



4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale

Efectuat în cadrul proiectului *Abordarea bioeconomică a agenților antimicrobieni – utilizare și rezistență*

(cod - PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0361).

Etapa 2020

Colectiv de cercetare: med.vet.dr.Obistoiu Diana, prof.dr. Alexa Ersilia, conf.dr. Nicolin Alma, Tripon Roberta, Bosioc Petrică, Bosioc Florentina, Pîrlițeanu Monica, Zevedei Paul, Blaj Adrian.

Coordonator: conf.dr.ing. Tulcan Camelia

1. INTRODUCERE

Având în vedere evoluțiile realizate în domeniul științific, proprietățile medicinale ale plantelor au atras un mare interes datorită toxicității lor scăzute, a activității lor farmacologice și a viabilității economice. Studiile s-au concentrat asupra beneficiilor produselor fitochimice extrase din plante și asupra efectului acestora asupra sănătății umane. (Chouhan et al., 2017)

În ultima vreme, a existat o creștere a interesului industriei alimentare și farmaceutice față de compușii naturali, fie pentru folosirea lor directă, fie pentru utilizarea lor în sinergie cu alți compuși. S-a raportat că adăugarea directă de produse naturale (uleiuri sau extracte) ale unor plante aromatice în produsele alimentare sau medicamente exercită un efect antioxidant și/sau antimicrobian (Costa et al., 2015), fapt datorat, în parte, proprietăților de captare a radicalilor liberi ale acestora (Orhan et al., 2012, Al-Bayati, 2008).

Utilizarea masivă a antibioticelor a avut ca rezultat apariția rezistenței microorganismelor, ceea ce reprezintă o altă problemă care afectează sănătatea publică. *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus* coagulazo-negativ, *Shigella*, *Enterococcus spp.* și *Escherichia coli* se numără printre principalele bacterii care au dezvoltat această rezistență. Acest lucru a condus la o creștere masivă a cererii de noi antibiotice împotriva acestor agenți patogeni și s-a dezvoltat un nou interes exercitat de către comunitatea științifică pentru utilizarea medicamentelor din plante cu proprietăți antimicrobiene.

Plantele și altele sursele naturale pot oferi o gamă largă de compuși complecși și diferiți din punct de vedere structural. Extractele din plante și uleiurile esențiale prezintă o serie de proprietăți: antifungice, antibacteriene și antivirale. Acestea au fost analizate la scară globală ca surse potențiale de noi compuși antimicrobieni, agenți care promovează conservarea alimentelor și alternative pentru tratarea bolilor infecțioase (Mostafa et al., 2018, Stefanović et al., 2015).

Staphylococcus aureus este un bine cunoscut agent patogen transmis prin alimente și este implicat în numeroase focare nosocomiale și asociate comunității (CA) la nivel mondial (Paterson și colab., 2014). Utilizarea pe scară largă a antibioticelor, în special utilizarea inadecvată sau utilizarea excesivă, a facilitat apariția agenților patogeni rezistenți la antibiotice, cum ar fi *S. aureus* rezistent la meticilină (MRSA).

Stafilococul auriu rezistent la meticilină (SARM) este unul dintre cei mai de succes agenți patogeni moderni, fiind o cauză principală a bacteriemiei, endocarditei, infecțiilor pielii și țesuturilor moi, infecțiilor osoase și cele ale articulațiilor și infecțiilor nosocomiale. Deși incidența sa a scăzut recent, MRSA reprezintă în continuare o amenințare clinică formidabilă, cu o morbiditate și mortalitate persistent ridicate. Tratamentul de succes rămâne o provocare și necesită evaluarea atât a unor produși antimicrobieni noi, cât și a unor produși adjuvanți noi sub aspectul îngrijirii. În această revizuire, oferim o imagine de ansamblu a cercetărilor MRSA de bază și clinice și rezumăm corpul vast de literatură despre epidemiologie, transmitere, diversitate genetică, evoluție, supraveghere și tratament al MRSA (Rodríguez-Lázaro et al., 2017).

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale

E. coli este specia tip din genul *Escherichia*, care conține în principal bacili gram negativi mobili din familia *Enterobacteriaceae*, genul *Escherichia* (Wasiński et al., 2019).

Escherichia coli este un agent patogen extrem de comun și complex, o bacterie Gram-negativă care se găsește frecvent ca și comensal în microbiota umană. Cu toate acestea, plasticitatea genomului său a condus la evoluția acestui organism în tulpini patogene capabile să provoace boli și sindroame de importanță pentru sănătatea publică a oamenilor și a animalelor. *E. coli* patogen este în principal împărțit în două grupe în funcție de localizarea bolii: *E. coli patogen extraintestinal* (ExPEC) și *E. coli patogen intestinal* (InPEC) (Rojas-Lopez et al., 2019).

E. coli patogen extraintestinal este cea mai frecventă specie izolată în laboratoarele clinice de microbiologie și este principala cauză a infecțiilor de tract urinar (ITU), cu milioane de cazuri și miliarde de dolari în costuri asociate asistenței medicale anual în SUA (Sarowska et al., 2019, Russo & Johnson 2003). Deși *E. coli* este cel mai strâns legat de ITU, poate infecta orice loc extraintestinal, provocând meningită, infecții ale structurii pielii, miozită, osteomielită și epididim-orhită. Infecțiile severe cu *E. coli*, care implică adesea infecții ale fluxului sanguin (în cazul cărora *E. coli* reprezintă cauza principală), duc frecvent la sindromul de răspuns inflamator sistemic (SIRS), contribuind la aproximativ 40 000 de decese anual în SUA (Russo & Johnson 2003).

2. EVALUAREA EFECTULUI ANTIMICROBIAN AL EXTRACTELOR ALCOOLICE

A. Mod de lucru

Testarea *in vitro* a probelor s-a realizat pe tulpini ATCC din colecția Laboratorului de Microbiologie din Platforma de Cercetare Interdisciplinara USAMVBT, și anume, pe *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) și *Escherichia coli* (ATCC 25922). Tulpinile ATCC utilizate au fost revigorate prin creștere peste noapte în bulionul Brain-Heart Infusion (BHI) (Oxoid, CM1135), la 37°C. Tulpinile au fost apoi diluate la o densitate optică (OD) de 0,5 McFarland standard (1,5 x 10⁸ UFC / ml) utilizând bulionul BHI.

Suspensiile rezultate de 10⁻³ de cultură proaspătă au fost testate folosind o placă de microdiluție de 96 de godeuri, cu fund plat, cu un volum utilizabil de 200 μl.

Folosind o pipetă multi-canal digital Calibra 852, 100 μl de suspensie au fost plasați în fiecare godeu. Peste fiecare godeu cu suspensie, proba a fost utilizată direct, introducând 50 și 100 μl din cele 23 de extracte în fiecare godeu. Pentru o cât mai corectă evaluare a densității optice, s-a determinat DO pentru fiecare dintre extractele testate, la concentrațiile evaluate, acestea fiind DO (Determinarea Orb). Evaluarea DO, s-a realizat prin introducerea a 25, 50, 75 și 100 μl în 100 μl de apă distilată sterilă, iar DO (densitatea optică) a fost determinată la 540 nm folosind un cititor ELISA (BIORAD PR 1100).

S-a realizat o citire inițială denumiă ulterior în interpretari T0. Plăcile au fost acoperite și lăsate peste noapte la 37°C, apoi s-a măsurat DO care în interpretari este notată T24. Au fost efectuate teste triple pentru fiecare probă.

Consecutiv evaluării eficacității extractelor individuale, au fost alese cele mai eficiente trei extracte, iar soluțiile rezultate din diferitele lor combinații au fost testate din nou, pentru a evalua sinergismul sau antagonismul lor asupra tulpinilor ATCC.

Combinațiile au fost realizate între extractele 12, 16 și 18, iar cantitățile testate au fost de 25, 50, 75 și 100 μl, în raport de 1:1 în cazul combinării a doua extracte sau 1:1:1 în cazul combinării celor 3 extracte.

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale

Și în cazul acesta a fost determinată DO, valoare care a fost scăzută din valorile T0 și T24 obținute ulterior.

Suspensiile de tulpină în BHI au fost utilizate ca și control pozitiv, iar rezultatele au fost calculate astfel:

T0-DOTO/T24-DOT24

T0=media a trei determinari inițiale

T24= media a trei determinari după 24 de ore

DO= OD a extractelor simple în apa distilată

Apoi, pentru fiecare T s-a determinat MGR și MIR (MGR= rata de creștere microbiana; MIR= rata de inhibare microbiana), utilizand formulele:

$MGR (\%) = (OD \text{ proba} / OD \text{ control}) \times 100$

$MIR (\%) = 100 - MGR (\%)$

Au fost determinate MGRT0 (MGR1) și MGRT24 (MGR2), precum și MIRT0 (MIR1) și MIRT24 (MIR2), pentru a se evidenția evoluția în timp a eficacității extractelor și combinațiilor testate. Au fost analizate 23 de extracte.

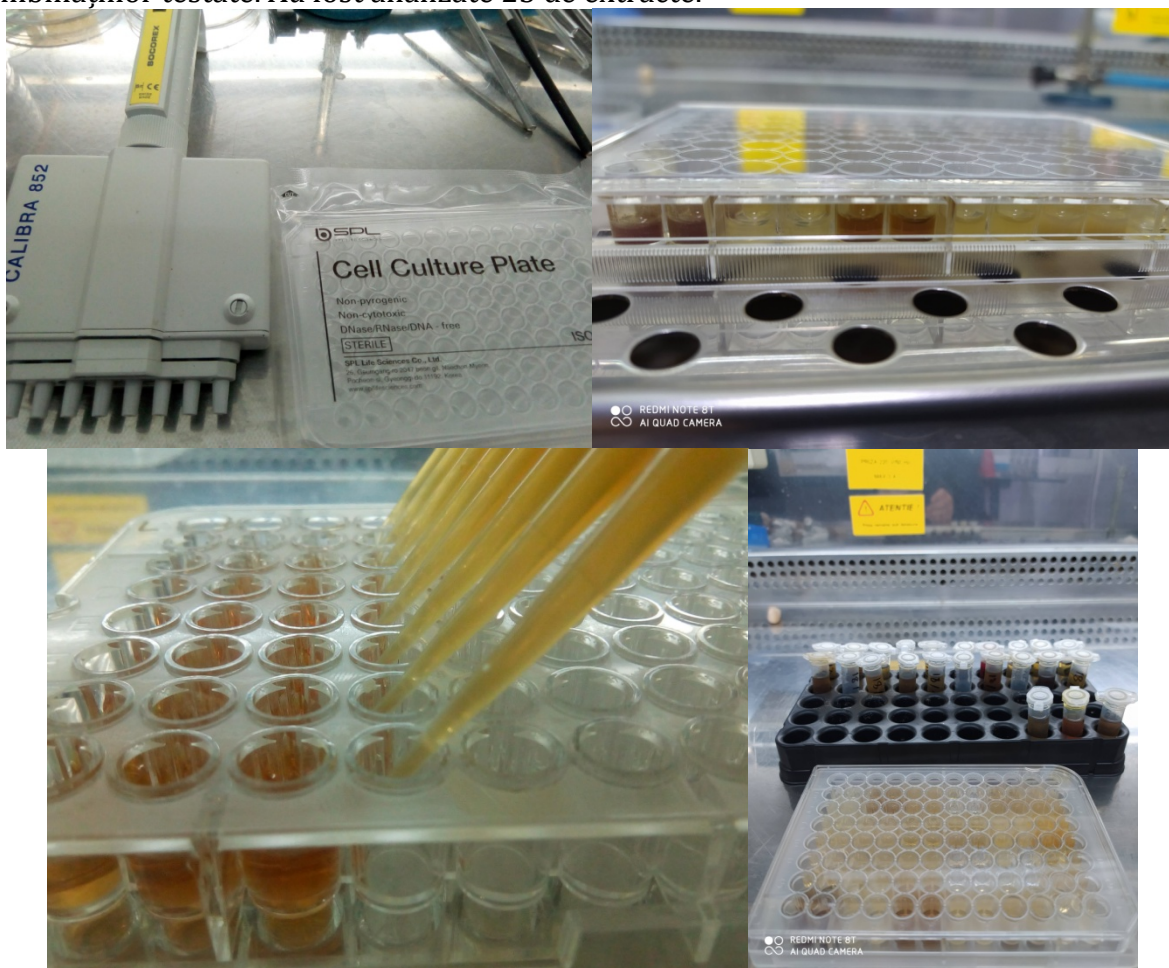


Figura 1. Activitatea în laborator

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale

b. Rezultate experimentale activitate antibacteriană

În figurile 2-15 sunt prezentate datele obținute cu privire la activitatea antimicrobiană, exprimată ca și rată de creștere a microorganismelor (MGR%) respectiv rata de inhibare (MIR%) pentru extractele analizate (probele 1-23) precum și pentru amestecurile binare și terțiare ale celor mai eficiente extracte împotriva dezvoltării *E. coli* și *S. aureus*.

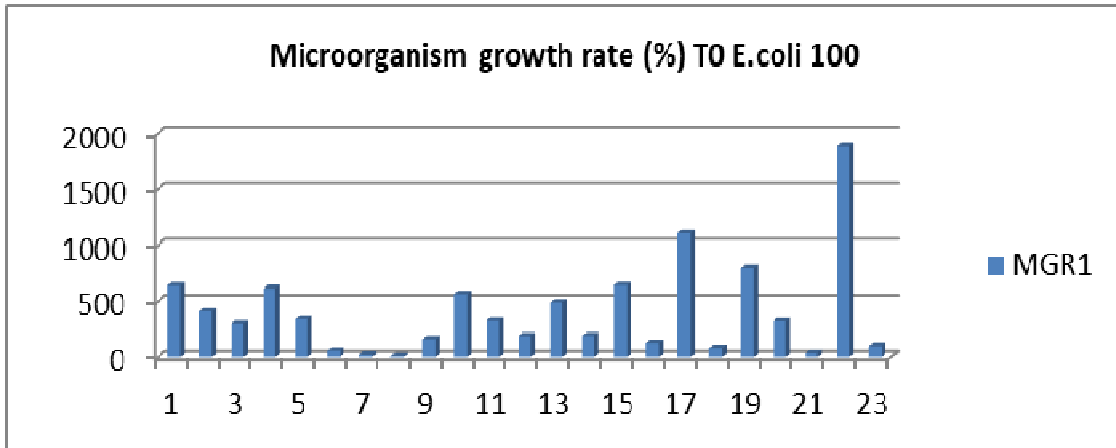


Figura 2. Rata de creștere (MGR) a E. coli inițial (T0)

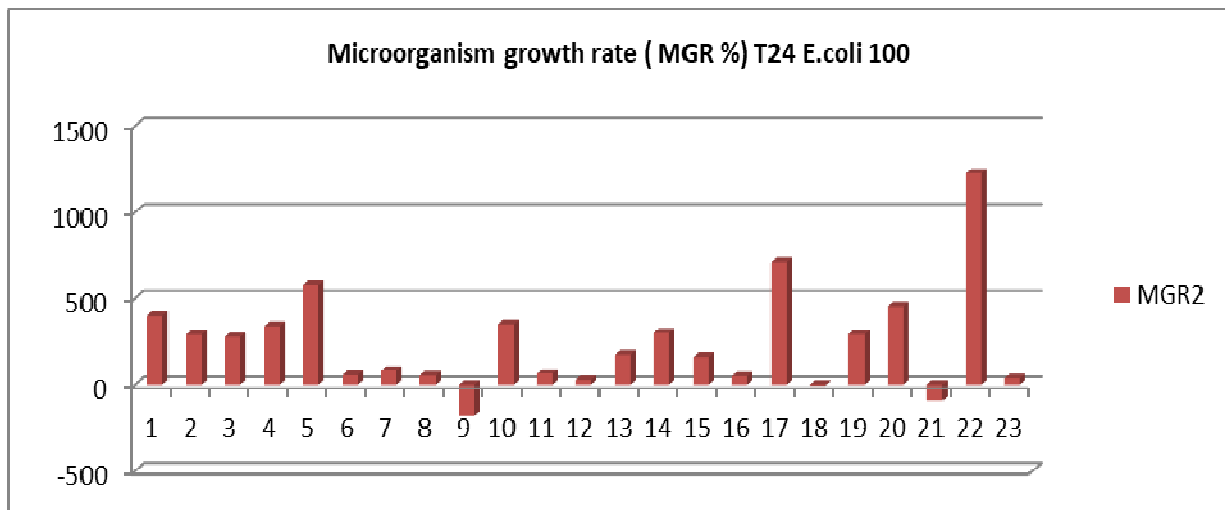


Figura 3. Rata de creștere (MGR) a E.coli după 24 ore (T24)

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale

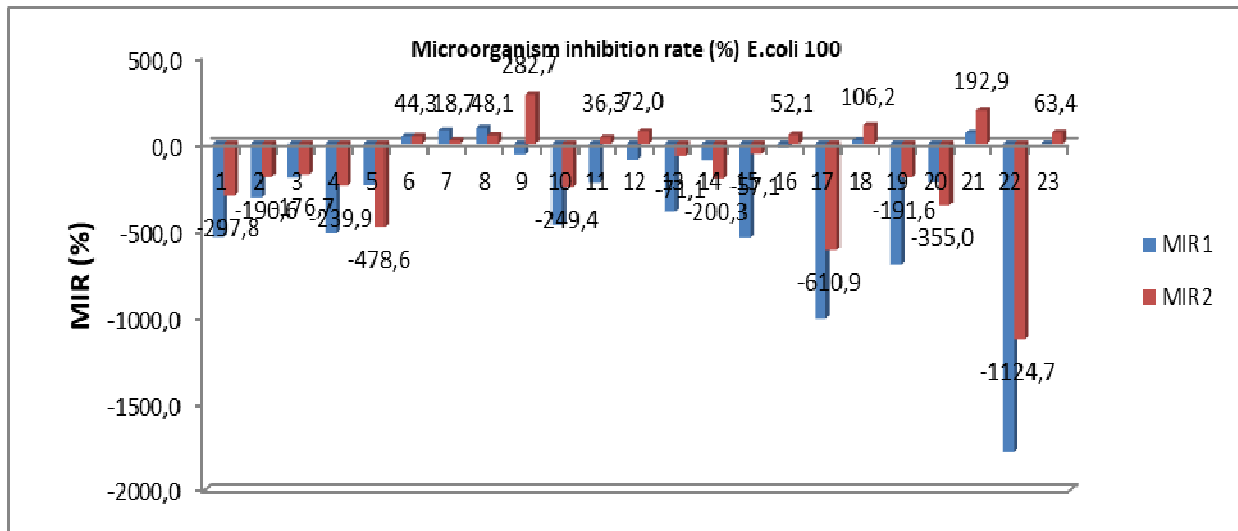


Figura 4. Rata de inhibiție (MRI) a *E.coli* inițial (T0) și după 24 ore (T24) de la aplicarea celor 100 microlitri de extract

La aplicarea celor 100 microlitri extract, se observă faptul că extractele 6-8, 16, 18, 21 și 23 prezintă o rată de inhibare pozitivă, comparativ cu martorul (BHI) pentru care rata de inhibare se consideră zero, atât pentru timpul T0, cât și după 24 de ore de la aplicarea tratamentului. O rată de inhibare ridicată (peste 100%) se înregistrează în cazul extractelor 9, 18 și 21 după 24 ore. Extractele 9, 11, 12 prezintă inhibare doar după 24 de ore de la aplicare.

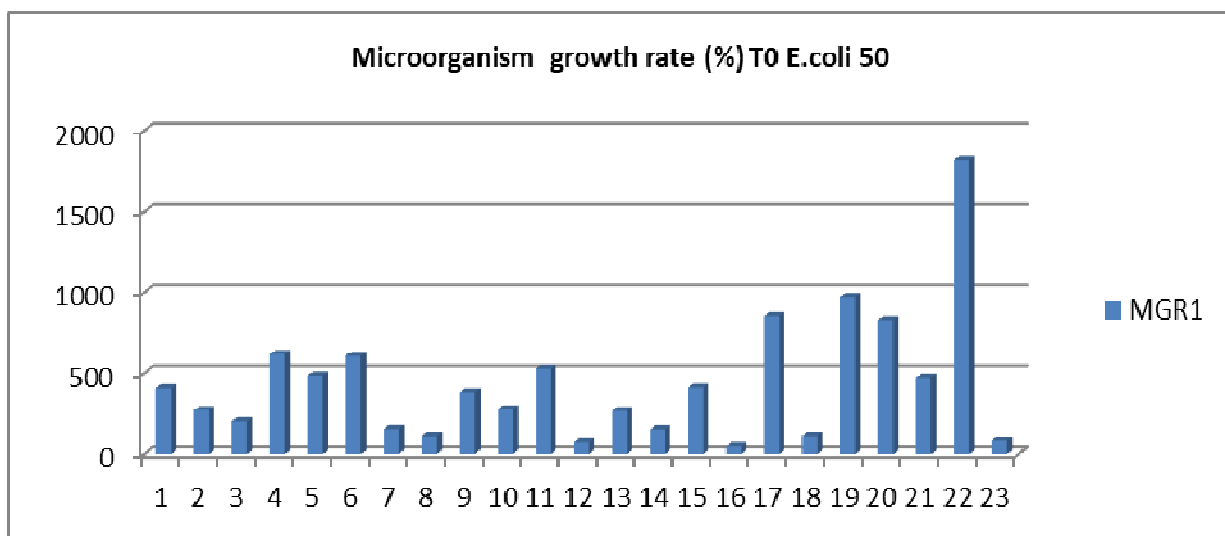


Figura 5. Rata de creștere (MGR) a *E. coli* după 24 ore (T24)

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale

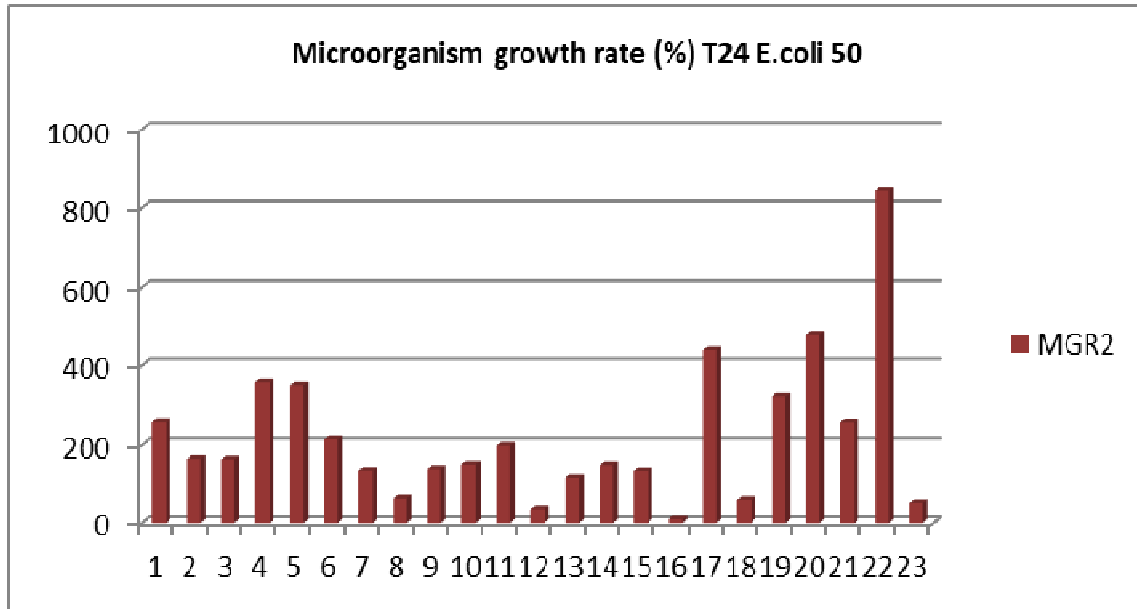


Figura 6. Rata de creștere (MGR) a *E. coli* după 24 ore (T24)

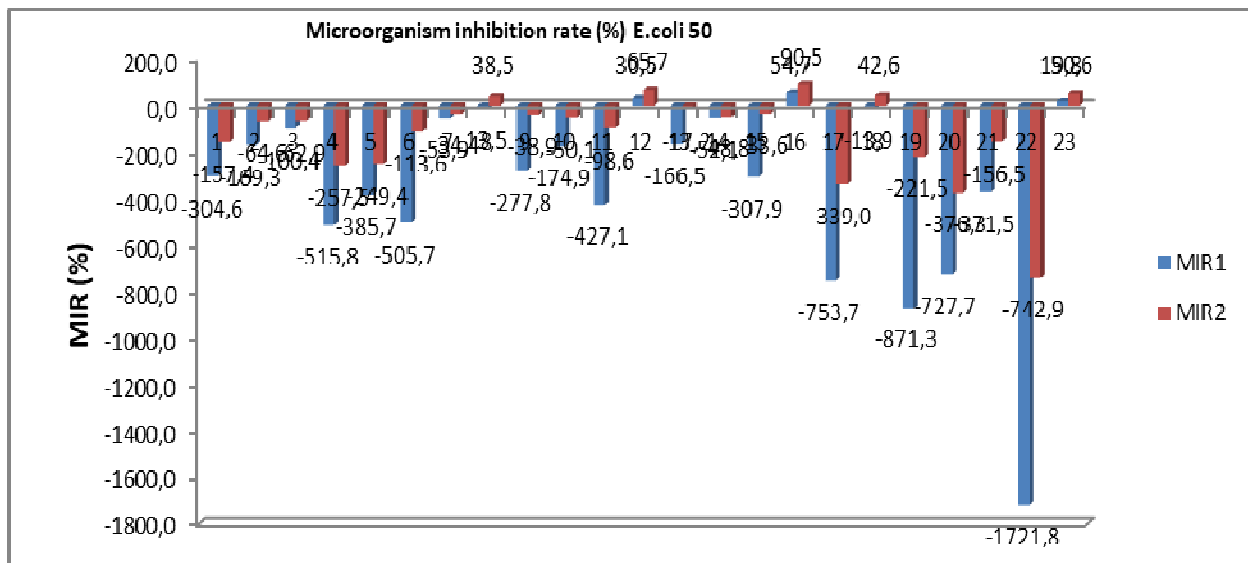


Figura 7. Rata de inhibitie (MRI) a *E.coli* după 24 ore (T24) la aplicarea a 50 microlitri extracte

Tratamentul cu 50 microlitri extracte aplicate conduce la efecte inhibitorii asupra *E. coli* numai în cazul extractelor 8, 12, 16, 18 și 23, atât la timpul T0, cât și după 24 ore de la aplicare. Celelalte extracte se remarcă printr-o potențare a dezvoltării micelare în cazul *E. coli*.

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale

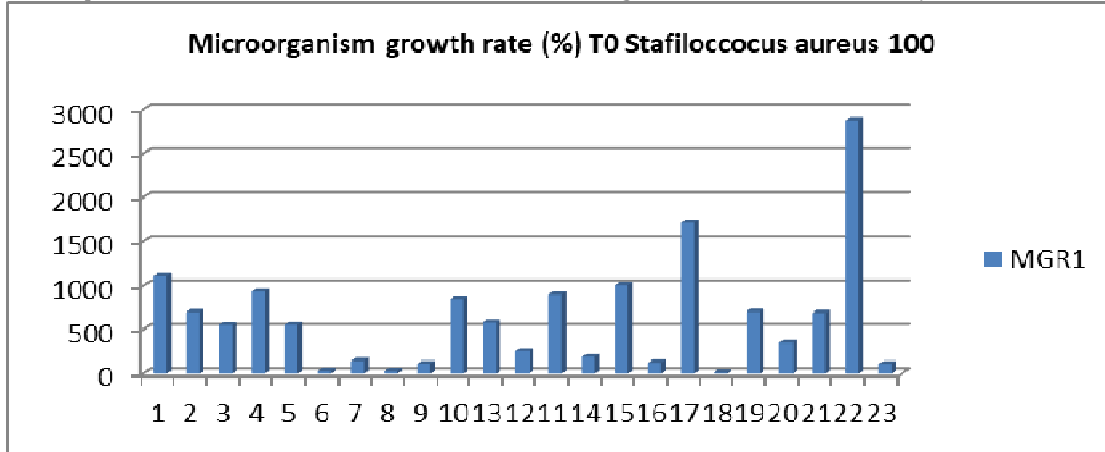


Figura 8. Rata de dezvoltare micelară (MGR) a S. aureus initial (T0)

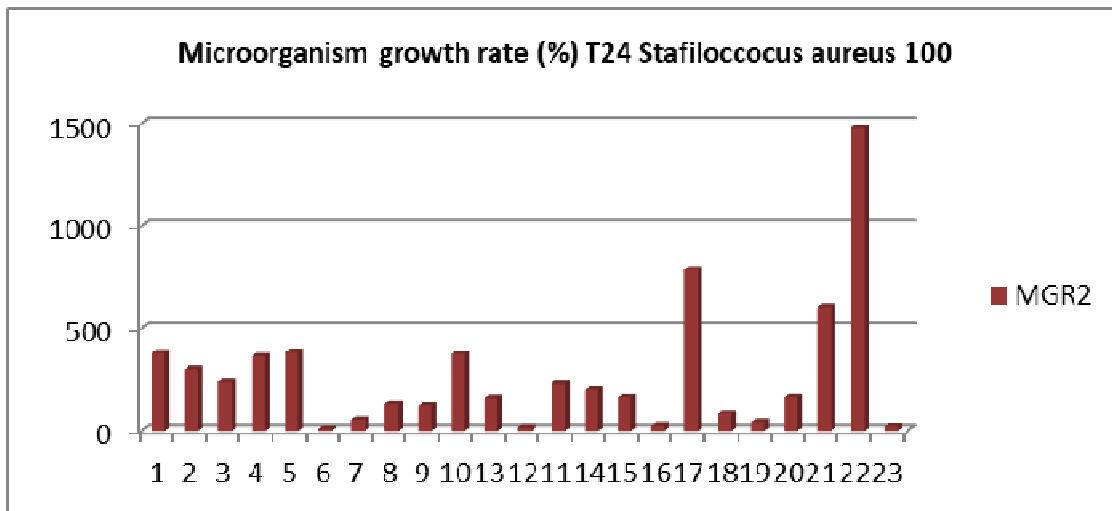


Figura 9. Rata de dezvoltare micelară (MGR) a S. aureus după 24 ore (T24)

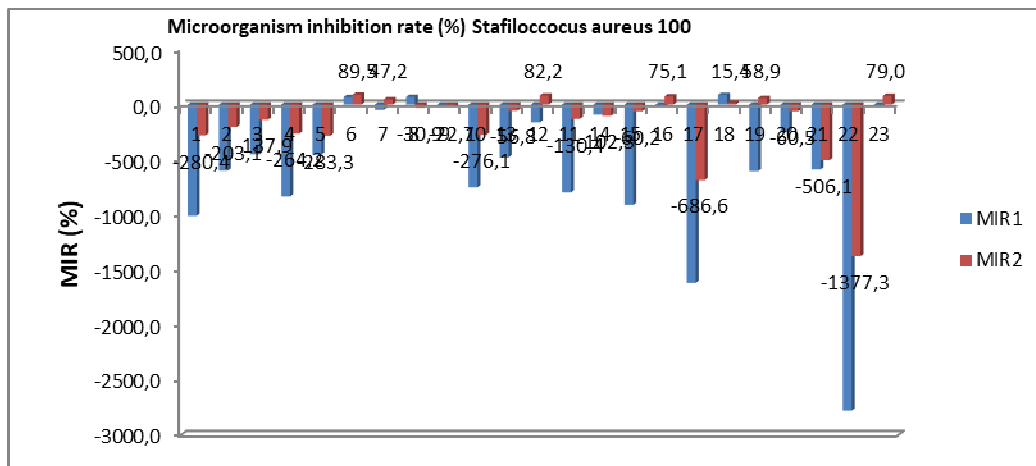


Figura 10. Rata de inhibiție (MRI) a S. aureus inițial (T0) și după 24 ore (T24) la aplicarea a 100 microlitri extracte

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale

O capacitate de inhibare a dezvoltării *S.aureus* la aplicarea a 100 microlitri extract se remarcă în cazul extractelor 6, 7, 8, 9, 16, 18, 23, atât la momentul T0, cât și după 24 de ore. Pentru extractele 12 și 19, inhibarea este observată doar după 24 de ore, în prima fază înregistrându-se un efect de potentare a dezvoltării *S. aureus*.

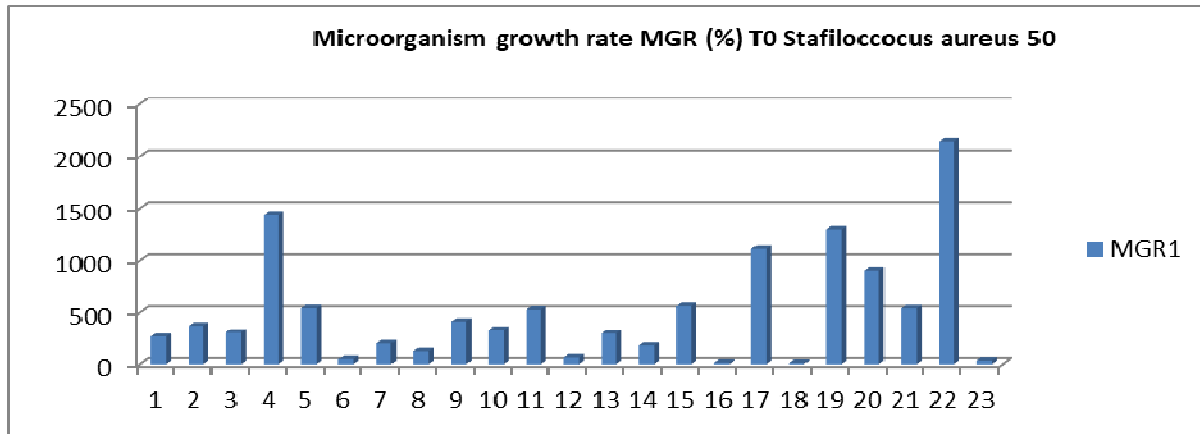


Figura 11. Rata de dezvoltare micelară (MGR) a *S. aureus* initial (T0)

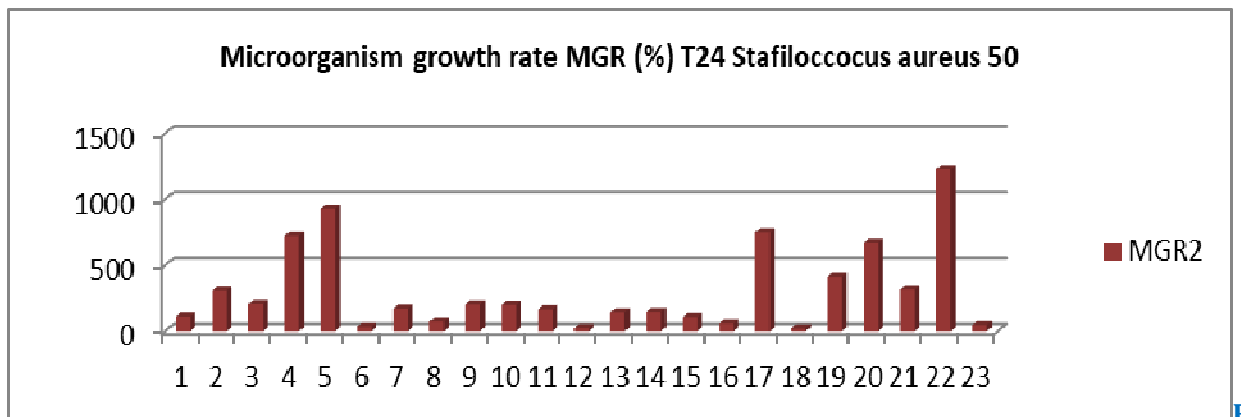


Figura 12. Rata de dezvoltare micelară (MGR) a *S. aureus* după 24 ore (T24)

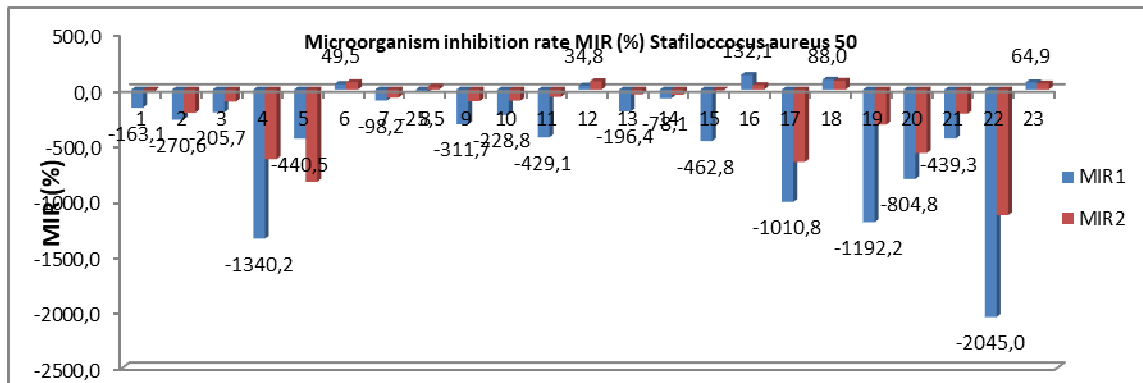


Figura 13. Rata de inhibitie (MRI) a *S.aureus* initial (T0) si dupa 24 ore (T24) la aplicarea a 50 microlitri extracte

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale

În cazul aplicării a 50 microlitri extract, se remarcă o inhibare pentru extractele 6, 8, 12, 16, 18, 23, cea mai mare rată de inhibare înregistrându-se în cazul extractului 16. Celelalte extracte analizate potențază activitatea *S. aureus*.

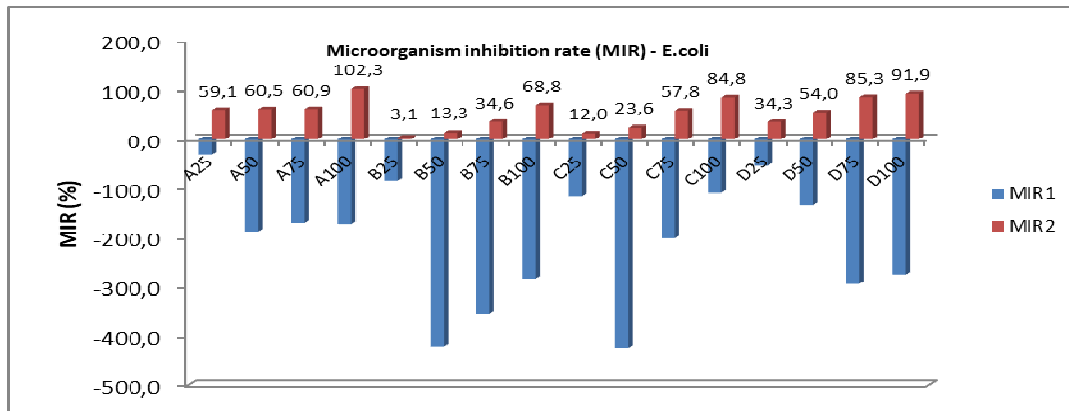


Figura 14. Rata de inhibiție (MIR) a *E. coli* la aplicarea amestecurilor binare și terțiare (A=12+16; B=12+18; C=16+18; D=12+16+18)

La utilizarea amestecurilor de extracte se observă efecte sinergice generate între principiile active constituențe, care determină o creștere a capacității de inhibare a dezvoltării celulare în cazul *E. coli*. Această creștere se înregistrează pentru toate amestecurile analizate, doar după 24 ore de la aplicarea tratamentului (MIR2), existând o fază inițială în care miceliul se dezvoltă ca răspuns al aplicării stimulului generat de principiile active ale extractelor (MIR1). Toate amestecurile binare și terțiare analizate au determinat un efect de inhibare, care a crescut direct proporțional cu doza de extract aplicată. Eficiența maximă s-a înregistrat în cazul aplicării amestecului binar A, 100 microlitri (MIR=102,3%).

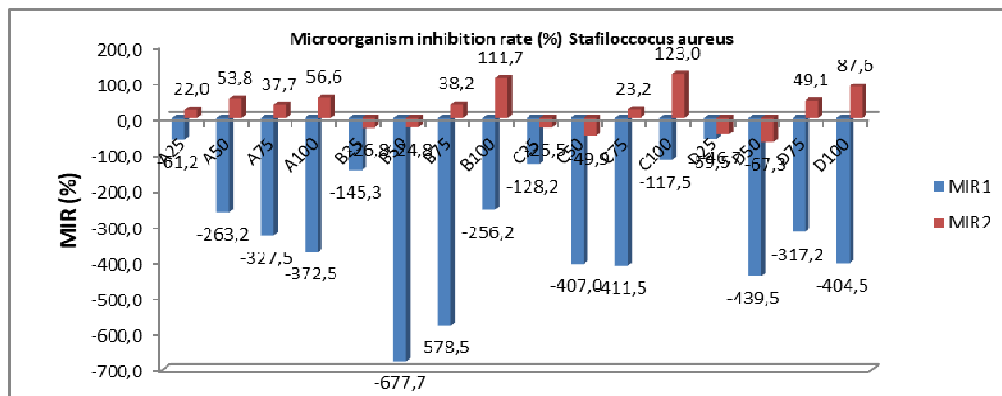


Figura 15. Rata de inhibiție (MIR) a *S. aureus* la aplicarea amestecurilor binare și terțiare (A=12+16; B=12+18; C=16+18; D=12+16+18)

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale

Activitatea antimicrobiană a extractelor asupra *S. aureus* este inferioară comparativ cu cea exercitată asupra *E. coli*. Se observă o potențare inițială a dezvoltării micelare în faza inițială de aplicare ($t=0$) pentru toate extractele analizate, urmată de faza inhibitorie după 24 ore, în cazul amestecului A, indiferent de cantitatea aplicată și pentru amestecurile B-D pentru cantități mai mari de 75 microlitri.

Concluzii

- Extractele din plante reprezintă o soluție alternativă, naturală, cu acțiune antibacteriană asupra compușilor chimici de sinteză. O rată de inhibare ridicată se remarcă în cazul utilizării extractelor 9, 18, 21, (100 microlitri) pentru *E. coli*, respectiv 6, 12, 23 pentru *S. aureus*.
- *E. coli* a indicat o sensibilitate mai ridicată la acțiunea extractelor naturale, atât din punct de vedere al speciilor de plante utilizate, cât și a ratei de inhibare obținute.
- Utilizarea unor amestecuri binare/terțiare de extracte conduce la creșterea efectului antimicrobian, respectiv creșterea ratei de inhibare micelară atât în cazul *S. aureus*, cât și în cel al *E. coli*, datorită efectelor sinergice exercitate de principiile active constituențe;
- Amestecul optim este A pentru *S. aureus*, respectiv C pentru *E. coli*, care exercită un efect de inhibare de peste 100% la o cantitate de 100 microlitri extract aplicat.

Bibliografie

1. Chouhan S, Sharma K, Guleria S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils-Present Status and Future Perspectives. *Medicines (Basel)*. 2017 Aug 8;4(3):58.
2. Costa D.C., Costa H.S., Albuquerque T.G., Ramos F., Castilho M.C., Sanches-Silva A. Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. *Trends Food Sci. Technol.* 2015;45:336–354. doi: 10.1016/j.tifs.2015.06.009.
3. Orhan D, Özçelik B, Hoşbaş S, Vural M. Assessment of antioxidant, antibacterial, antimycobacterial, and antifungal activities of some plants used as folk remedies in Turkey against dermatophytes and yeast-like fungi. *Turkish Journal of Biology*. 2012; 36(6): 672-686
4. Firas A. Al-Bayati, Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts, *Journal of Ethnopharmacology*, Volume 116, Issue 3, 2008, Pages 403-406
5. Olgica D. Stefanović, Jelena D. Tešić, Ljiljana Čomić, Melilotus albus and Dorycnium herbaceum extracts as source of phenolic compounds and their antimicrobial, antibiofilm, and antioxidant potentials, *Journal of food and drug analysis*, 23 (2015), 417-424
6. Ashraf A. Mostafa, Abdulaziz A. Al-Askar, Khalid S. Almaary, Turki M. Dawoud, Essam N. Sholkamy, Marwah M. Bakri, Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases, *Saudi Journal of Biological Sciences*, Volume 25, Issue 2, 2018, pp 361-366.
7. Paterson, G. K., Harrison, E. M., and Holmes, M. A. (2014). The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 22, 42–47.
8. Rodríguez-Lázaro David, Oniciuc Elena-Alexandra, García Patricia G., Gallego David, Fernández-Natal Isabel, Dominguez-Gil Marta, Eiros-Bouza José M., Wagner Martin, Nicolau Anca I, Hernández Marta, Detection and Characterization of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *S. aureus* in Foods Confiscated in EU Borders, *Frontiers in Microbiology*, VOL. 8, 2017, 1344
9. Bettelheim K. A. Biochemical characteristics of *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Gyles C. L. (ed), 1994 3 30 CAB International Wallingford, United Kingdom
10. Rojas-Lopez Maricarmen, Monterio Ricardo, Pizza Mariagrazia, Desvaux Mickaël, Rosini Roberto, Intestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Insights for Vaccine Development *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, 2019, pp.440

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale

11. Russo TA, Johnson JR. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect.* 2003 Apr;5(5):449-56.
12. Sarowska J, Futoma-Koloch B, Jama-Kmiecik A, Frej-Madrzak M, Ksiazczyk M, Bugla-Ploskonska G, Choroszy-Krol I. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathog.* 2019 ;11:10.
13. Wasiński, Bernard. "Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* – threat connected with food-borne infections." *Ann Agric Environ Med.*, vol. 26, no. 4, 2019, pp. 532-537.

II. EVALUAREA EFECTULUI ANTIMICROBIAN AL ULEIURILOR ESENȚIALE

Uleiurile esențiale sunt produse naturale, derivate din plante medicinale, utilizate în mod tradițional în întreaga lume, pentru numeroase afecțiuni, la om și la animale: probleme ale tractului respirator, sistemului digestiv, afecțiuni ginecologice, endocrine, cardiovasculare, ale sistemului nervos sau infecții ale pielii.

Uleiurile esențiale sunt tot mai frecvent utilizate ca alternative naturale ale preparatelor sintetice, pentru prevenția și tratarea bolilor infecțioase, deși adesea nu sunt prescrise de specialiști, nu sunt dozate corespunzător, nu se ține cont de efectul sinergic al mixurilor de uleiuri, de eventuala sensibilitate a pacientului, de cantitatea de pesticide sau substanțe toxice extrase din plantele necorespunzător cultivate, recoltate sau conservate.

A. Analiza GC MS a uleiurilor volatile

Analiza GC-MS a unor uleiuri esențiale, respectiv determinarea compoziției acestora în vederea corelării datelor obținute cu activitatea antimicrobiană indicată în literatura de specialitate, a reprezentat una dintre activitățile desfășurate în cadrul proiectului BIOAMR (Abordarea bioeconomică a agenților antimicrobieni – utilizare și rezistență”, cod PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0361).

Pe parcursul acestui proces, un număr total de 42 de uleiuri esențiale provenite de la diferiți furnizori (firme consacrate, dar și mici producători locali) au fost analizate prin gaz cromatografie/spectrometrie de masă. Întreaga activitate s-a desfășurat în cadrul *Laboratorului de cercetare a sistemelor antioxidante (A1c)* din cadrul Complexului de laboratoare de cercetare "Horia Cernescu", USAMVB Timisoara.

Principalele uleiuri analizate din punct de vedere al activității lor antimicrobiene, pe care s-au realizat și diferite studii comparative cu privire la modul în care compoziția acestora diferă în funcție de producător, au fost: *Thymus serpyllum*, *Thymus vulgaris*, *Melaleuca alternifolia*, *Lavandula angustifolia*, *Mentha*, *Foeniculum vulgare*, *Pogostemon cablin*, *Pelargonium graveolens*, *Citrus × paradisi*, *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare* - L, *Pinus L.*, *Rosmarinus officinalis*, *Illicium verum*, *Laurus nobilis*, *Salvia officinalis*, *Anethum graveolens*, *Cuminum cyminum*, *Zingiber officinale*, *Litsea cubeba*.

Mod de lucru:

- primul pas în analiza GC-MS a fost reprezentat de alegerea unor solvenți potriviți pentru fiecare ulei, în funcție de miscibilitatea acestora. În urma unor procese de testare, s-a decis utilizarea hexanului și a metanolului.
- s-a stabilit volumul de ulei ca fiind de 100 μl, respectiv 500 μl pentru solvent.
- în vederea analizării compușilor volatili, a fost utilizat un gaz cromatograf 7820A, Agilent Technologies, cuplat cu un spectrometru de masă MSD 5975. Coloana capilară a fost una de tip HP-5MS, având ca fază mobilă fenil-metil polisiloxanul, iar gazul purtător a fost Heliul (la un flow de 1 ml/min).

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale

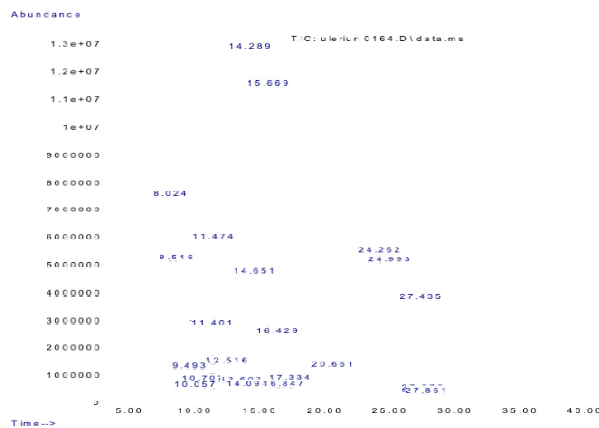
- un volum de 2 μl din amestecul ulei-solvent a fost injectat, optându-se pentru modul splitless, cu o presiune a inlet-ului de 60.688 kpa.

- din punct de vedere al metodei, flow-ul și presiunea au fost constante, s-au ales însă trei rampe de temperatură diferite: 230°C (120'), 240°C (120') și 270° (60').

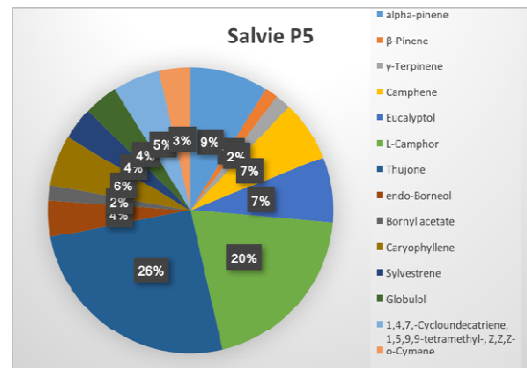
Acești parametrii au fost respectați pe parcursul întregului proces de analiză, pentru toate cele 42 de uleiuri.

În urma obținerii cromatogramelor și a identificării compușilor (prin compararea acestora cu cei furnizați de baza de date NIST), s-a efectuat o analiză comparativă a aceluiași tipuri de uleiuri, provenite însă de la cel puțin doi producători diferiți. Scopul a fost acela de a identifica posibilele diferențe din punct de vedere al prezenței/absenței anumitor compuși și al concentrației în care respectivii compuși au fost întâlniți în fiecare dintre uleiuri. S-au urmărit atât timpii, cât și indicii de retenție pentru fiecare dintre compușii analizați.

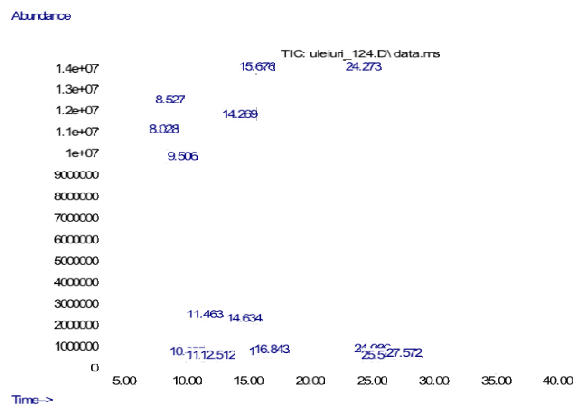
Două dintre uleiurile analizate au fost cele de salvie (*Salvia officinalis*), proprietățile antimicrobiene ale acestei plante fiind deja recunoscute.



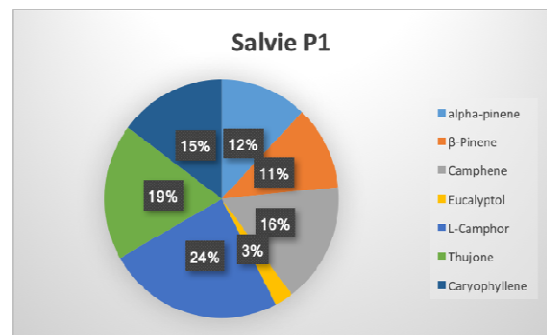
Cromatograma 1. Ulei de salvie - producător nr. 5



Ulei de salvie - producător nr. 5 - compuși și concentrație



Cromatograma 2. Ulei de salvie - producător nr. 1

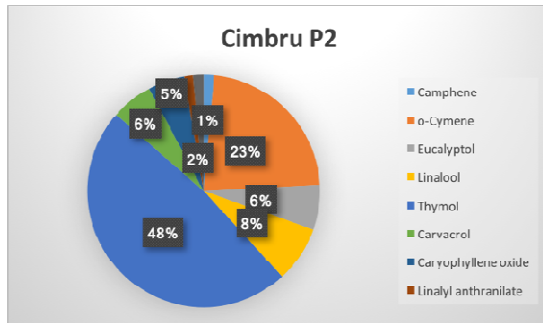


Ulei de salvie - producător nr. 1 - compuși și concentrație

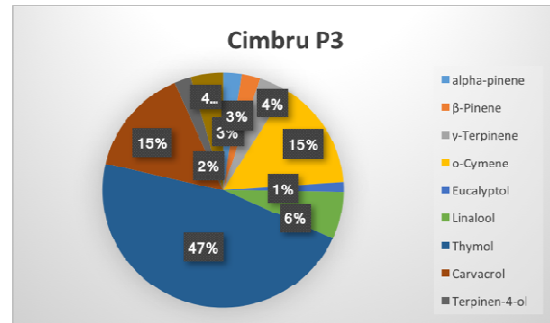
4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale

Din această comparație se poate observa faptul că uleiul provenit de la producătorul cu numărul 5 a fost mai bogat în compuși volatili. Se remarcă prezența unor monoterpeni precum o-Cymene sau gamma-Terpinene, absenți în cazul celui de-al doilea ulei (de la P1).

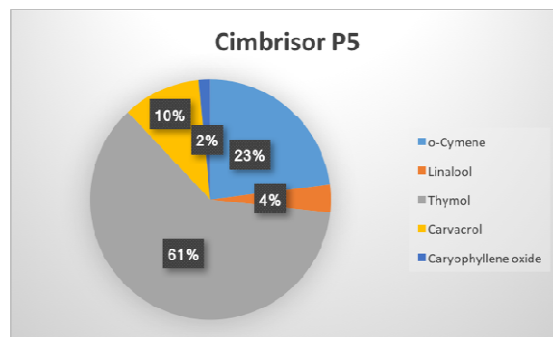
O astfel de comparație s-a realizat în cazul uleiurilor de cimbru (*Thymus vulgaris*), respectiv cimbrisor (*Thymus serpyllum*).



Ulei de cimbru - producător nr. 2 - compuși și concentrație



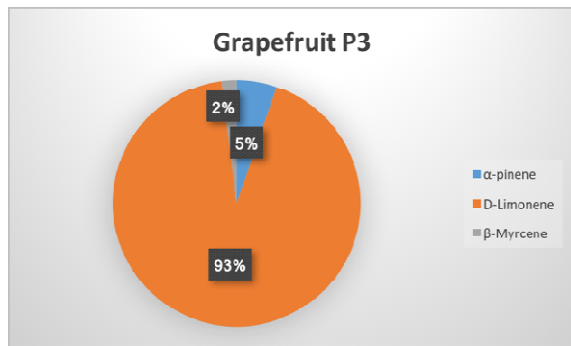
Ulei de cimbru - producător nr. 3 - compuși și concentrație



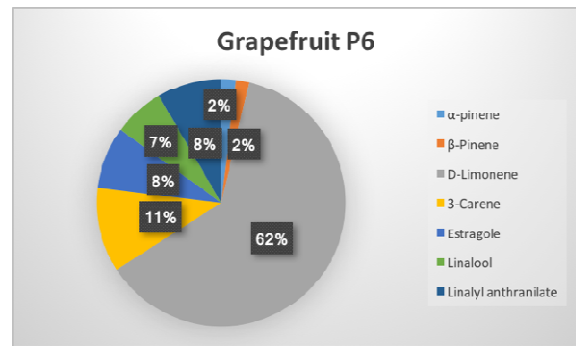
Ulei de cimbrisor - producător nr. 1 - compuși și concentrație

Uleiul de la producătorul cu numărul trei, deși posedă o concentrație mai scăzută din punct de vedere al celor doi compuși specifici (Thymol, o-Cymene), are în plus față de celelalte două uleiuri gamma-Terpinene, alpha si beta-Pinene.

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale
 Uleiul de grapefruit (*Citrus × paradisi*):

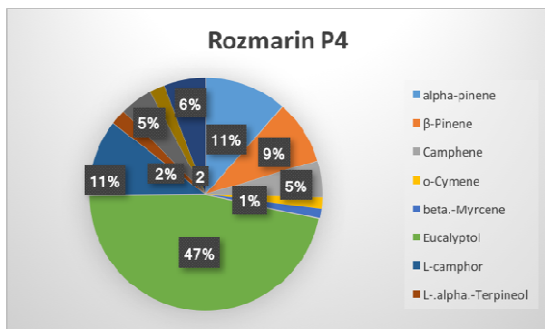


Ulei de grapefruit - producător nr. 3 - compuși și concentrație

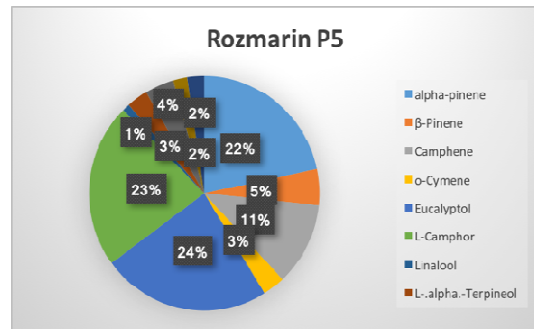


Ulei de grapefruit - producător nr. 6 - compuși și concentrație

Uleiul de rozmarin (*Rosmarinus officinalis*):

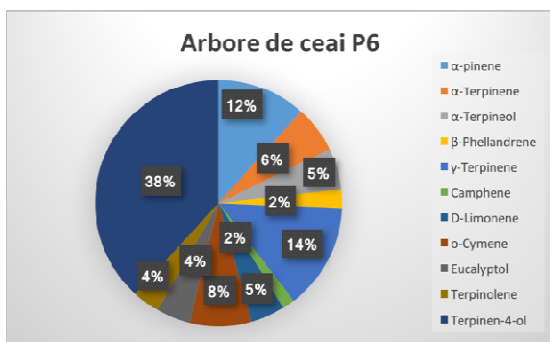


Ulei de rozmarin - producător nr. 4 - compuși și concentrație

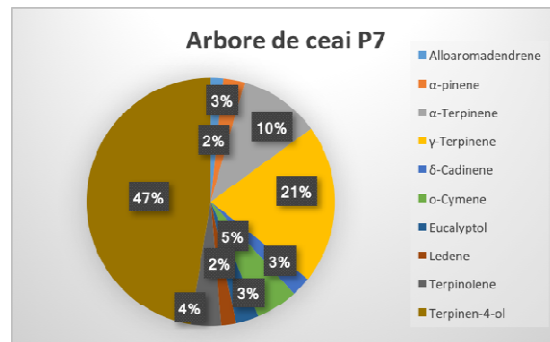


Ulei de rozmarin - producător nr. 5 - compuși și concentrație

Uleiul de arbore de ceai (*Melaleuca alternifolia*):

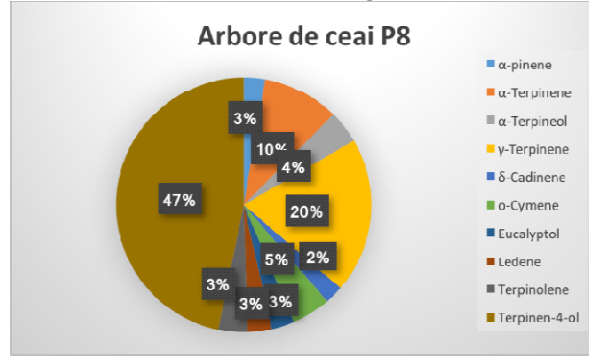


Ulei arbore de ceai - producător nr. 6 - compuși și concentrație



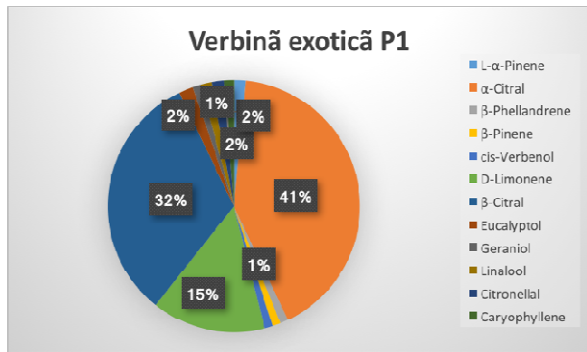
Ulei arbore de ceai - producător nr. 7 - compuși și concentrație

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale

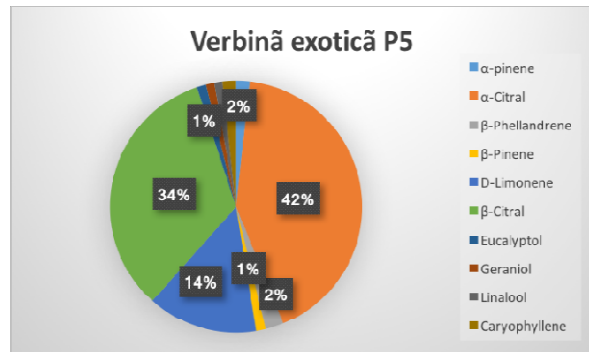


Ulei arbore de ceai - producător nr. 8 - compuși și concentrație

Uleiul de verbină exotică (*Litsea cubeba*):

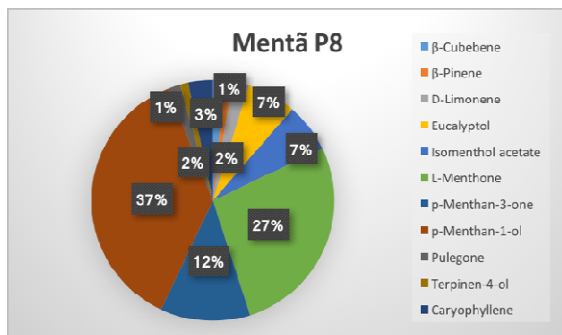


Ulei verbină exotică - producător nr. 1 - compuși și concentrație



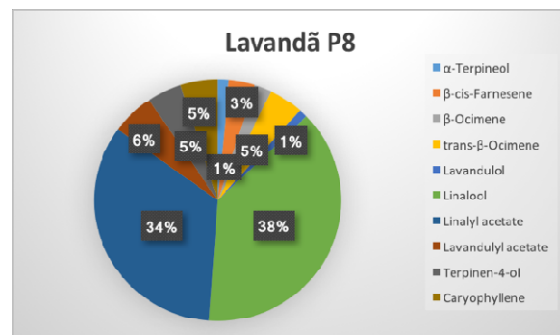
Ulei verbină exotică - producător nr. 5 - compuși și concentrație

Uleiul de mentă (*Mentha*):



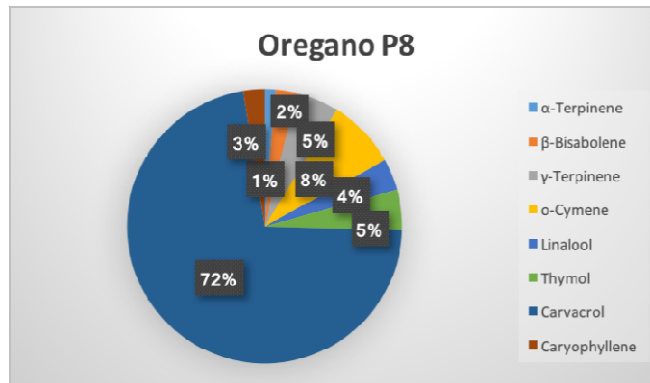
Ulei mentă - producător nr. 8 - compuși și concentrație

Uleiul de lavanda (*Lavandula angustifolia*):



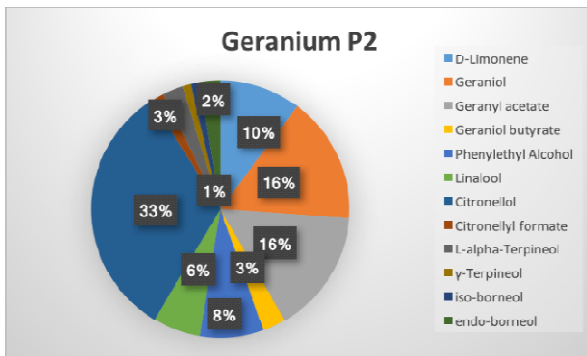
Ulei lavandă - producător nr. 8 - compuși și concentrație

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale
 Uleiul de oregano (*Origanum vulgare - L*):

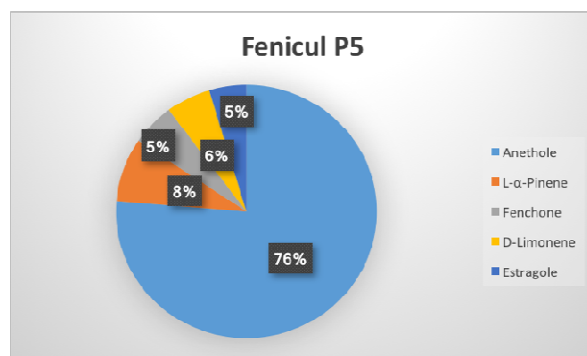


Ulei oregano - producător nr. 8
 compuși și concentrație

Uleiul de geranium (*Pelargonium graveolens*): Uleiul de fenicul (*Foeniculum vulgare*):



Ulei geraniu - producător nr. 2
 - compuși și concentrație

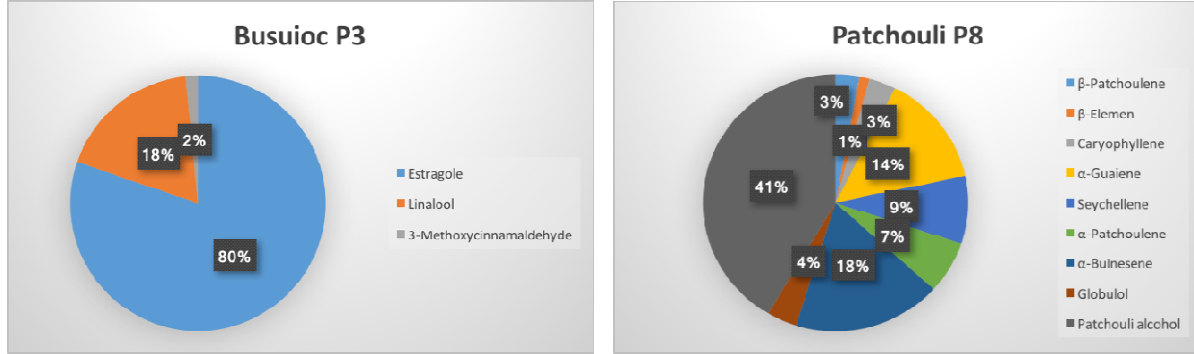


Ulei fenicul - producător nr. 5 -
 compuși și concentrație

Uleiul de busuioc (*Ocimum basilicum*):

Uleiul de patchouli (*Pogostemon cablin*):

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale



Ulei busuioc - producător nr. 3
- compuși și concentrație

Ulei patchouli - producător nr. 8
- compuși și concentrație

B. EVALUAREA EFECTULUI ANTIMICROBIAN AL ULEIURILOR ESENȚIALE PRIN METODA DIFUZIMETRICĂ

B.1. Activitatea inhibitorie a uleiurilor esențiale asupra tulpinilor de *Escherichia Coli*

Obiectivul principal:

Obiectivul studiului este reprezentat de testarea unor uleiuri esențiale, obținute din comerț, asupra bacteriei *E. coli*, pentru a verifica veridicitatea acestor produse și efectul lor asupra culturilor bacteriene *in vitro*.

În studiul de față, am ales să testăm calitatea unor uleiuri esențiale disponibile pe piață, respectiv specii de plante cu efect antimicrobian, prin verificarea capacității inhibitorii a 19 produse de acest fel, față de *Escherichia coli*.

Materiale și metode de lucru:

Bacteria folosită pentru a se testa sensibilitatea la uleiurile esențiale este *Escherichia coli* (Migula 1895) Castellani and Chalmers 1919 (syn. *Bacillus coli communis* Escherich 1885), obținută la „Complexul de Laboratoare de Cercetare Horia Cernescu”, din cadrul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului „Regele Mihai I al României” din Timișoara. Uleiurile esențiale utilizate au fost cumpărate din comerț, din farmacii de tip naturist, de la diferiți producători.

Uleiurile esențiale folosite pentru testarea sensibilității speciei *E. coli*:

Essential oil		Plant	
Romanian name	English name	Botanical name	Botanical family
Oregano	Oregano	<i>Origanum vulgare</i> L.	Lamiaceae
Cimbru	Garden thyme	<i>Thymus vulgaris</i> L.	Lamiaceae
Cimbrisor	Wild thyme	<i>Thymus serpyllum</i> L.	Lamiaceae
Lavandă	Lavender	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	Lamiaceae
Mentă	Peppermint	<i>Mentha x piperita</i> L.	Lamiaceae
Busuioc	Basil	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Lamiaceae
Rozmarin	Rosemary	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Lamiaceae

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale

<i>Salvie</i>	Garden sage	<i>Salvia officinalis</i> L.	<i>Lamiaceae</i>
<i>Patchouli</i>	Patchouli	<i>Pogostemon cablin</i> (Blanco) Benth.	<i>Lamiaceae</i>
<i>Fenicul</i>	Fennel	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	<i>Apiaceae</i>
<i>Chimion</i>	Cumin	<i>Cuminum cyminum</i> L.	<i>Apiaceae</i>
<i>Mărar</i>	Dill	<i>Anethum graveolens</i> L.	<i>Apiaceae</i>
<i>Chimen negru</i>	Black cumin	<i>Nigella sativa</i> L.	<i>Ranunculaceae</i>
<i>Dafin</i>	Bay laurel	<i>Laurus nobilis</i> L.	<i>Lauraceae</i>
<i>Grapefruit</i>	Grapefruit	<i>Citrus x paradisi</i> Macfad.	<i>Rutaceae</i>
<i>Verbină</i>	Vervain	<i>Verbena officinalis</i> L.	<i>Verbenaceae</i>
<i>Geranium</i>	Rose geranium	<i>Pelargonium graveolens</i> L'Hér.	<i>Geraniaceae</i>
<i>Cuișoare</i>	Clove	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merrill & Perry	<i>Myrtaceae</i>
<i>Melaleuca</i>	Tea tree	<i>Melaleuca alternifolia</i> (Maiden & Betche) Cheel	<i>Myrtaceae</i>

Metoda de lucru a fost cea difuzimetrică Kirby-Bauer, frecvent utilizată în laboratoarele de microbiologie pentru a testa sensibilitatea la antibiotice a speciilor de bacterii. Mediul de cultură utilizat a fost agarul suplimentat cu sânge (BAB 5%), în plăci Petri.

O eprubeta conținând bulion Mueller Hinton Broth (MHB) inoculat cu *E. Coli* a fost incubat 18 h, la 37°C. Din acest tub s-au realizat diluții zecimale până la 10⁻⁶ cfu/ml. 200 μl din inocul au fost însămânțate pe plăci. Ulterior s-au adăugat discurile, având diametrul de 6 mm, la o distanță de minim 25 mm unul față de celălalt și minim 15 mm de marginea plăcii. După fixarea discurilor, au fost adăugate uleiurile esențiale, câte 10 microlitri pe fiecare disc. Plăcile au fost lasate 15 minute la temperatura camerei pentru a se facilita difuzia uleiului în mediu; probele astfel pregătite au fost ținute la incubator timp de 24 de ore, la 37°C. După acest timp activitatea antibacteriană a fost determinată prin măsurarea diametrului zonei de inhibiție din jurul discului.

Toate testele au fost efectuate de trei ori, iar întregul experiment s-a desfășurat în cadrul Complexului de Laboratoare de Cercetare „Horia Cernescu”, al U.S.A.M.V.B. Timișoara.

Determinarea concentrației minime inhibitorii (MIC) și a concentrațiilor minime bactericide (MBC)

Uleiurile esențiale, care au prezentat activitate antimicrobiană în testul de difuzie pe disc de hârtie, au fost selectate pentru determinarea concentrației minime inhibitorii și a concentrației minime bactericide, folosindu-se metoda de diluare a bulionului. Bacteria a fost crescută în Mueller Hinton Broth la 37 °C timp de 18-24 h. În tuburi sterile cu MHB s-au realizat diluții zecimale pentru fiecare ulei esențial (1/4 - 1/16) după care a fost introdusă suspensia bacteriană în fiecare tub pentru a se ajunge la un volum final de 4 ml. Soluțiile finale au fost incubate la 37 °C peste noapte. MIC a fost definită *ca cea mai mică concentrație care a inhibat vizibil creșterea bacteriană*. MBC a fost determinată prin subcultivarea a 100 μL din eprubeta negativă pe plăci (BAB 5%). MBC a fost definită *ca cea mai mică concentrație la care rezultă o subcultură negativă*. Experimentele au fost efectuate în trei repetări.

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale

Interacțiunea dintre componentele uleiurilor esențiale

Au fost găsite diferite clase de componente în uleiurile esențiale, cum ar fi fenoli, cetone, aldehide, alcooli, esteri, eteri și hidrocarburi. Efectul antimicrobian al uleiurilor esențiale este dat de activitatea principalelor componente ale acestora. Studiile au indicat faptul că unii dintre acești compuși au prezentat proprietăți antimicrobiene semnificative atunci când au fost testați împreună. S-a raportat că uleiurile esențiale care conțin fenoli, cum ar fi carvacrol, eugenol, timol, cinamaldehydă sau citral ca și componente majore au prezentat cea mai mare activitate antibacteriană, urmate de uleiuri esențiale care conțin alcooli terpenici (uleiuri esențiale de crizantemă). Activitatea antimicrobiană ridicată a speciilor de *Thymus* și *Origanum* a fost atribuită componentelor lor fenolice, cum ar fi timolul și carvacrolul. Terpinen-4-ol este considerat a fi principala componentă activă a uleiului *Melaleuca alternifolia* (arbore de ceai).

Metoda folosită pentru a realiza acest test este metoda difuziometrică Kirby-Bauer, similar experimentului anterior.

Rezultate:

Pentru a interpreta măsurătorile, am optat pentru o clasificare a uleiurilor esențiale, după o scară folosită în studii similare, pornind de la diametrul zonei de inhibiție. Pentru uleiurile care au produs un diametru al zonei de inhibiție de peste 20 mm, *E. coli* a fost considerată ca fiind extrem de sensibilă, pentru valori între 15 și 19 mm, am caracterizat-o ca fiind foarte sensibilă, iar pentru diametre cuprinse între 9 și 14 mm a fost numită sensibilă; pentru toate valorile sub 8 mm, s-a considerat că *E. coli* este rezistent.

Clasificarea uleiurilor esențiale în funcție de diametrul zonei de inhibiție:

Extrem de sensibil Zona de inhibiție >20 mm	Foarte sensibil: Zona de inhibiție 15-19 mm	Sensibil Zona de inhibiție 9-14 mm	Rezistent Zona de inhibiție <8 mm
---	---	--	---

Diametrul mediu al zonelor de inhibiție:

Uleiul esențial	Zona de inhibiție <i>E. coli</i> (mm)	Uleiul esențial	Zona de inhibiție <i>E. coli</i> (mm)
Oregano	34	Fenicul	9
Cimbrisor	32	Mărar	9
Cimbru	27	Salvie	9
Rozmarin	25	Chimion	9
Melaleuca	22	Grapefruit	8
Cuișoare	21	Verbină	8
Scorțișoară	17	Geranium	7
Mentă	15	Chimen negru	7
Busuioc	15	Patchouli	0
Lavandă	10		

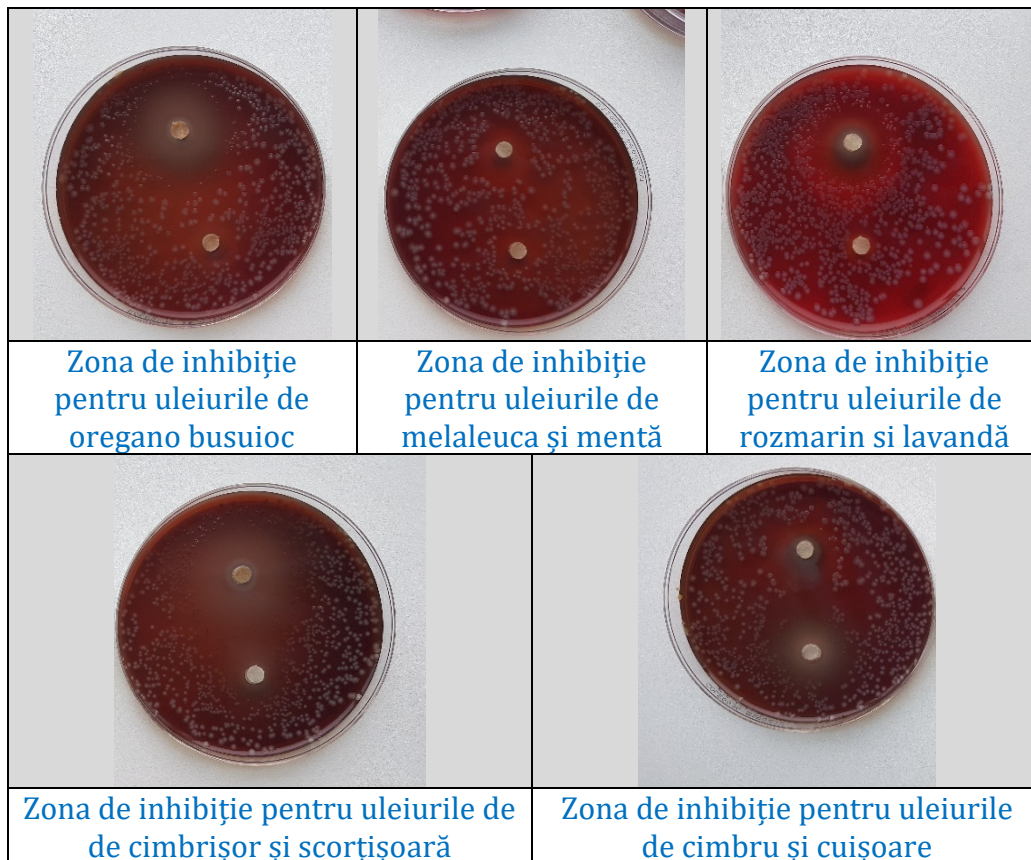
4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale

După citirea rezultatelor, s-a remarcat că diametrul zonei de inhibiție este de 34 mm în cazul uleiului de oregano, 32 mm la uleiul de cimbrisor, 27 mm pentru uleiului de cimbru, 25 mm pentru oregano și 22 mm pentru melaleuca (arbore de ceai). Față de uleiul de cuișoare, *E. coli* este rezistent (17 mm).

Clasificarea uleiurilor după efectul lor inhibitor asupra speciei *E.coli*:

Extrem de sensibil Zona de inhibiție >20 mm	Foarte sensibil: Zona de inhibiție 15-19 mm	Sensibil Zona de inhibiție 9-14 mm	Rezistent Zona de inhibiție <8 mm
Oregano	Scorțișoară	Lavandă	Grapefruit
Cimbrisor	Mentă	Salvie	Verbină
Cimbru	Busuioc	Chimion	Chimen negru
Rozmarin		Fenicul	Geranium
Melaleuca		Mărar	Patchouli
Cuișoare			

Efectul inhibitor al unor uleiuri esențiale



Cu activitate inhibitorie mai redusă s-au dovedit a fi lavanda (10 mm), mărarul (10 mm), chimionul (9 mm), feniculul (9 mm) și salvia (9 mm).

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale

Cele mai puțin eficiente s-au dovedit a fi uleiurile de grapefruit (8 mm), chimion negru (7 mm), verbină (8 mm) și geranium (7 mm), pe când uleiul de patchouli a fost singurul care nu a prezentat efect inhibitor.

Comparativ cu studiul lui Melo *et al.* (2015) uleiul esențial de oregano a avut o zonă de inhibiție de 38,5 mm \pm 0,99 mm, față de 32 mm în cazul nostru; uleiul esențial de arbore de ceai a prezentat un diametru de 35 mm \pm 1,87 mm, comparativ cu 22 mm, în cazul nostru; în cazul uleiului esențial de cimbru, a prezentat un diametru de 64 mm \pm 1,44 mm, în comparație cu 27 mm (Melo *et al.*, 2015).

Aceste diferențe pot fi explicate prin concentrația compușilor chimici diferiți ai uleiului esențial, fiind vorba de originea diferită a acestor produse. Compoziția chimică a acestor uleiuri esențiale variază foarte mult în funcție de locația geografică, originea botanică, genetica, endofitii bacterieni și tehnicile de extracție. Asemănarea indică totuși că în ambele cazuri oregano a avut un efect inhibitor mai bun decât cimbrul și arborele de ceai.

La polul opus, uleiul esențial de patchouli s-a dovedit ineficient în inhibarea speciei *Escherichia coli*, deși sunt studii în care îi sunt atribuite rezultate bune împotriva unor bacterii precum *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* și *Pseudomonas aeruginosa*.

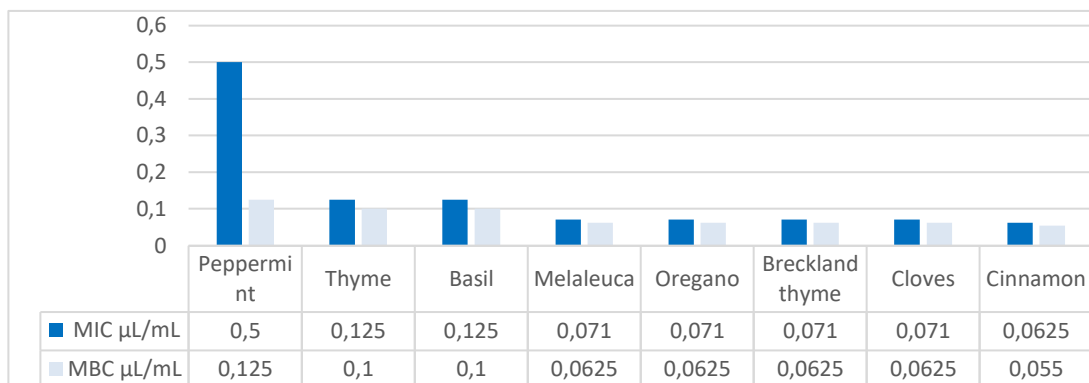
Determinarea MIC și MBC

CMI reprezintă cea mai scăzută concentrație la care se poate produce inhibarea creșterii bacteriene. În cazul nostru, au fost testate 11 uleiuri esențiale diferite și 4 combinații între 2 uleiuri.

Combinația oregano / busuioc și oregano / cimbru a indicat o CMI mai mică decât combinația scorțișoară / cimbru sau cimbru / busuioc. Acest aspect poate fi atribuit uleiului esențial de oregano și se poate datora procentului ridicat de carvacrol din componența acestuia.

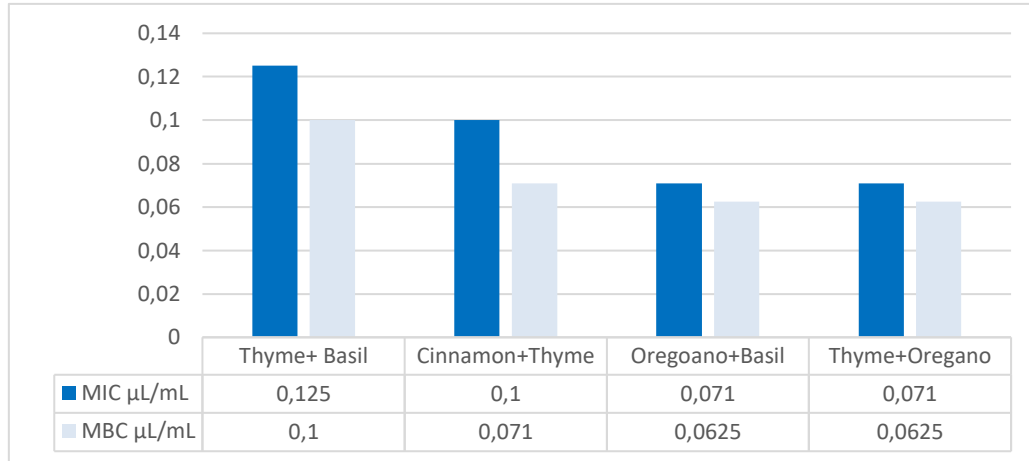
CMB reprezintă cantitatea totală (în μ L) de ulei esențial la care acesta își exercită activitatea bactericidă. Valorile CMB la care acțiunea uleiurilor asupra bacteriilor de interes (*E. coli*) a fost una semnificativă au fost cuprinse între 0,125 μ L / ml și 0,055 μ L / ml.

Figura 16. Concentrația minimă inhibitorie (CMI) și concentrația minimă bactericidă (CMB) a uleiurilor esențiale selectate asupra *E. coli*



4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale

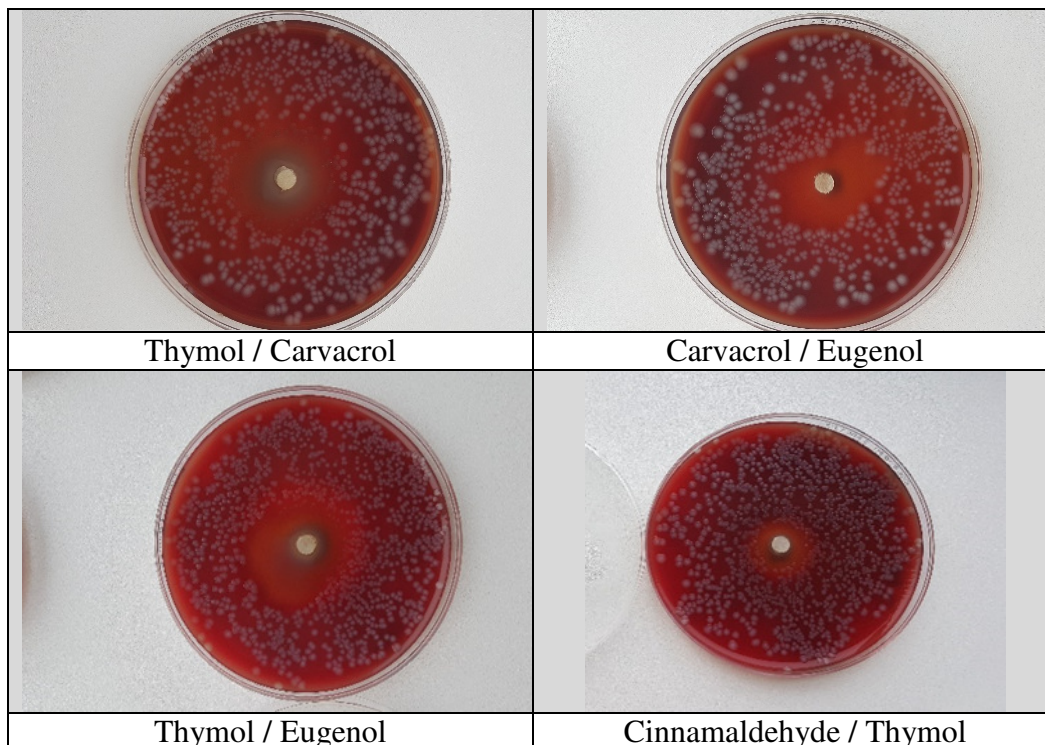
Figura 17. Concentrația minimă inhibitorie (CMI) și concentrația minimă bactericidă (CMB) a combinațiilor de uleiuri selectate asupra *E. coli*



Interacțiuni dintre compuşii uleiurilor esențiale

S-a constatat faptul că monoterpenii fenolici (timol, carvacrol) în combinație cu fenil-propanoizii (eugenol) pot produce o creștere a bioactivității acestor uleiuri. Sinergismul realizat în special de către timol și carvacrol s-a dovedit a avea succes în procesul de inhibare a tulpinilor de *E. coli*.

Sinergismul dintre componentele uleiurilor esențiale asupra *E. coli*



4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale

Uleiuri esențiale	Zona de inhibiție (mm)
Thymol/Carvacrol	25
Carvacrol/Eugenol	30
Thymol/Eugenol	23
Cinnamaldehyde/Thymol	15

B.2. Activitatea inhibitorie a uleiurilor esențiale asupra tulpinilor de *Staphylococcus Aureus*

Staphylococcus aureus este unul dintre cei mai importanți agenți patogeni, acesta evoluând constant și devenind rezistent la doze tot mai mari de antibiotice și chiar la tratamente antibacteriene mixte.

Obiectivul principal

Scopul studiului a fost acela de a testa capacitatea inhibitorie a 19 uleiuri esențiale din plante împotriva bacteriei *Staphylococcus aureus*. Uleiurile esențiale utilizate sunt reprezentate de uleiuri comercializate pe scară largă, de la diferiți producători, fiind identice cu cele folosite pentru *E. coli*, în încercarea de a găsi o combinație de uleiuri esențiale care să aibă efect antibacterian semnificativ, astfel încât să poată fi folosite profilactic sau în primele faze ale infecției, respectiv ca adjuvant, în infecțiile acute și cronice.

Materiale și metode de lucru

Metoda folosită a fost metoda difuzimetrică Kirby–Bauer. Aceasta este o metodă des utilizată în laboratoarele de microbiologie pentru testarea sensibilității la antibiotice a diferitelor bacterii. Mediul de cultură utilizat pentru cultivarea bacteriilor a fost agar suplimentat cu sânge.

În prima fază de lucru, s-a realizat însămânțarea tulpinii bacteriene pe mediul solid, cu ajutorul unei anse de unică folosință, prin tehnica de însămânțare prin epuizare. După inoculare, plăcile Petri s-au lăsat câte 5 minute la temperatura camerei, fapt care a facilitat absorbția inoculului în mediu. A urmat adăugarea discurilor din hârtie de filtru, cu diametru de 6 mm, acestea fiind așezate la o distanță, unul de altul, de minim 25 mm și maxim 15 mm de marginea plăcii.

După poziționarea discurilor, s-a realizat adăugarea uleiului esențial, câte 10 μl pe fiecare disc de pe placă. În cazul nostru, numărul maxim de discuri adăugate pe o placă a fost 4. Plăcile pregătite astfel au fost incubate timp de 24 de ore la 37°C.

Toate testele și interpretarea rezultatelor s-au realizat în cadrul laboratoarelor din Complexul de Laboratoare de Cercetare „Horia Cernescu”. Pentru interpretarea rezultatelor, după incubare, citirea diametrelor de inhibiție s-a efectuat prin măsurarea cu ajutorul unei rigle. În valoarea finală se include și diametrul discului.

Pentru formarea unor concluzii cât mai clare am realizat o clasificare a uleiurilor esențiale în funcție de diametrul zonei de inhibiție. Astfel, pentru uleiurile cu diametrul zonei de inhibiție mai mare de 20 mm, *S. aureus* a fost caracterizată ca fiind extrem de sensibilă; pentru diametrul situat între 15 și 19 mm, am caracterizat-o ca fiind foarte sensibilă; în cazul diametrelor 9-14 mm a fost numită sensibilă; non-sensibilă a fost considerată pentru diametre mai mici de 8 mm.

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale

Ca scară de clasificare a uleiurilor, în funcție de diametrul zonei de inhibiție, a fost folosită aceeași metodă.

Rezultate

Într-o primă etapă, am realizat testele pe câte o placă Petri, pentru uleiurile de cimbru, cimbrisor, verbină, dafin, busuioc, mărar, rozmarin, salvie, geranium, fenicul, chimen negru și grapefruit. Ulterior, pentru o precizie mai ridicată a măsurătorilor, am folosit câte 2 plăci, pentru uleiurile de oregano, cimbru, cuișoare, melaleuca, mentă, lavandă și patchouli.

Rezultatele testelor efectuate pe o singură placă Petri

Uleiul esențial	Diametrul zonei de inhibiție - <i>S. aureus</i> (mm)
Cimbru	47
Cimbrisor	30
Verbină	21
Dafin	19
Busuioc	11
Mărar	10
Rozmarin	10
Salvie	10
Geranium	10
Chimion	10
Fenicul	8
Chimen negru	8
Grapefruit	8

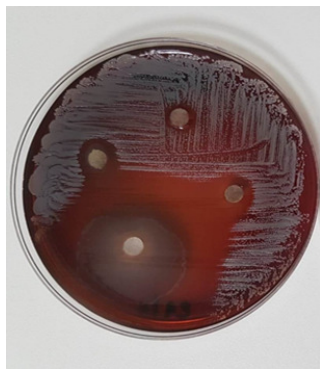
Astfel, conform clasificării noastre, *S. aureus* a fost caracterizată extrem de sensibilă față de uleiurile de cimbru (47 mm), cimbrisor (30 mm) și verbină (21 mm), foarte sensibilă față de uleiul de dafin (19 mm), sensibilă față de busuioc (11 mm), mărar (10 mm), rozmarin (10 mm), salvie (10 mm), geranium (10 mm), chimion (10 mm) și non-sensibilă față de uleiurile de fenicul (8 mm), chimen negru (8 mm) și grapefruit (8 mm).

Clasificarea după rezultatele obținute pe o placă Petri

Sensibilitate extremă Zona de inhibiție >20 mm	Sensibilitate ridicată Zona de inhibiție 15-19 mm	Sensibilitate medie Zona de inhibiție 9-14 mm	Rezistentă: Inhibition zone <8 mm
Cimbru	Dafin	Busuioc	Fenicul
Cimbrisor		Mărar	Chimen negru
Verbină		Rozmarin	Grapefruit
		Salvie	
		Geranium	
		Chimion	

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale

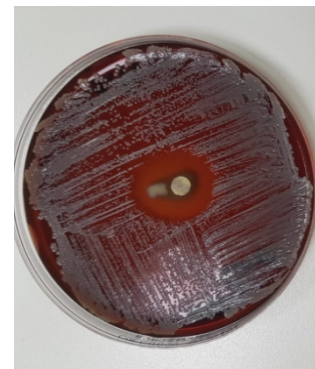
Efectul unor uleiuri esențiale și zonele lor de inhibiție



Zona de inhibiție de 47 mm pentru cimbru



Zona de inhibiție de 30 mm pentru cimbrisor



Zona de inhibiție de 21 mm pentru verbină

Din rezultatele pe 2 plăci se evidențiază oregano, cu o medie a zonelor de inhibiție de 27,5 mm, cimbru cu 29 mm, cuișoare 22,5 mm, încadrate la categoria extrem de sensibilă. De asemenea, activitate inhibitorie bună a prezentat și uleiul de melaleuca (18 mm), patchouli (17 mm) și cel de mentă (15,5 mm), încadrate în categoria foarte sensibilă. Uleiul de lavandă (12,5 mm), încadrat în categoria sensibilă, prezintă o activitate inhibitorie semnificativ redusă în comparație cu uleiul de cimbru, oregano și cuișoare.

Rezultate în urma testării pe 2 plăci; IZD = inhibition zone diameter

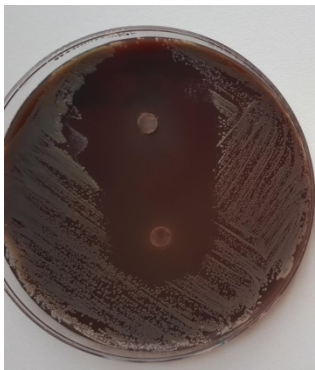
Uleiul esențial	DZI <i>S. aureus</i> I (mm)	DZI <i>S. aureus</i> II (mm)	DZI mediu (mm)
Cimbru	23	35	29
Oregano	25	30	27.5
Cuișoare	20	25	22.5
Arbore de ceai	11	25	18
Patchouli	16	18	17
Mentă	18	13	15.5
Lavandă	10	15	12.5

Clasificarea uleiurilor după rezultatele obținute pe 2 plăci

Sensibilitate extremă Zona de inhibiție >20 mm	Sensibilitate ridicată Zona de inhibiție 15-19 mm	Sensibilitate medie Zona de inhibiție 9-14 mm	Rezistență: Inhibiție zone <8 mm
Cimbru	Arbore de ceai	Lavandă	
Oregano	Patchouli		
Cuișoare	Mentă		

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale

Efectul unor uleiuri esențiale și zonele lor de inhibiție



Zonele de inhibiție pentru cimbru și cuișoare



Zona de inhibiție pentru oregano



Zonele de inhibiție pentru mentă, patchouli și arbore de ceai

La nivel mondial, infecțiile cauzate de bacteriile rezistente la antibiotice, printre care și unele tulpini de *S. aureus*, au devenit endemice, frecvent fiind raportate focare dobândite de unitățile medicale, aceasta reprezentând o amenințare din ce în ce mai mare, cu consecințe clinice importante în ceea ce privește opțiunile de tratament. Organizația Mondială a Sănătății, începând din 2001, a decis să acorde prioritate înaltă măsurilor care vizează încetinirea apariției bacteriilor rezistente la antibiotice.

Rezultatele obținute de noi indică efecte inhibitorii bune în cazul uleiurilor esențiale de cimbru, cimbrisor, oregano, cuișoare și verbină, încadrate la categoria *Extremely sensitive*. Față de uleiurile de dafin, melaleuca, patchouli și mentă, bacteria s-a dovedit a fi *Very sensitive*, conform clasificării noastre. Pentru uleiurile de busuion, mărar, rozmarin, salvie, geranium, chimion, levănțică au fost măsurate zone de inhibiție între 9 și 14 mm, considerate de noi la categoria *Sensitive*. Fără efect sau cu diametre mici ale zonelor de inhibiție au fost fenicul, chimen negru și grapefruit; pentru acestea nu putem afirma că speciile respective nu au deloc efect antibacterian ci doar că uleiurile folosite de noi nu au avut efect inhibitor semnificativ.

C. TESTAREA CAPACITĂȚII ANTIMICROBIENE A UNOR ULEIURI ESENȚIALE ASUPRA *E. COLI* ȘI *S. AUREUS*, PRIN METODA MICRODILUȚIILOR ÎN BULION

Obiectivul acestui studiu a fost acela de a analiza capacitatea antimicrobiană (bactericidă și/sau bacteriostatică) a unor uleiuri esențiale provenite de pe piața românească, de la diferiți furnizori.

Întreg procesul s-a concentrat asupra determinării efectelor (a capacității inhibitorii) acestor uleiuri asupra unor tulpini de *Escherichia coli* (DK0336), respectiv *Staphylococcus aureus* (CP8150). Au fost testate uleiuri din familia *Lamiaceae* (*Thymus serpyllum* - Cimbru 1 și *Thymus vulgaris* - Cimbru 2, Cimbru 3) și *Rutaceae* (*Citrus × paradisi* - Grapefruit 1, 2).

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale

Mod de lucru

- **metoda microdiluțiilor în bulion** este una dintre cele mai utilizate tehnici în evaluarea susceptibilității la antimicrobiene (1, 2). Procedeu implică testarea activității agentului antimicrobian, la diferite concentrații, într-un mediu de creștere lichid (inocul bacterian) distribuit în plăci de microtitrare cu 96 de godeuri (**TPP®** tissue culture plates 96-well Clear Flat Bottom Microtest Microplate).

- tulpinile mai sus precizate au fost „revigorată” prin creștere peste noapte în bulion cord-creier (BHI), la 37°C.

- pentru obținerea martorilor, uleiurile de testat au fost piepetate în placa cu 96 de godeuri astfel:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
B	0,5 μl Cimbru 1 + 100 μl bulion			1 μl Cimbru 1 + 100 μl bulion			1,5 μl Cimbru 1 + 100 μl bulion			2 μl Cimbru 1 + 100 μl bulion		
C												
D	0,5 μl Cimbru 2 + 100 μl bulion			1 μl Cimbru 2 + 100 μl bulion			1,5 μl Cimbru 2 + 100 μl bulion			2 μl Cimbru 2 + 100 μl bulion		
E												
F	0,5 μl Cimbru 3 + 100 μl bulion			1 μl Cimbru 3 + 100 μl bulion			1,5 μl Cimbru 3 + 100 μl bulion			2 μl Cimbru 3 + 100 μl bulion		
G												
H	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
B	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
C	0,5 μl Grapefruit 1 + 100 μl bulion			1 μl Grapefruit 1 + 100 μl bulion			1,5 μl Grapefruit 1 + 100 μl bulion			2 μl Grapefruit 1 + 100 μl bulion		
D												
E	0,5 μl Grapefruit 2 + 100 μl bulion			1 μl Grapefruit 2 + 100 μl bulion			1,5 μl Grapefruit 2 + 100 μl bulion			2 μl Grapefruit 2 + 100 μl bulion		
F												
G	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
H	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

- s-a efectuat o microplacă și cu martorii pentru tulpini:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
B	/	/	100 μl bulion								/	/
C	/	/									/	/
D	/	/	100 μl cultură de lucru <i>E. coli</i>								/	/
E	/	/									/	/
F	/	/	100 μl cultură de lucru <i>S. aureus</i>								/	/
G	/	/									/	/
H	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale
- dispunerea în placă pentru fiecare ulei testat pe cele două culturi a fost următoarea:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		100 μl cultură de lucru E. coli + 0,5 μl ulei										
B		100 μl cultură de lucru E. coli + 1 μl ulei										
C		100 μl cultură de lucru E. coli + 1,5 μl ulei										
D		100 μl cultură de lucru E. coli + 2 μl ulei										
E		100 μl cultură de lucru S. aureus + 0,5 μl ulei										
F		100 μl cultură de lucru S. aureus + 1 μl ulei										
G		100 μl cultură de lucru S. aureus + 1,5 μl ulei										
H		100 μl cultură de lucru S. aureus + 2 μl ulei										

- probele astfel preparate au fost supuse incubării la 37°C, pentru 19 h.
- pentru determinarea densității optice a fost utilizat un spectrofotometru *Tecan Infinite M1000 Pro*, absorbanta fiind setată la 510 nm.

Calcul

- se calculează media aritmetică a B și se scade această valoare din fiecare I, după care se calculează media și deviația standard pentru valorile obținute, aceasta reprezentând CONTROLUL.
- activitatea optică a controlului este considerată a fi rata de potență / creștere de 100%.
- procentul total de inhibiție a fost calculat după formula: $PI\% = 100 - [(T \times 100) / C]$

Interpretarea statistică a rezultatelor s-a realizat cu ajutorul testelor mai jos precizate

- **ANOVA Kruskal Wallis:** pentru identificarea diferentelor survenite în urma citirii DO la adăugarea unui volum diferit (0,5 μl , 1 μl , 1,5 μl si 2 μl) din fiecare ulei.
Acelasi test a fost utilizat si pentru analiza diferentelor (dpdv al DO) apărute pentru acelasi tip de ulei, însă de la un alt furnizor.
- **Testul U Man-Whitney:** pentru evaluarea gradului de eficacitate a celor cinci uleiuri pe fiecare tulpină bacteriană (asupra cărei tulpini eficacitatea aceluiași ulei este mai ridicată)

Testarea diferențelor dintre densitățile optice (DO), la aplicarea unor volume diferite de ulei esențial (ANOVA Kruskal Wallis + comparații multiple)

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale

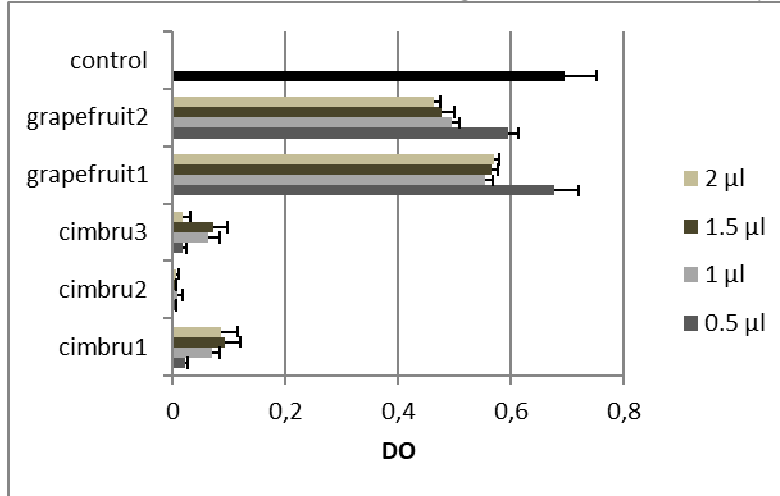


Figura 18. Valorile DO pentru E. Coli

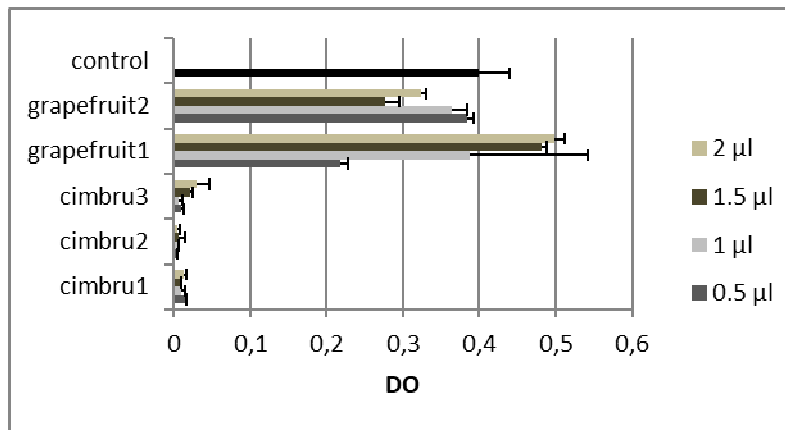


Figura 19. Valorile DO pentru S. aureus

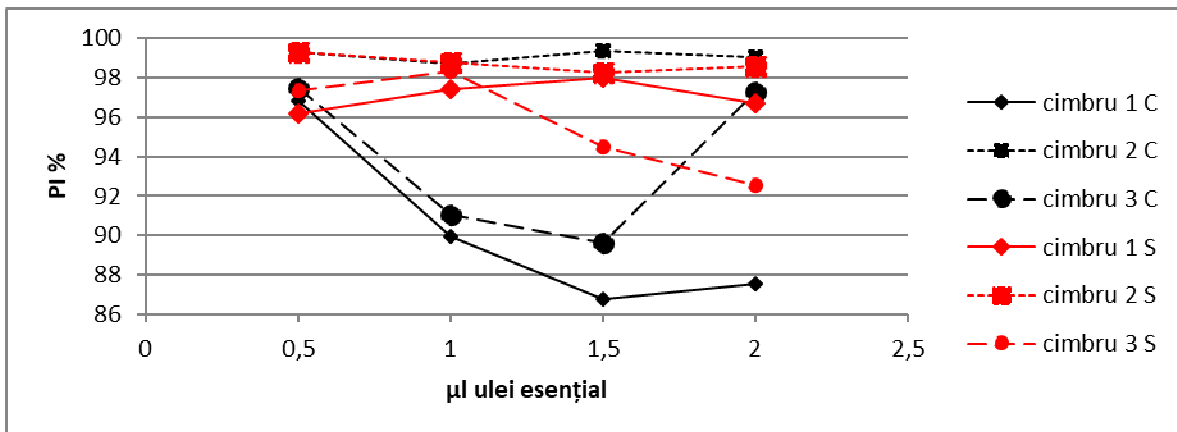


Figura 20. Variația CMI în funcție de volum de ulei de cimbru folosit

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale

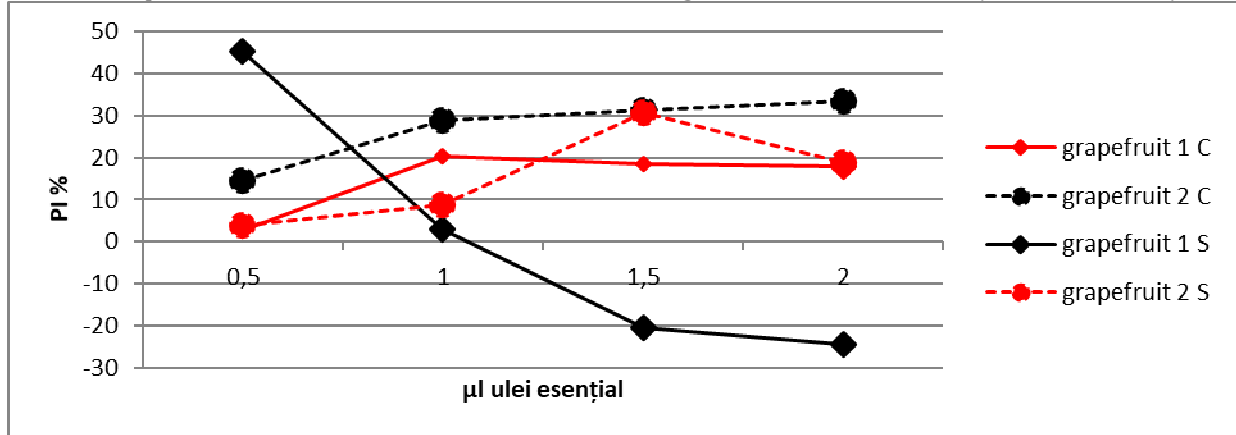


Figura 21. Variația CMI în funcție de volum de ulei de grapefruit folosit

Cimbru 1

- E. coli – procentul de inhibiție (PI) a variat între 86,75% (1,5 μl) și 96,82% (0,5 μl) (Fig. 20); la volumul de 0,5 μl, DO a fost semnificativ mai redusă ($p < 0,001$) comparativ cu celelalte volume, între care nu s-au constatat diferențe (Fig. 18).
- S. aureus – procentul de inhibiție a variat între 96,19% (0,5 μl) și 97,97% (1,5 μl) (Fig. 21); la volumul de 1,5 μl, DO a fost semnificativ mai redusă ($p < 0,01$) comparativ cu volumele 0,5 μl, respectiv 2 μl, însă fără diferențe considerabile față de 1 μl (Fig. 19).

Cimbru 2

- E. coli – PI a variat între 98,68% (1 μl) și 99,36% (1,5 μl); Nu s-au remarcat diferențe semnificative între DO, la volume diferite de ulei.
- S. aureus – PI a variat între 98,27% (1,5 μl) și 99,31% (0,5 μl); Nu s-au remarcat diferențe semnificative între DO, la volume diferite de ulei.

Cimbru 3

- E. coli – PI a variat între 89,59% (1,5 μl) și 97,49% (0,5 μl); Diferențe semnificative ($p < 0,001$) s-au înregistrat între DO la volumul de 0,5 și 1 μl, respectiv 1,5 μl și între DO la volumul de 2 și 1, respectiv 1,5 μl. Între 0,5 și 2 μl nu s-au înregistrat diferențe.
- S. aureus – PI a variat între 92,55% (2 μl) și 98,34% (1 μl); Diferențe semnificative ($p < 0,001$) s-au înregistrat între DO la volumul de 0,5 și 1,5 μl, respectiv 2 μl și între DO la volumul de 1 și 1,5, respectiv 2 μl. Între 0,5 și 1 μl nu s-au înregistrat diferențe.

Grapefruit 1

- E. coli – PI a variat între 2,7% (0,5 μl) și 20,41% (1 μl); Diferențe semnificative ($p < 0,001$) s-au înregistrat între DO la volumul de 0,5 și 1 μl, 1,5 μl, respectiv 2 μl și între DO la volumele de 1 și 2 μl.
- S. aureus (testul U Man Whitney) – la volumul de 0,5 μl, s-a produs o inhibare a creșterii cu 45,42% față de control, iar la volumul de 1,5 μl, cu doar 3,01% față de control; DO la aceste volume a variat nesemnificativ ($p > 0,05$); la volume mai mari de

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale ulei, creșterea bacteriană este stimulată semnificativ față de control ($p < 0,001$) (One sample T test)

Grapefruit 2

- *E. coli* – PI a variat între 14,56% (0,5 μ l) și 33,53% (2 μ l); Diferențe semnificative ($p < 0,001$) s-au înregistrat între DO la volumul de 0,5 și 1 μ l, 1,5 μ l, respectiv 2 μ l și între DO la volumele de 1 și 2 μ l.
- *S. aureus* – PI a variat între 3,85% (0,5 μ l) și 30,76% (1,5 μ l); Diferențe semnificative ($p < 0,001$) s-au înregistrat între DO la volumul de 0,5 și 1,5 μ l, respectiv 2 μ l, între DO la volumele de 1 și 1,5, respectiv 2 μ l și între DO la volumele de 1 și 2 μ l.
-

Testarea eficacității aceluiași tip de ulei, de la producători diferiți (C1 vs C2 vs C3 și G1 vs G2) (ANOVA Kruskal Wallis + comparații multiple) + asupra cărei tulpini (coli sau staf) are eficacitate mai bună (Testul U Man-Whitney)

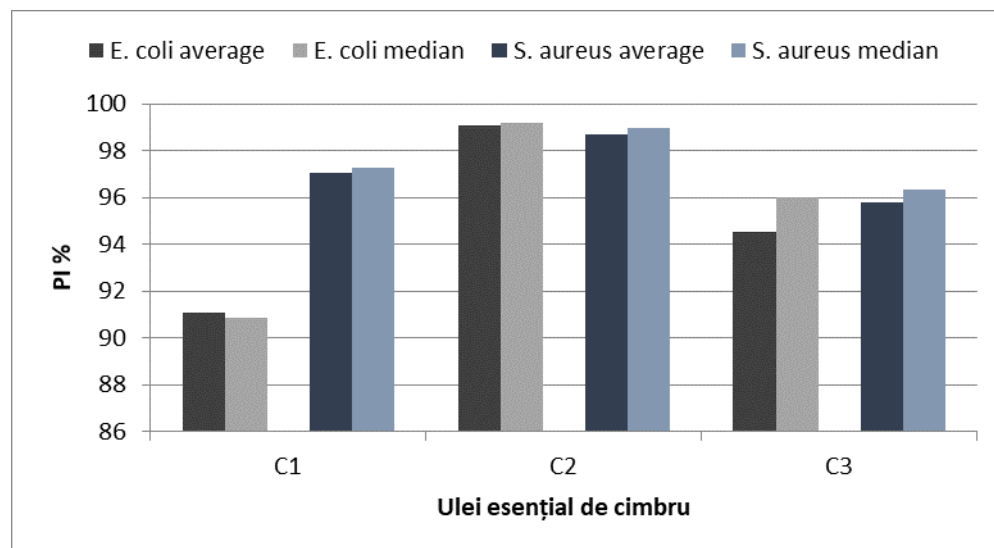


Figura 22. Procentul de inhibiție al uleiurilor de cimbru asupra *E. coli* (average, median) și *S. aureus* (average, median)

- *E. coli* – asupra acestei tulpini, uleiul C1 a exercitat un efect inhibitor semnificativ mai slab decât celelalte două uleiuri ($p < 0,05$); cel mai puternic efect antimicrobian l-a avut uleiul C2 ($p < 0,05$).
- *S. aureus* – cel mai puternic efect antimicrobian l-a avut uleiul C2 ($p < 0,05$), iar între activitățile inhibitorii ale C1 și C3 nu au existat diferențe semnificative.
- C1 a avut un efect inhibitor semnificativ mai accentuat asupra *S. aureus* decât asupra *E. coli* ($p < 0,05$), în timp ce C2 și C3 au prezentat efecte similare ($p > 0,05$).

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale

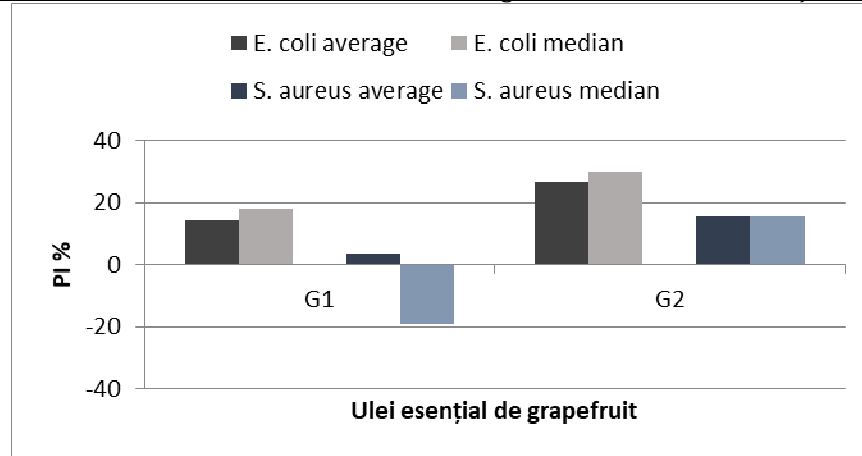


Figura 23. Procentul de inhibiție al uleiurilor de grapefruit asupra *E. coli* (average, median) și *S. aureus* (average, median)

- *E. coli* – există diferențe semnificative între activitățile antimicrobiene ale celor două uleiuri ($p < 0,05$).
- *S. aureus* – nu există diferențe semnificative între activitățile antimicrobiene ale celor două uleiuri ($p > 0,05$).
- G2 a avut un efect inhibitor semnificativ mai accentuat asupra lui *E. coli* decât asupra lui *S. aureus* ($p < 0,05$), în timp ce efectul lui G1 a fost mai scăzut și similar asupra ambelor tulpini ($p > 0,05$); În cazul G1, s-a constatat chiar stimularea creșterii bacteriene.

Testarea eficacității uleiului de cimbru și grapefruit (în general, independent de producător), în funcție de volumul utilizat (ANOVA Kruskal Wallis + comparații multiple)

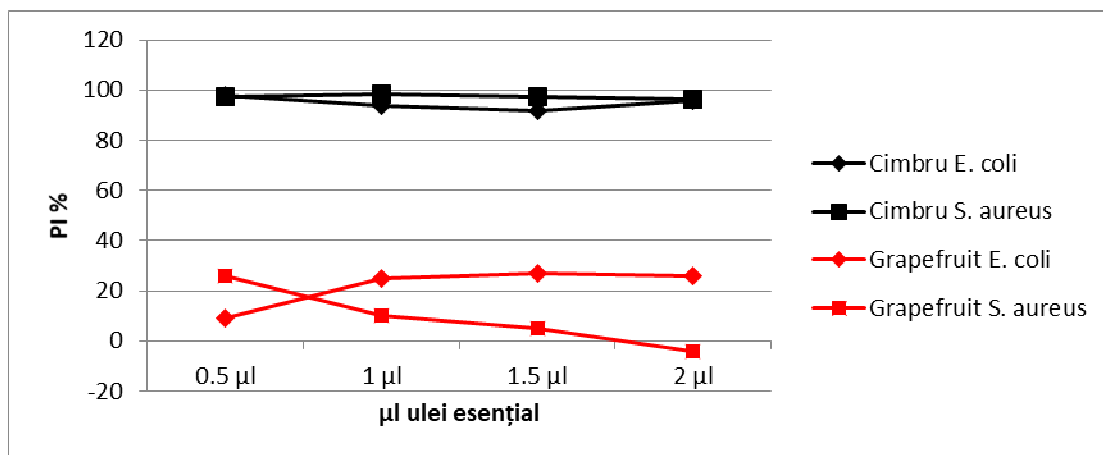
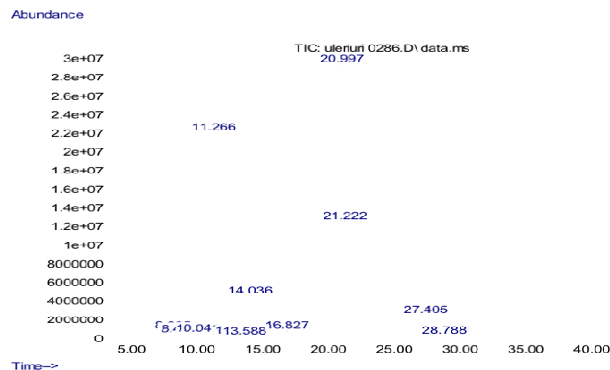


Figura 24. Variația PI a aceluiași tip de ulei pentru cele două tulpini bacteriene: *E. coli*, *S. aureus*

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale

- *E. coli* – uleiul esențial de cimbru manifestă activitate antibacteriană semnificativ mai crescută la volumul de 0,5 μl, comparativ cu volumele de 1 și 1,5 μl ($p < 0,05$), dar nu și comparativ cu cel de 2 μl ($p > 0,05$); uleiul esențial de grapefruit manifestă activitate antibacteriană semnificativ mai scăzută la volumul de 0,5 μl, comparativ cu volumele mai mari ($p < 0,05$);
- *S. aureus* – uleiul esențial de cimbru manifestă activitate antibacteriană semnificativ mai crescută la volumul de 1 μl, comparativ cu volumul de 2 μl ($p < 0,05$), dar nu și comparativ cu cele de 0,5 și 1,5 μl ($p > 0,05$); uleiul esențial de grapefruit manifestă activitate antibacteriană semnificativ mai scăzută la volumul de 2 μl, comparativ cu volumul de 0,5 μl ($p < 0,05$)
-

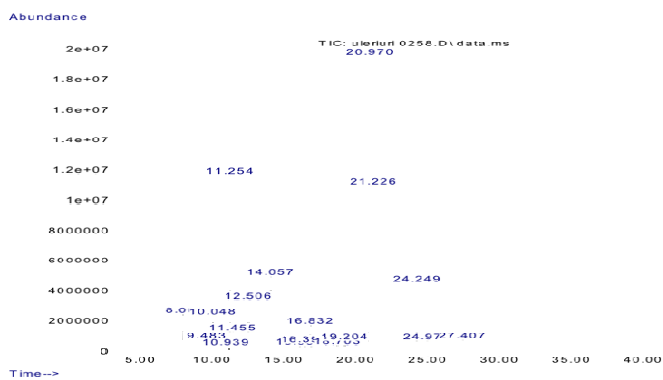
B4. Determinarea prin metoda GC-MS a principalilor constituenți din cele șase tipuri de uleiuri esențiale testate. Identificarea compușilor cu activitate antimicrobiană Cimbru 1



Nr.	RT	P. (%)	Comp.
1	8,005	0,58	alpha-Pinene
2	10,043	0,34	beta-Pinene
3	11,265	22,33	o-Cymene
4	14,035	3,57	Linalool
5	16,826	0,79	Terpinen-4-ol
6	20,995	59,65	Thymol
7	21,224	10,19	Carvacrol
8	27,406	1,48	Caryophyllene oxide

Constituenti principali: Thymol (59,65%), o-Cymene (22,33%) și Carvacrol (10,19%)

Cimbru 2

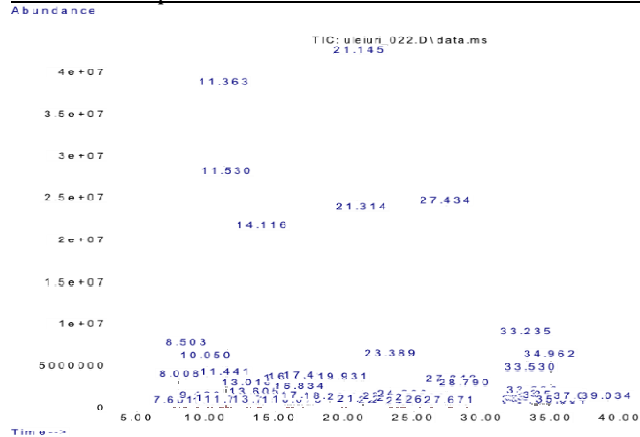


Nr.	RT	P. (%)	Comp.
1	8,009	2,38	alpha-Pinene
2	10,047	2,38	beta-Pinene
3	11,252	14,39	o-Cymene
4	11,455	1,36	Eucalyptol
5	12,504	3,66	gamma-Terpinene
6	14,056	6,16	Linalool
7	16,834	2,15	Terpinen-4-ol
8	20,97	44,75	Thymol
9	21,228	14,18	Carvacrol
10	24,251	4,13	Caryophyllene

Constituenti principali: Thymol (44,75%), o-Cymene (14,39%) și Carvacrol (14,18%) + gamma-Terpinene

Cimbru 3

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale



Nr.	RT	P. (%)	Comp.
1	8,009	0,56	alpha.-Pinene
2	8,504	1,24	Camphene
3	10,051	0,96	beta-Pinene
4	11,362	19,61	o-Cymene
5	11,531	5,35	Eucalyptol
6	14,115	6,73	Linalool
7	16,403	1,27	endo-Borneol
8	16,834	0,8	Terpinen-4-ol
9	17,498	0,87	alpha.-Terpineol
10	19,93	1,04	beta.-Myrcene
11	21,143	41,55	Thymol
12	21,312	5	Carvacrol
13	23,389	0,83	Geranyl acetate
14	27,435	4,38	Caryophyllene oxide

Constituenți principali: Thymol (41,55%), o-Cymene (19,61%) și **Carvacrol (5%)**

În literatura de specialitate este indicat faptul că activitatea antimicrobiană a multor uleiuri esențiale se datorează prezentei monoterpenilor în compoziția acestora.

În cazul uleiurilor de cimbru, principalii monoterpeni detectați prin analiza GC-MS au fost (după cum se poate observa mai sus): Thymol - compus majoritar în toate cele trei uleiuri, urmat de o-Cymene și Carvacrol.

În urma unei analize comparative a celor trei uleiuri (cu referire la acești compuși principali), se pot constata următoarele:

- **Cimbru 1:** ↑ Thymol, ↑ o-Cymene, ↓ Carvacrol (procent de inhibiție asupra *E. Coli* cuprins între 86,75% - 96,82%, iar asupra *S. aureus* între 96,19% - 97,97%);
- **Cimbru 2:** ↓ Thymol, ↓ o-Cymene, ↑ Carvacrol și, în plus față de celelalte, este întâlnit *gamma-Terpinene* - 3,66% (procent de inhibiție asupra *E. Coli* cuprins între 98,68% - 99,36%, iar asupra *S. aureus* între 98,27% - 99,31%);
- **Cimbru 3:** ↑ Thymol, ↑ o-Cymene, ↓ Carvacrol (procent de inhibiție asupra *E. Coli* cuprins între 89,59 - 97,49%, iar asupra *S. aureus* între 92,55% - 98,34%);

O concluzie pentru cele precizate mai sus ar putea fi aceea conform căreia prezența *Carvacrolului* într-o cantitate mai mare în cel de-al doilea ulei potențează activitatea antimicrobiană a acestuia. Procesul mai înainte precizat poate fi favorizat și de acțiunea ***gamma-Terpinene***, (compus prezent numai în cel de-al treilea ulei), acesta din urmă beneficiind de substanțiale proprietăți bactericide.

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale

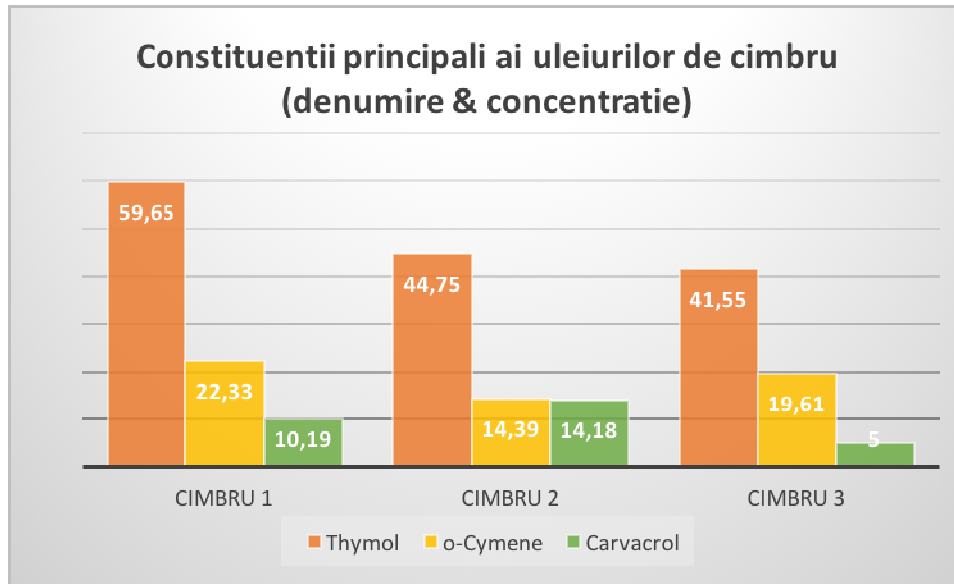
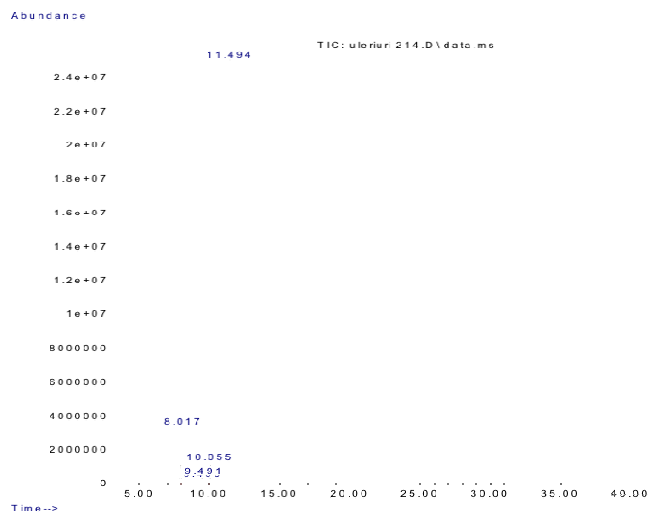


Figura 25. Constituenții principali ai uleiurilor de cimbru (denumire și concentrație)

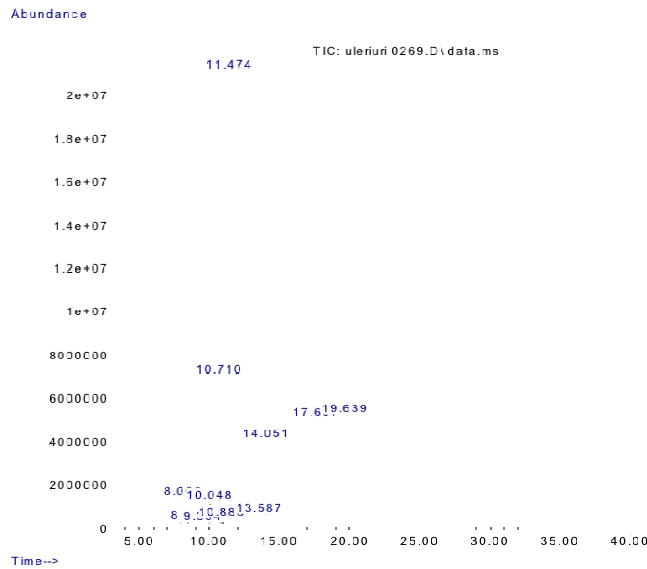
Grapefruit 1



Nr.	RT	P. (%)	Comp.
1	8,017	5,19	alpha.-Pinene
2	9,4	0,46	beta.-Phellandrene
3	9,489	0,74	beta.-Pinene
4	10,056	1,93	beta.-Myrcene
5	11,493	91,68	D-Limonene

Constituenti principali: D-Limonene (91,68%), alpha-Pinene (5,19%) și beta-Myrcene (1,93%)

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale Grapefruit 2



Nr.	RT	P. (%)	Comp.
1	8,009	1,85	alpha.-Pinene
2	9,392	0,36	beta.-Phellandrene
3	10,047	1,7	beta.-Pinene
4	10,711	10,77	gamma.-Terpinene
5	11,472	60,81	D-Limonene
6	14,052	6,48	Linalool
7	17,608	7,96	Estragole
8	19,638	8,16	Linalyl anthranilate

Constituenți principali: D-Limonene (68,81%), gamma-Terpinene (10,77%), Linalyl anthranilate (8,16%), Estragole (7,96%) și Linalool (6,48%).

În urma testării acestor două uleiuri, capacitatea inhibitorie maximă înregistrată a fost de numai 45,42% asupra *S. aureus* și 33,53% asupra *E. coli*, comparativ cu valorile de peste 90% obținute în cazul uleiurilor de cimbru.

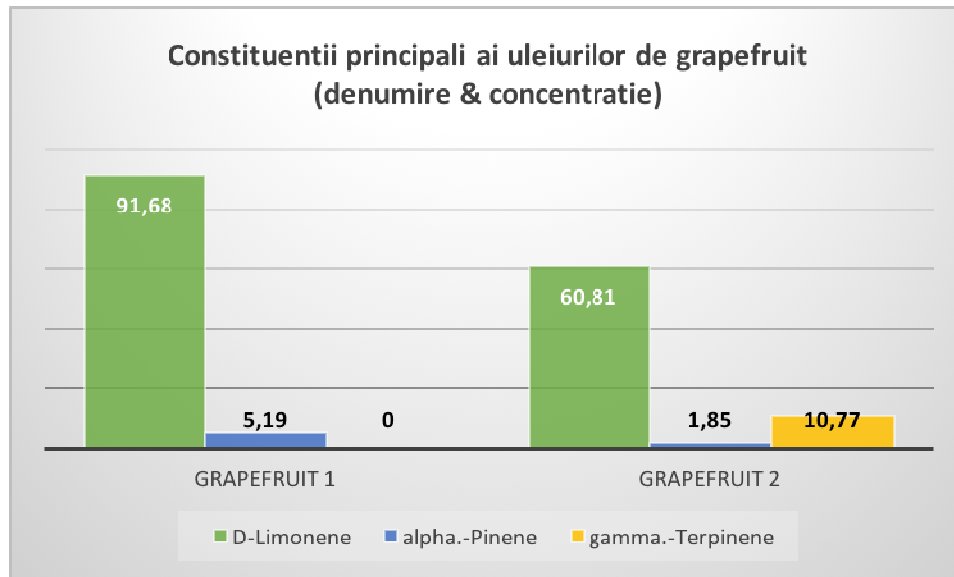


Figura 26. Constituenții principali ai uleiurilor de grapefruit (denumire și concentrație)

Lipsa compusilor mentionati mai sus, respectiv *Carvacrol*, *Thymol*, *o-Cymene* ar putea reprezenta o posibilă cauză a diminuării ratei de inhibiție a acestor uleiuri. Totuși, în

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale
 cazul celui de-al doilea ulei de Grapefruit (G2), s-a înregistrat un procent de inhibiție mai ridicat față de G1, fapt ce poate fi corelat cu prezența **gamma-Terpinene**. Această constatare ar putea confirma ipoteza descrisă mai sus (în cadrul analizei uleiurilor de cimbru), potrivit căreia acest compus posedă o bună capacitate bactericidă, potențând rata de inhibiție totală a uleiului.

Concluzii

- Uleiul de cimbru are activitate antibacteriană net superioară uleiului de grapefruit (care nu depășește 50%) ;
- La volume mai mari de 1 μl, unele uleiuri esențiale de grapefruit potențează creșterea microbiană, comparativ cu controlul;
- În cazul uleiului esențial de cimbru, există diferențe semnificative în ceea ce privește activitatea antimicrobiană, în funcție de producător, atât asupra *E. coli*, cât și asupra *S. aureus*;
- În cazul uleiului esențial de grapefruit, există diferențe semnificative în ceea ce privește activitatea antimicrobiană, în funcție de producător, doar asupra *E. coli*;
- Asupra tulpinilor de *E. coli*, uleiurile esențiale de cimbru exercită cea mai puternică activitate antimicrobiană la volume mici (0,5 μl), iar asupra tulpinilor Gram pozitive, la volume cuprinse între 0,5 și 1,5 μl (cea mai ridicată la 1 μl) ; În cazul *S. aureus*, activitatea antimicrobiană scade semnificativ la depășirea volumului de 1,5 μl;
- Asupra tulpinilor de *E. coli*, activitatea antimicrobiană a uleiurilor esențiale de grapefruit crește semnificativ cu creșterea volumului, iar asupra tulpinilor de *S. aureus*, scade semnificativ cu creșterea volumului.

Bibliografie

1. Reller LB, Weinstein M, Jorgensen JH, Ferraro MJ. "Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices", *Clin Infect Dis.* 2009;49(11):1749–1755.
2. Thielmann J, Muranyi P, Kazman P. "Screening essential oils for their antimicrobial activities against the foodborne pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*". *Heliyon.*, 2019;5(6):e01860, doi:10.1016/j.heliyon.2019.e01860
3. Giweli, Abdulmid, Ana M. Džamic, Marina Sokovic, Mihailo S. Ristic, and Petar D. Marin. 2012. "Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils of Satureja Thymbra Growing Wild in Libya." *Molecules* 17 (5): 4836–50. <https://doi.org/10.3390/molecules17054836>.
4. Rota, María C., Antonio Herrera, Rosa M. Martínez, Jose A. Sotomayor, and María J. Jordán. 2008. "Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Thymus Vulgaris, Thymus Zygis and Thymus Hyemalis Essential Oils." *Food Control* 19 (7): 681–87. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.07.007>.
5. Bagnoli, F., Rappuoli, R., Grandi, G., 2017 - *Staphylococcus aureus: Microbiology, Pathology, Immunology, Therapy and Prophylaxis*, Editura Springer, Zug.
6. Fetsch Alexandra, 2018 - *Staphylococcus aureus*, Editura Elsevier, Londra.
7. Preedy, R.V., *Essential Oils in Food Preservation Flavor and Safety*, 2016 - Ed. Elsevier, Londra.
8. Borugă, O., Jianu, C., Mișcă, C., Goleț, I., Gruia, A.T., Horhat, F.G., 2014 - Thymus vulgaris essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *J Med Life.* 2014;7 Spec No. 3(Spec Iss 3):56-60.
9. De Martino, L., De Feo, V., Fratianni, F., Nazzaro, F., 2009 - Chemistry, Antioxidant, Antibacterial and Antifungal Activities of Volatile Oils and their Components. *Natural Product Communications.* <https://doi.org/10.1177/1934578X0900401226>.

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale

10. Andrei, F., Grujic, D., Ersilia, A., Tulcan, C., Lazar, C., Olteanu, C., Dragomirescu, A., 2018 - Lavandula Essential Oils: Applications in Medical, Pharmaceutical, Food, and Cosmetic Industries, Proceedings of the Romanian National Congress of Pharmacy, 17th edition: 21st Century Pharmacy - between intelligent specialization and social responsibility:20-25.
11. Man, A., Santacroce, L., Jacob, R., Mare, A., Man, L., 2019 - Antimicrobial Activity of Six Essential Oils Against a Group of Human Pathogens: A Comparative Study [published correction appears in Pathogens. 2019 Jul 25;8(3):]. Pathogens. 2019;8(1):15. Published 2019 Jan 28. doi:10.3390/pathogens8010015.
12. Muntean, Delia, Licker, Monica, Alexa, Ersilia, Popescu, Iuliana, Jianu, C., Buda, Valentina, Dehelean, Cristina A., Ghiulai, Roxana, Horhat, F., Horhat, Delia, Danciu, Corina, 2019 - Evaluation of essential oil obtained from *Mentha piperita* L. against multidrug-resistant strains. Infect Drug Resist, doi:10.2147/IDR.S218141.
13. Rohraff, D., Roderick, M., 2014 - The Evaluation of Essential Oils for Antimicrobial Activity. Student Summer Scholars. 124. <http://scholarworks.gvsu.edu/sss/124>
14. Xu, J.G., Liu, T., Hu, Q.P., Cao, X.M., 2016 - Chemical Composition, Antibacterial Properties and Mechanism of Action of Essential Oil from Clove Buds against *Staphylococcus aureus*. Molecules. 2016;21(9):1194. Published 2016 Sep 8. doi:10.3390/molecules21091194.
15. Yap, P.S., Yiap, B.C., Ping, H.C., Lim, S.H., 2014 - Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. Open Microbiol J. 2014;8:6-14. Published 2014 Feb 7. doi:10.2174/1874285801408010006

Activități de diseminare a rezultatelor cercetării Lucrări științifice publicate

Tripon R., Repone C., Țurai M., Chiș C., Oiegaș S., Boldura O.M., Tulcan C.- "Performance characteristic evaluation of Folin Ciocalteu Micro-method for total polyphenols determination from plant extracts", LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE MEDICINĂ VETERINARĂ VOL. LIII(1), 2020, TIMIȘOARA

Lucrări prezentate la Simpozionul YOUNG PEOPLE AND AGRICULTURE RESEARCH – 16TH EDITION, 27 Nov. 2020, Timisoara, in curs de publicare

1. Tripon Roberta, Bosioc P., Tulcan Camelia, Nicolin Alma, Oana Maria Boldura - COMPARATIVE STUDY REGARDING THE INFLUENCE OF TWO DIFFERENT SOLVENTS IN THE GC-MS ANALYSIS OF SOME NATURAL ESSENTIAL OILS, Faculty of Veterinary Medicine Timisoara
2. Petrică BOSIOC, Florentina BOSIOC, Monica PÎRLIȚEANU, Camelia TULCAN, Alma L. NICOLIN - INHIBITORY ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS ON STAPHYLOCOCCUS AUREUS- Faculty of Agriculture Timisoara
3. Monica PÎRLIȚEANU, Ramona-Mădălina MIRON, Florentina BOSIOC, Petrică BOSIOC, Camelia TULCAN, Alma L. NICOLIN - INHIBITORY ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS ON ESCHERICHIA COLI -- Faculty of Agriculture Timisoara

Lucrări de dizertație Facultatea de Agricultură

Master

1. Bosioc Petrică – "Activitatea inhibitorie a mai multor uleiuri esențiale asupra bacteriei *Staphylococcus aureus*"
2. Bosioc Florentina - "Activitatea inhibitorie a unor uleiuri esențiale asupra bacteriei *Escherichia coli*"

Prezentare activitate proiect in cadrul Workshopului: **EU-OPENSREEN Workshop – Achieving competitiveness in chemical biology through chemical repository sharing - H2020**

4.3.3. Studiu privind evaluarea efectului antimicrobian sinergic al extractelor naturale și uleiurilor esențiale
- INFRADEV-03-2018-2019 Ensuring long-term sustainability of excellence in chemical biology within Europe and beyond, 30 Nov 2020 – Online.