

CZU: 633.822:581.19

ACTIVITATEA BIOLOGICĂ A ULEIURILOR ESENȚIALE DIN FORMELE AUTOHTONE DE *MENTHA SPICATA* L.

Elena PELEAH, Victor MELNIC, Nicolae CIOBANU*, Marina BEJINARI

Universitatea de Stat din Moldova

*Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

Ecotipurile autohtone sălbatice de *Mentha spicata* L. au fost colectate din opt zone diferite și a fost analizată compoziția uleiurilor esențiale. Chemotipurile diferă în compoziția componentelor uleiului esențial și în raportul cantitativ al componentelor. Chemotipurile de mentă au fost împărțite în funcție de componenta principală – sintetizarea carvonei, linaloolului sau mentolei și keto-oxizilor. Chemotipurile studiate au arătat o activitate bactericidă și fungicidă semnificativă.

Cuvinte-cheie: *Mentha spicata* L., componente din uleiuri esențiale, ecotipuri, chemotipuri, activitate bactericidă și fungicidă.

BIOLOGICAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS OF LOCAL FORMS OF *MENTHA SPICATA* L.

Mentha spicata L. collected from eight different regions of Moldova were analysed to determine essential oil constituents. Ecotypes of *M. spicata* L. did show quantitative and qualitative differences. Three mint chemotypes were found, depending on component composition – synthesising carvon, linalool or menthol and keto-oxides as the main components. The studied chemotypes showed significant bactericidal and fungicidal activity.

Keywords: *Mentha spicata* L. components of the essential oils, ecotypes, chemotypes, bactericidal and fungicidal activity.

Introducere

Uleiurile eterice sunt cunoscute încă din timpuri străvechi. Ele s-au folosit la produse medicinale, la fumatul aromatizant. Majoritatea uleiurilor eterice se obțin din plantele tropicale și subtropicale, doar o parte mică din acestea se cultivă în regiunea temperată.

Plantele cu uleiuri esențiale sunt o sursă bogată de compuși biologic activi și, prin urmare, extractele lor posedă activități antimicrobiene [1, p.556; 2, p.76-84; 3, p.14402-14442; 4, p.64-69].

Drept obiect de studiu au servit opt forme de *M. spicata* L. colectate din flora spontană din Moldova. Toate formele de mentă posedă morfologia tipică a *M. spicata* L.: frunzele mici lanceolate verde-aprins fără nuanțe de antociani, pe margini dințato-zămțate. Inflorescențele în verticilii dese, formând aglomerări de verticilii la capătul lăstărilor; culoarea inflorescenței variază de la violet-deschis până la violet-închis. Plantele studiate înfloresc în perioada cuprinsă între sfârșitul lunii iunie și începutul lunii august. Studiul include cercetări biologice, morfologice și biochimice.

Caracterizarea biochimică a uleiului eteric extras din ecotipuri de *Mentha spicata* L.

A fost determinată cantitatea de ulei eteric acumulată în biomasă pe parcursul perioadei de vegetație și compoziția chimică a lui în plantele de *M. spicata* L. [5, p.60-63]. Uleiurile eterice obținute din toate ecotipurile de *M. spicata* L. erau de culoare galbenă-deschis, lichide și se deosebeau prin caracteristica organoleptică.

Numeroase studii au arătat diferența în compoziția uleiului esențial din speciile de mentă care pot fi legate de ecotip, temperatură, fenofază, genotip și de condițiile agronomice [3, p.14402-14424]. Ecotipurile autohtone de *M. spicata* L. au fost diverse în compoziția componentelor uleiului esențial, diferit semnificativ de cele descrise în literatură [6, p.192-202; 7, p.425-430; 8, p.721-728].

Pentru a testa activitatea antimicrobiană a uleiului esențial de *M. spicata* L. s-au folosit chemotipuri care diferă în compoziția componentelor uleiului esențial, acestea fiind colectate din populațiile naturale din apropierea satelor Logănești, Slobozia și Bahmut (Tab.1).

Tabelul 1

Principalele caracteristici ale uleiurilor esențiale de ecotipuri de *M. spicata* L.

Denumirea ecotipului	Ponderea de ulei, %	Componentul principal, %					
		monoterpeni	linalool	carvonă	mentol	piperiton-oxid	piperitenon-oxid
„Logănești”	1.1	10.3	62,5	-	-	-	-
„Slobozia”	1.92	3.2	-	-	10.0	14.8	53.6
„Bahmut”	2.02	9,6	-	80.3	-	-	-

Determinarea activității antimicrobiene a uleiului extras din plantele genului *Mentha*

La evaluarea activității antimicrobiene am recurs la metoda alveolelor [9, p.464]. Aceasta se efectuează pe mediu solid, în cutii Petri, pe care s-a însămânțat cultura bacteriană; apoi pe suprafața mediului formăm alveole cu diametrul standard de 10 mm, în care se introduce cantitatea de soluție pe care dorim să o testăm, astfel că în jurul alveolelor se va realiza un gradient de concentrație prin difuziunea locală a antibioticului. În imediata vecinătate a alveolei realizându-se o concentrație mai mare de antibiotic care descrește în urma îndepărtării de alveolă [10, p.152-154]. Datele experimentale au fost prelucrate cu determinarea mărimilor statistice medii.

Cultivarea micromicetelor a fost efectuată în cutii Petri pe mediu mineral agarizat Chapek cu următoarea compoziție (g /L): NaNO_3 – 2,0; K_2HPO_4 –1,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; KCl – 0,5; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; glucoză – 20,0; apă distilată până la 1 L, pH 5,5 – 5,7.

Cultivarea bacteriilor a fost efectuată în cutii Petri pe mediu agar nutrient – 28 g la 1 L apă distilată (pH 6,3 – 6,5).

Interpretarea se face în funcție de diametrul zonelor de inhibiție, care au fost măsurate cu rigla incluzând și diametrul alveolei. Valorile citite în mm se compară conform gradației Birgher [9, p.464], tulpinile bacteriene și fungice apreciindu-se ca sensibile, intermediar sensibile și rezistente la antibiotic. Diametrul zonelor de liză a celulelor în jurul alveolelor depinde de gradul sensibilității test-culturilor la antibiotice conform gradației Birgher [9, p.464; 10, p.152-154].

Pentru testarea activității biologice a uleiului esențial din plantele de mentă am recurs la un set de micro-organisme fitopatogene:

Bacterii:

1. *Xanthomonas campestris* (care produce bacterioza verzei);
2. *Corynebacterium michiganense* (care produce cancerul bacterian la tomate);
3. *Agrobacterium tumefaciens* (care produce cancerul radicular la vița-de-vie și la pomii fructiferi);
4. *Erwinia carotovora* (care produce putregaiul moale bacterian).

Micromicete:

5. *Fusarium graminearum* (care produc înroșirea și sterilitatea spicelor de cereale);
6. *Alternaria alternata* (care produce deprimarea plantelor).

În calitate de antibiotic am cercetat:

1. Uleiul extras din plantele de *Mentha spicata* L. (sat. Logănești) cu componentul principal linalool;
2. Uleiul extras din plantele de *Mentha spicata* L. (sat. Slobozia) cu componentul principal ceto-oxizi;
3. Uleiul extras din plantele de *Mentha spicata* L. (sat. Bahmut) cu componentul principal carvonă.
4. Uleiul extras din plantele soiului de mentă „USIGEN” cu componentul principal mentol.
5. Neomicina – antibiotic cu activitate puternică asupra bacteriilor gram-pozitiv și gram- negativ.

În calitate de martor a fost utilizată apa distilată.

Descrierea experienței

Am testat 3 uleiuri eterice extrase din plantele de *Mentha spicata* L. chemotipuri autohtone și soiul de mentă „USIGEN” cu diferite componente principale, și anume: mentol, ceto-oxizi, carvonă și linalool.

Cultura tânără (18-20 zile) de bacterii fitopatogene (*Xanthomonas campestris*, *Corynebacterium michiganense*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*) a fost însămânțată pe mediu nutritiv lichifiat. Din eprubeta cu cultură a fost luată o cantitate de biomasă și s-a făcut o suspensie cu o concentrație apropiată de standard de turbiditate 10 (aproximativ 1 miliard de celule pe 1 mililitru de suspensie). Suspensia a fost adăugată în balonul de sticlă cu mediu nutritiv lichifiat și răcorit până la temperatura de 37-40°C, după care se omogenează prin rotire și se toarnă pe placa Petri. După solidificarea mediului agarizat se fac alveolele cu diametrul de 10 mm.

Într-o cutie Petri s-au făcut câte 6 alveole în care s-au plasat: 1 – martorul, apă distilată; 2 – ulei eteric de mentă 100%. Cantitatea de substanță introdusă într-o alveolă a constituit 0,1 ml. Experiența a fost efectuată în 3 repetiții.

După introducerea soluțiilor, cutiile Petri au fost plasate în camera de refrigerare pentru 16-18 h pentru difuzia preparatului în mediu. După această perioadă de timp cutiile Petri au fost transferate în termostat la temperatura de 28°C.

Zonele de inhibiție a bacteriilor fitopatogene au fost măsurate după 24 de ore și 192 de ore (aceste măsurări au permis evidențierea efectului de durată) de incubare.

Tabelul 2

Sensibilitatea microorganismelor fitopatogene la uleiul esențial extras din plantele de *M. spicata* L. peste 24 de ore de incubație

Tulpina	Sensibilitatea, mm				
	Ecotipul „Logănești”	Ecotipul „Slobozia”	Ecotipul „Bahmut”	Soiul „USIGEN”	Martorul
<i>Ervinia carotovora</i>	15,6 ± 0,5	28,2 ± 3,1	15,0 ± 0,0	14,5 ± 0,5	0,0
<i>Xanthomonas campestris</i>	17,0 ± 1,0	32,1 ± 0,7	16,0 ± 0,0	15,0 ± 0,2	0,0
<i>Corynebacterium michiganense</i>	19,0 ± 0,0	34,5 ± 2,5	17,1 ± 1,6	16,8 ± 0,7	0,0
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15,3 ± 0,5	32,0 ± 1,0	16,0 ± 1,3	13,8 ± 0,7	0,0
<i>Fusarium graminearum</i>	i.c.	i.c.	i.c.	i.c.	0,0
<i>Alternaria alternata</i>	i.c.	i.c.	i.c.	i.c.	0,0

i.c. – inhibiție completă

Conform datelor din Tabelul 2, o activitate inhibitorie după 24 de ore de incubație a microorganismelor au prezentat toate uleiurile eterice extrase din plantele de mentă. Însă, cel mai puternic efect bactericid a prezentat uleiul extras de *M. spicata* L. (sat. Slobozia), urmat de uleiul din *M. spicata* L. (sat. Logănești și sat. Bahmut); o activitate bactericidă mai puțin semnificativă a prezentat uleiul eteric din mentă „USIGEN”.

Uleiul eteric extras din *M. spicata* L. ecotipul „Slobozia” a prezentat cea mai puternică activitate antimicrobiană față de toate culturile testate, diametrul zonelor de inhibiție variind de la 28,2±3,1 mm până la 34,5±2,5 mm. Uleiul esențial de *M. longifolia* (L.) Huds, cu principalele componente oxizi de piperitone și piperitenone are, de asemenea, un efect bactericid [2, p.76-84]. Cea mai rezistentă cultură la acest ulei a fost *Ervinia carotovora*, cea mai sensibilă la acest ulei eteric a fost cultura de *Corynebacterium michiganense* (34,5±2,5 mm). Acest ulei eteric a prezentat o activitate bactericidă la doar 24 h depășind antibioticul de referință în medie cu 4-5 mm; deci, uleiul eteric poate fi folosit ca ingredient la fabricarea biopreparatelor de uz fitosanitar. O activitate bactericidă puternică a prezentat și uleiul eteric extras din *M. spicata* L. chemotipul „Logănești”, cea mai rezistentă cultură la acest ulei fiind cultura de *Ervinia carotovora* (15,6±0,5 mm), rezistență a prezentat și cultura de *Agrobacterium tumefaciens* (15,3±0,5 mm), iar cele sensibile fiind tulpina de *Xanthomonas campestris* (17,0±1,0 mm) și de *Corynebacterium michiganense* (19,0±1,0 mm). Rezultate mai puțin semnificative au fost înregistrate la uleiurile extrase din plantele de *M. spicata* L. ecotipul „Bahmut” și din soiul de mentă „USIGEN”, diametrul zonelor de inhibiție variind în limite foarte mici – de la 13,8± 0,7 mm până la 17,1 ± 1,6 mm.

Datele examinării relevă faptul că toate extractele au prezentat activitate fungicidă puternică în masă asupra culturilor de microfungi *Fusarium graminearum* și *Alternaria alternata*. Cultura în care a fost plasat martorul a prezentat o activitate vitală normală (Fig.1,2).

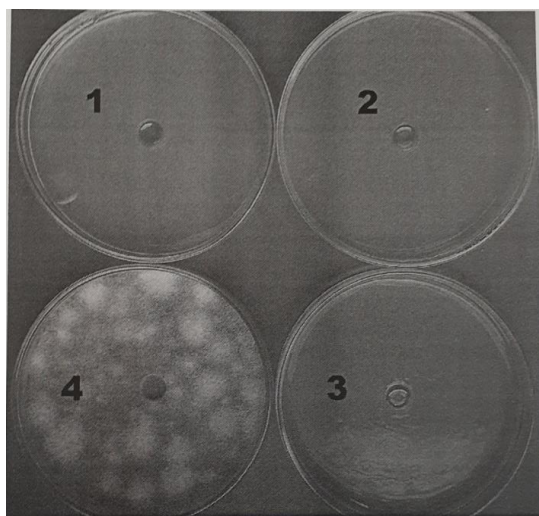


Fig.1. Efectul fungicid produs de uleiurile eterice din *M. spicata* L. asupra micromicetelor *Alternaria alternata*. Uleiul extras din plantele de *M. spicata* L.: 1 – ecotipul „Slobozia” cu componente principale oxizi de piperitonă și piperitenonă; 2 – ecotipul „Bahmut” cu componentul principal carvonă; 3 – ecotipul „Logănești” cu componentul principal linalool; 4 – martor, apă distilată.

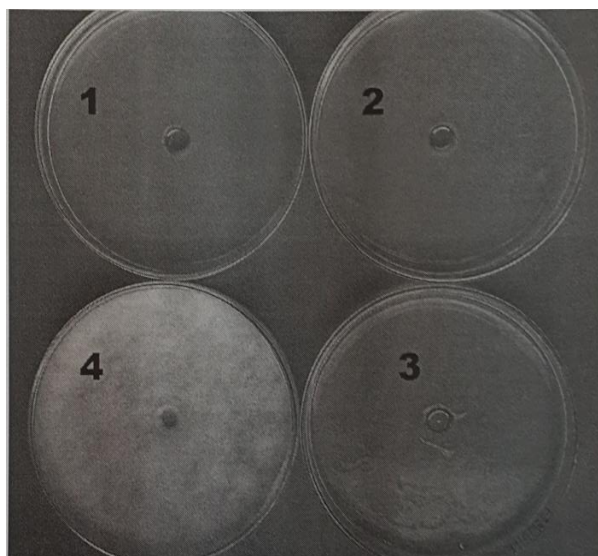


Fig. 2. Efectul fungicid produs de uleiurile eterice din *M. spicata* L. asupra micromicetelor *Fusarium graminearum*: 1 – ecotipul „Slobozia”, cu componente principale oxizi de piperitonă și piperitenonă; 2 – ecotipul „Bahmut” cu componentul principal carvonă; 3 – ecotipul „Logănești” cu componentul principal linalool; 4 – martor, apă distilată.

După 192 de ore de incubare a microorganismelor schimbări semnificative nu au fost înregistrate. Diametrul zonelor de inhibiție s-a micșorat nesemnificativ – în medie cu 0,5-1,0 mm.

Tabelul 3

Sensibilitatea microorganismelor fitopatogene la uleiul eteric de *M. spicata* L. peste 192 de ore de incubație

Tulpina	Sensibilitatea, mm				
	Ecotipul „Logănești”	Ecotipul „Slobozia”	Ecotipul „Bahmut”	Soiul „USIGEN”	Martorul
<i>Ervinia carotovora</i>	16,0± 1,59	27,00± 6,75	14,33± 0,92	12,00 ±0,00	0,0
<i>Xanthomonas campestris</i>	18,0± 3,18	32,00± 1,59	16,33± 0,92	20,33± 6,02	0,0
<i>Corynebacterium michiganense</i>	20,33± 0,92	34,00± 3,18	17,00± 0,00	12,67± 3,31	0,0
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	20,00 ±0,00	31,33 ±0,92	14,00± 1,59	13,67± 1,84	0,0
<i>Fusarium graminearum</i>	i.c.	i.c.	i.c.	i.c.	0,0
<i>Alternaria alternata</i>	i.c.	i.c.	i.c.	i.c.	0,0

i.c. – inhibiție completă

Mici excepții au fost înregistrate la acțiunea uleiului extras din *M. spicata* L. (ecotipul „Logănești”), diametrul zonei de liză s-a extins cu 5 mm. La fel a fost înregistrată acțiunea de durată la uleiul eteric din soiul „USIGEN” asupra tulpinii de *Xanthomonas campestris*, diametrul zonei de liză s-a extins de la 15,0±0,2 mm până la 20,33± 6,02 mm.

La micromicete nu a fost înregistrată nicio schimbare, activitatea vitală fiind inhibată totalmente.

Conform datelor noastre, cea mai rezistentă cultură la uleiuri eterice a fost *Erwinia carotovora*, cele mai sensibile culturi fiind *Corynebacterium michiganense* și *Agrobacterium tumefaciens*. Sensibilitate medie a prezentat tulpina de *Xanthomonas campestris* la toate uleiurile eterice de chemotipuri de *M. spicata* L.

Deci, aceste uleiuri pot fi utilizate pe parcurs în cercetările de câmp pentru combaterea microorganismelor fitopatogene care atacă culturile agricole. Rezultatele prezentei investigații sugerează că cele mai multe dintre plantele studiate pot fi o bună sursă de agenți antibacterieni, în special față de tulpini bacteriene fitopatogene, putând constitui alternative ale antibioticelor în tratamentul infecțiilor cu aceste tulpini.

Concluzii

1. A fost stabilit că compoziția chimică a uleiurilor eterice nu depinde de condițiile pedoclimatice. Forme din diferite zone ecologice sintetizează uleiuri eterice cu o compoziție chimică identică, și invers: forme din aceeași zonă se deosebesc după setul de terpenoizi.

2. Toate formele autohtone de *Mentha spicata* L. studiate posedă aspect morfologic tipic speciei *Mentha spicata* L., în timp ce după setul de terpenoizi pe care îi sintetizează au fost împărțite în 3 grupe: a) cu component principal linalool și linalilacetat; b) cu carvonă și derivații ei; c) cu mentol, menton și ceto-oxizi (piperiton-oxid și piperitenon-oxid).
3. Testarea activității biologice a uleiurilor eterice din plantele studiate *Mentha spicata* L. (colectate din sat. Logănești, Slobozia și Bahmut) și din soiul de mentă „USIGEN” a demonstrat că acestea prezintă activitate fungică și bacterică puternică.
4. Uleiul eteric extras din ecotipurile autohtone de *M. spicata* L. studiate poate fi folosit ca ingredient la fabricarea biopreparatelor de uz fitosanitar, cosmetic și a produselor chimice de uz casnic.

Referințe:

1. LAURENCE, M. *Mint – the Genus Mentha. Medicinal and Aromatic Plants – industrial profiles*. CRC Press Taylor and Francis group, 2007. 556 p.
2. SHAROPOV, F.S., SULAIMONOVA, V.A., SETZER, W.N. Essential Oil Composition of *Mentha longifolia* from Wild Population Growing in Tajikistan. In: *J. of Medicinally Activ Plants*, 2012, vol.1, no.2, p.76-84.
3. SNOUSSI, M., NOUMI, E., TRABELSI, N., FLAMINI, G., PAPETTI, A., DE FEO, V. *Mentha spicata* Essential oil: Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities against Planktonic and Biofilm Cultures of *Vibrio* ssp. Strains. In: *Molecules*, 2015, vol.20, no.8, p.4402-4424.
4. BAYAN, Y., KUSEK. Chemical Composition and Antifungal and Antibacterial activities of *M. spicata* L. Volatil Oil. In: *Cien. Inv. Agr.*, 2018, vol.45, no.1, p.64-69.
5. PELEAH, E., MELNIC, V., DRAGALIN, I. Polichimismul intraspecific *Mentha spicata* L. In: *Studia Universitatis Moldaviae. Seria Științe Reale și ale Naturii*, 2020, nr.6 (136), p.60-63.
6. KOKKINI, S., VOKOU, D. *Mentha spicata* (Lamiaceae) Chemotypes Growing Wild in Greece. In: *Economic Botany*, 1989, no.43, p.192-202.
7. KOKKIMI, S., KARASOULOU, R., LANARIS, T. Essential oils of spearmint (carvon-rich) plants from the island of Crete (Greece). In: *Biochem. Syst. Ecol.*, 1995, no.23, p.425-430.
8. TELCI, I., SAHBAZ, N., YILMAZ, G., TUGAY, M. Agronomical and chemical characterization of spearmint (*M.spicata* L.) originating in Turkey. In: *Econom. Bit.*, 2004, no.58, p.721-728.
9. *Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования* (Под ред. Биргера М.О.), Москва, Медицина, 1982. 464 с.
10. ХАДЖИЕВА, З.Д., ТЕУНОВА, Е.А., КРАХМАЛЕВ, И.С. Изучение антимикробной активности лекарственных препаратов с фитоэкстрактом. В: *Fundamental Research*, 2010, no.11, p.152-154.

Notă: Lucrarea a fost efectuată în cadrul Proiectului instituțional 20.80009.8007.24 *Studiul biologic și fitochimic al plantelor medicinale cu acțiune antioxidantă, antimicrobiană și hepatoprotectoare*.

Mulțumim personalului Institutului de Microbiologie și Biotehnologie al Academiei de Științe a Moldovei pentru asistența metodologică în determinarea activității antimicrobiene a uleiurilor esențiale.

Date despre autori:

Elena PELEAH, doctor în biologie, cercetător conferențiar, Universitatea de Stat din Moldova.

E-mail: elena.peleah@gmail.com

ORCID: 0000-0001-7825-2273

Victor MELNIC, doctor în biologie, cercetător conferențiar, Universitatea de Stat din Moldova.

E-mail: victoras74@mail.ru

ORCID: 0000-0002-9625-1693

Nicolae CIOBANU, doctor în științe farmaceutice, conferențiar universitar, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”.

E-mail: nicolae.ciobanu@usmf.md

ORCID: 0000-0002-2774-6668

Marina BEJINARI, licențiat în masterat, Universitatea de Stat din Moldova.

E-mail: marina.bejinari@gmail.com

ORCID: 0000-0002-0566-7299

Prezentat la 07.04.2021