.: Farmacia (1961), 9, 10, 669;
21. RÁCZ KOTILLA ELISABETA: Studiu farmacognostic al speciilor de Achillea din R.P.R., Teză de doctorat, Tîrgu Mureș, 1961;
22. SPECH GH.: Farmacia (1962), 10, 3, 139;
23. SAVOPOL E., BALLIU ȘTEFANIA, BOTEANU SILVIA, COROI SANDA, SETLACEC EUFROSINA: Farmacia (1966), 14, 5, 277;
24. TREIBS W.: Die Pharmazie (1956), 11, 2, 95;
25. TYHÁK E., VÁGUJFALVI D.: Manta Medica (1967), 3, 269;
26. MILEA Z.: Viața Medicală (1970), 17, 8, 361;
27. ZIMMERMANN H., SCHÖNBORN C.: Die Pharmazie (1967), 3, 170