

Przeciwwgrzybicze działanie olejku goździkowego

¹Zakład Mikrobiologii Jamy Ustnej, Katedra Mikrobiologii, Gdański Uniwersytet Medyczny
Kierownik Zakładu i Katedry: dr hab. Anna Kędzia, prof. nadzw.

²Katedra i Zakład Stomatologii Zachowawczej, Gdański Uniwersytet Medyczny
Kierownik Katedry i Zakładu: dr hab. Barbara Kochańska, prof. nadzw.

³Katedra i Zakład Periodontologii i Chorób Błony Śluzowej Jamy Ustnej,
Gdański Uniwersytet Medyczny
Kierownik Katedry i Zakładu: dr hab. Aida Kusiak, prof. nadzw.

⁴Zakład Ortodoncji, Gdański Uniwersytet Medyczny
Kierownik Zakładu: dr hab. Anna Wojtaszek-Słomińska

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF CLOVE OIL (OLEUM CARYOPHYLLI)

SUMMARY

Cloves (*Eugenia caryophyllata* Thunb, syn. *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et Perry) are the aromatic dried flower buds of a tree in the family Myrtaceae. Clove oil can be obtained from the flower buds. The essential oil is widely used and well known for its medicinal properties. Several constituents of clove oil has been identified, mainly eugenol and lesser amounts of other compounds such as acetyeugenol, isoeugenol, α - and β -caryophyllene, α - and β -pinene, limonene, benzyl acid and alcohol and cinnamaldehyde. Several studies have demonstrated potent antibacterial, antifungal, antiviral and insecticidal effect of essential oil of clove. A total 36 strains of yeastlike fungi isolated from patients with oral candidosis and 6 standards strains were tested. The susceptibility (MIC) yeastlike fungi to clove oil was determined by means plate dilution technique in Saboraud's agar. The inoculum contained 10^5 CFU per spot were seeded with Stars replicator upon the surface of agar containing oil and without clove oil agar plates (the strains growth control). The cultures were incubated in aerobic conditions at 37°C for 24 hrs. The MIC was defined as the lowest concentrations of oil that completely inhibited growth of tested strains. The results indicated, that the most susceptible to clove oil were strains from the genus of *Candida utilis* (MIC = 0.25 mg/ml). The clove oil exhibited strong antifungal activity against the strains from the genus of *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* and *C. tropicalis* too. The growth of these strains were inhibited within the range from 0.25 to 0.5 mg/ml. Furthermore high level of activity was observed against the strains from the genus of *C. krusei*, *C. lusitaniae* and *C. parapsilosis* (MIC = 0.5 mg/ml). The strains *C. kefyr* were the lowest sensitive. The growth of these strains were inhibited within the range from 0.5 to 1.0 mg/ml.

KEY WORDS: CLOVE OIL – ANTIFUNGAL ACTIVITY –
CANDIDA SPECIES

Wprowadzenie

Goździki zostały opisane przez Chińczyków już w 400 roku p.n.e. Grecy dostarczali je jako przyprawę

do Aleksandrii jeszcze przed powstaniem Rzymskiego Imperium. Goździkowiec wonny, zwany też goździkowcem aromatycznym (*Eugenia caryophyllata* Thunb, syn. *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry) jest wiecznie zielonym drzewem z rodziny mirtowatych (*Myrtaceae*). Nazwa goździk pochodzi od słów eugenia (j. łaciński) i caryophyllatus (j. grecki), które nawiązywały do orzechopodobnego wyglądu pąków kwiatowych. Natomiast wyraz clove (od łacińskiego słowa *clavus*) oznacza gwóźdź. Drzewo rośnie w krajach strefy podzwrotnikowej, tj. Filipiny, Indonezja, Tanzania, na Molukkach, Zanzibarze, Seszelach oraz w Indiach Zachodnich i na Sri Lance. Osiąga wysokość do 15 m i owocuje dopiero po ok. 10 latach. Wytwarza pąki, które w stanie świeżym są koloru różowego, a po wysuszeniu mają barwę rdzawobrazową. Do celów leczniczych wykorzystuje się wysuszone pąki kwiatowe (*Flos Caryophylli*), popularnie zwane goździkami. Z nich metodą destylacji, otrzymywany jest olejek goździkowy (*Oleum Caryophylli*).

Zawartość olejku eterycznego w goździkach wynosi od 19 do 25%. Dominującym składnikiem olejku jest eugenol (do 95%), który jest bezbarwnym lub jasno-żółtym rzadkim płynem o mocnym aromatycznym zapachu goździków. Ponadto olejek zawiera pochodne fenolu, tj. acetoeugenol i izoeugenol, seskwiterpeny (α - i β -kariofilylen), terpeny (α - i β -pinen, limonen), kwas oraz alkohol benzoowy i aldehyd cynamonowy (1-6). Poza olejkiem eterycznym są też obecne garbniki, kwas oleanolowy i związki śluzowe.

Goździki mają działanie przeciwbiegunkowe, pobudzają trawienie i zapobiegają zakażeniom przewodu pokarmowego. Olejek goździkowy stosowany jest w terapii górnych dróg oddechowych, w reumatyzmie i nerwobólach, przeziębieniach, nudnościach, wymiotach i zaburzeniach trawienia. W stomatologii

znalazł zastosowanie zarówno olejek goździkowy, jak i otrzymany z niego eugenol, które wykazują działanie antyseptyczne i przeciwbólowe. Są używane do odkażania kanałów korzeniowych i ubytków próchnicowych zębów. Olejek goździkowy dodawany jest do past przeznaczonych do szczotkowania zębów oraz preparatów antyseptycznych stosowanych do płukania jamy ustnej, w różnych zakażeniach w jej obrębie. Poza tym olejek goździkowy oraz eugenol wykorzystywane są do poprawiania smaku i zapachu leków, do preparatów przeznaczonych do inhalacji, a także jako przyprawa do produktów spożywczych i potraw. Olejek wykazuje też właściwości przeciwutleniające (2, 6-8) i przeciwnowotworowe (2, 9).

Olejek goździkowy oraz jego niektóre składniki wykazują aktywność przeciwbakteryjną (1, 2, 12-14, 19, 20, 24-26, 30, 31), przeciwgrzybiczą (1, 4, 7, 10, 17, 19, 21-23), przeciwwirusową (27-29) i przeciw pasożytniczą (11). Doświadczenia przeprowadzone przez Chaieba i wsp. (2) oraz Janssena i wsp. (31) wykazały aktywność olejku goździkowego wobec szczepów *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*. Chao i wsp. (16) udowodnili działanie olejku na szczepy metycylinoopornego gronkowca złocistego (MRSA) (strefa zahamowania wzrostu szczepu wynosiła 20 mm). Kolejne badania przeprowadzone przez Saeeda i wsp. (25) wskazują na wrażliwość na olejek szczepów z gatunku *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella ozaenae*, *K. pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhi*, *Salmonella dysenteriae* i *Vibrio cholerae*. Strefy zahamowania wzrostu szczepów wynosiły od 11,87 do 23,75 mm. Natomiast w przypadku szczepów *Listeria monocytogenes* liczba drobnoustrojów w hodowli obniżyła się o od 0,7 do $3,8 \times 10^{10}$ CFU/ml w porównaniu z hodowlą kontrolną, po 14 dniach działania olejku w temp. 5°C.

Crociani (32) badał wyizolowane z ubytków próchnicowych szczepy z gatunku *Bifidobacterium inopinatum*, *B. denticolens* oraz *B. dentium* i wykazał ich wrażliwość na olejek w stężeniu wynoszącym od 600 do 1400 µg/ml. Natomiast oceniane przez Ali i wsp. (26) bakterie beztlenowe powodujące choroby przyzębia, tj. *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *P. melaninogenica* były wrażliwe na olejek goździkowy w stężeniach od 1 do 18 µg/ml, a bakterie mikroaerofilne z gatunku *Actinomyces actinomycetemcomitans* (obecnie *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) i *Capnocytophaga gingivalis*, były wrażliwe na stężenia od 1 do 4 µg/ml. Z kolei badane przez tych autorów szczepy bakterii tlenowych z gatunku *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli* okazały się wrażliwe na stężenia od 18 do 24 µg/ml.

Aktywność przeciwgrzybicza olejku goździkowego była głównie oceniana na szczepach z gatunku *Candida albicans*. Brakuje szerszych informacji odnośnie działania tego olejku na inne gatunki z rodzaju *Candida*.

Cel pracy

Celem pracy było zbadanie wrażliwości różnych gatunków grzybów drożdżopodobnych wyizolowanych z zakażeń jamy ustnej.

Materiały i metody

Szczepy grzybów drożdżopodobnych wykorzystane do badań zostały wyhodowane z materiałów pobranych od pacjentów z kandydozą w obrębie jamy ustnej. Materiały były posiewane na podłoże Sabourauda. Inkubację posiewów prowadzono w warunkach tlenowych w temp. 37°C przez 24-48 godz. Wyhodowane szczepy grzybów identyfikowano na podstawie morfologii komórek, wyglądu kolonii i wzrostu szczepu na podłożu CHROMagar Candida (Becton Dickinson), cech biochemicznych (20C AUX bio Merieux) oraz zdolności do filamentacji i wytwarzania chlamydospor.

Ocenie wrażliwości poddano 36 szczepów należących do następujących gatunków: *C. albicans* (9 szczepów), *C. glabrata* (4), *C. guilliermondii* (3), *C. kefyr* (2), *C. krusei* (4), *C. lusitaniae* (2), *C. parapsilosis* (4), *C. tropicalis* (6), *C. utilis* (2) oraz 5 szczepów wzorcowych, w tym *C. albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* ATCC 60032, *C. krusei* ATCC 14243, *C. parapsilosis* ATCC 22019 i *C. tropicalis* ATCC 750.

Badanie wrażliwości wymienionych szczepów na olejek goździkowy (Avicenna-Oil, Wrocław) przeprowadzono metodą seryjnych rozcieńczeń w agarze Sabourauda. Bezpośrednio przed doświadczeniem 100 mg olejku rozpuszczano w 1 ml DMSO (Serva). Dalsze rozcieńczenia wykonywano w jałowej wodzie destylowanej, uzyskując stężenia: 2,0, 1,0, 0,5, 0,25, 0,12 i 0,06 mg/ml. Inokulum zawierające 10^5 CFU na kroplę nanoszoną aparatem Steersa na powierzchnię podłoża zawierających olejek i bez olejku (kontrola wzrostu szczepów). Hodowlę podłoży prowadzono w warunkach tlenowych w temp. 37°C przez 24 godz. Za najmniejsze stężenie hamujące (MIC) przyjęto takie, które całkowicie hamowało wzrost testowanych szczepów grzybów.

Wyniki i dyskusja

W tabeli 1 zostały zamieszczone wyniki badań wrażliwości na olejek goździkowy szczepów grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* wyizolowanych z zakażeń, a w tabeli 2 wrażliwość na ten olejek szczepów wzorcowych. Testowane szczepy grzybów drożdżopodobnych wykazały wrażliwość na olejek

Tabela 1. Wrażliwość grzybów drożdżopodobnych na olejek goździkowy.

| Grzyby drożdżopodobne | Liczba szczepów | Najmniejsze stężenie olejku goździkowego hamujące wzrost szczepów MIC (mg/ml) | | | | | |
|-------------------------------|-----------------|---|-----|-----|------|------|--------|
| | | ≥ 2,0 | 1,0 | 0,5 | 0,25 | 0,12 | ≤ 0,06 |
| <i>Candida albicans</i> | 9 | | | 5 | 4 | | |
| <i>Candida glabrata</i> | 4 | | | 2 | 2 | | |
| <i>Candida guilliermondii</i> | 3 | | | 1 | 2 | | |
| <i>Candida kefyr</i> | 2 | | 1 | 1 | | | |
| <i>Candida krusei</i> | 4 | | | 4 | | | |
| <i>Candida lusitanae</i> | 2 | | | 2 | | | |
| <i>Candida parapsilosis</i> | 4 | | | 4 | | | |
| <i>Candida tropicalis</i> | 6 | | | 4 | 2 | | |
| <i>Candida utilis</i> | 2 | | | | 2 | | |
| Grzyby <i>Candida</i> ogółem | 36 | | 1 | 23 | 12 | | |

Tabela 2. Wrażliwość 5 szczepów wzorcowych grzybów drożdżopodobnych na olejek goździkowy.

| Grzyby drożdżopodobne | Liczba szczepów | Najmniejsze stężenie hamujące MIC (mg/ml) | | | | | |
|--|-----------------|---|-----|-----|------|------|--------|
| | | ≥ 2,0 | 1,0 | 0,5 | 0,25 | 0,12 | ≤ 0,06 |
| <i>Candida albicans</i> ATCC 90028 | 1 | | | 1 | | | |
| <i>Candida glabrata</i> ATCC 60032 | 1 | | | 1 | | | |
| <i>Candida krusei</i> ATCC 14243 | 1 | | | 1 | | | |
| <i>Candida tropicalis</i> ATCC 19606 | 1 | | | | 1 | | |
| <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019 | 1 | | | 1 | | | |

w stężeniach wynoszących od 0,25 do 1,0 mg/ml. Największą aktywnością na olejek charakteryzowały się szczepy z gatunku *Candida utilis* (MIC = 0,25 mg/ml). Wysoką wrażliwość wykazały szczepy z gatunków *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* i *C. tropicalis*. Wartości MIC dla tych szczepów wynosiły od 0,25 do 0,5 mg/ml. Niewiele niższą wrażliwością charakteryzowały się szczepy z gatunku *C. krusei*, *C. lusitanae* i *C. parapsilosis*. Stężenie hamujące wzrost tych szczepów wynosiło 0,5 mg/ml. Natomiast najmniej wrażliwe w zakresie badanych stężeń okazały się szczepy z gatunku *C. kefyr* (MIC w zakresie 0,5-1,0 mg/ml).

Należy zaznaczyć, że wysoką wrażliwość na testowany olejek wykazały szczepy z gatunku *C. albicans*, które zwykle są przyczyną zakażeń. Stężenie olejku hamujące wzrost 45% tych szczepów wynosiło 0,25 mg/ml, a dla pozostałych szczepów 0,5 mg/ml. Oceniany w badaniach przez Morrisa i wsp. (33) szczep z gatunku *C. albicans* także był wrażliwy w stężeniu wynoszącym

0,5 mg/ml. W kolejnych badaniach (10) wrażliwość szczepów *C. albicans* była znacznie niższa. Wzrost tych szczepów był hamowany w zakresie stężeń od 3,4 do 9,0 mg/ml.

Doświadczenia przeprowadzone przez innych autorów również wskazują na znaczną aktywność olejku goździkowego wobec szczepów z gatunku *C. albicans*. Uzyskane metodą krążkowo-dyfuzyjną strefy zahamowania wzrostu szczepów były zróżnicowane i wynosiły w badaniach Chaieba i wsp. (7) – 16,95 mm, Morrisa i wsp. (33) – 18 mm, Ayoda i wsp. (1) – 21 mm, Rusenova i wsp. (20) – 23 mm oraz Jenssena i wsp. (31) – 28,3 mm.

Chaieb i wsp. (7) ocenili też wrażliwość na olejek goździkowy innych gatunków szczepów z rodzaju *Candida*, w tym *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. lipolytica*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. sake*, *C. tropicalis* oraz *C. utilis* i wykazali, że strefy zahamowania wzrostu wynosiły od 9 do 21 mm. W tych badaniach najbardziej wrażliwe szczepy należały do gatunku *C. sake* i *C. utilis* (strefa zahamowania wzrostu wynosiła odpowiednio

21 i 20 mm), a najmniej wrażliwy szczep należał do gatunku *C. lipolytica* (strefa zahamowania wzrostu wynosiła 9 mm).

Podsumowując warto podkreślić, że olejek goździkowy charakteryzował się wysoką aktywnością wobec wszystkich testowanych szczepów grzybów drożdżopodobnych. Niskie stężenie olejku wynoszące 0,25 mg/ml, hamowało wzrost 33%, a stężenie 0,5 mg/ml hamowało wzrost kolejnych 64% szczepów.

Wnioski

1. Olejek goździkowy wykazał aktywność wobec wszystkich badanych szczepów z rodzaju *Candida*.
2. Największą wrażliwością charakteryzowały się szczepy z gatunku *C. utilis*, a najniższą *C. kefir*.
3. Olejek goździkowy wykazał wysoką aktywność wobec ocenianych szczepów grzybów drożdżopodobnych, co wskazuje na możliwość praktycznego wykorzystania go w profilaktyce i terapii.

Piśmiennictwo

1. Ayoola GA, Lawore FM, Adelowotan T i wsp. Chemical analysis and antimicrobial activity of the essential oil of *Syzygium aromaticum* (clove). *Afr J Microbiol Res* 2008; 2:162-6. 2. Chaieb K, Hajlaoui H, Zamantar T i wsp. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L., *Myrtaceae*): A short review. *Phytother Res* 2007; 21:501-6. 3. Prashar A, Locke JC, Evans CS. Cytotoxicity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil and its major components to human skin cells. *Cell Prolif* 2006; 39:241-8. 4. Guynot ME, Ramos AJ, Seto L i wsp. Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oil against fungi commonly causing deterioration of bakery products. *J Appl Microbiol* 2003; 94:893-9. 5. Pawar VC, Thaker VS. *In vitro* efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. *Mycoses* 2006; 49:316-23. 6. Nassar MJ, Gaara AH, El-Ghorab AH i wsp. Chemical constituents of clove (*Syzygium aromaticum* fam. *Myrtaceae*) and their antioxidant activity. *Rev Latinoamer Quim* 2007; 35(3):47-53. 7. Chaieb K, Zmantar T, Ksouri R i wsp. Antioxidant properties of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* and its antifungal activity against a large number of clinical *Candida* species. *Mycoses* 2007; 50:403-6. 8. Ogata M, Hoshi M, Urano S i wsp. Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. *Chem Pharm Bull* 2000; 48:1467-9. 9. Zheng GQ, Kenney PM, Lam LK. Sesquiterpens from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. *J Nat Prod* 1992; 55:999-1003. 10. Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem* 2003; 10:813-29. 11. Yang YC, Lee HS, Clark JM i wsp. Insecticidal activity of plant essential oils against *Pediculus humanus capitis* (*Anoplura pediculidae*). *J Med Entomol* 2004; 41:699-704. 12. Fabian D, Sabol M, Domaracka K i wsp. Essential oils – their antimicrobial activity against *Escherich-*

ia coli and effect on intestinal cell viability. *Toxicol In Vitro* 2006; 20:1435-45. 13. Kędzia A. Ocena działania przeciwbakteryjnego olejku goździkowego (*Oleum Caryophylli*). *Post Fitoter* 2007; (2):66-70. 14. Fabio A, Cermelli C, Fabio G i wsp. Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on microorganisms responsible for respiratory infections. *Phytother Res* 2007; 21:374-7. 15. Kędzia A, Kusiak A, Kočańska B i wsp. Wrażliwość bakterii tlenowych na olejek goździkowy (*Oleum Caryophylli*). *Post Fitoter* 2011; 3:164-8. 16. Chao S, Young G, Oberg C i wsp. Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by essential oils. *Flavour Fragr J* 2008; 23:444-9. 17. Kishore GK, Pande S, Harish S i wsp. Evaluation of essential oil and their components for broad-spectrum antifungal activity and control late leaf spot and crown root diseases in peanut. *Plant Dis* 2007; 91(4):375-9. 18. Singh G, Maurya S. Antimicrobial, antifungal and insecticidal investigations on essential oils. An overview. *Nat Prod Rad* 2005; 4(3):179-92. 19. De M, De AK, Banerjee AB. Antimicrobial screening of some Indian species. *Phytother Res* 1999; 13:616-8. 20. Rusenova N, Parvanov. Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganisms of veterinary importance. *Trakia J Sci* 2009; 7(1):37-43. 21. Nzeako BC, Lawati BA. Comparative studies of antimycotic potential of thyme and clove oil extracts with antifungal antibiotics on *Candida albicans*. *Afr J Biotechnol* 2008; 7(11):1612-9. 22. Park MJ, Gwak KS, Yang I i wsp. Antifungal activities of the essential oils in *Syzygium aromaticum* (L.) Merr ET Perry and *Leptospermum petersonii* and their constituents against various dermatophytes. *J Microbiol* 2007; 45(5):400-5. 23. Pinto E, Vale-Silva L, Cavaleiro C i wsp. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J Med Microbiol* 2009; 58:1452-62. 24. Mytke N, Anderson GL, Doyle MP i wsp. Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. *Food Contr* 2006; 17:102-7. 25. Saeed S, Tariq P. *In vitro* antibacterial activity of clove against Gram-negative bacteria. *Pak J Bot* 2008; 40(5):2157-60. 26. Ali HS, Kamal M, Mohamed SB. *In vitro* clove oil activity against periodontopathic bacteria. *J Sci Techn* 2009;10(1):1-7. 27. Baudoux D, Zhiri A. Aromatherapy alternatives for gynecological pathologies recurrent vaginal *Candida* and infections caused by the human *papilloma virus* (HPV). *Int J Clin Aromather* 2005; 2:34-9. 28. Benecia F, Courreges MC. *In vitro* and *in vivo* activity of eugenol on human *herpes viruses*. *Phytother Res* 2000; 14:495-500. 29. Adorian B, Buchbauer G. Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour Fragr J* 2010; 25:407-26. 30. Tulio V, Nostro A, Mandras N i wsp. Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. *J Appl Microbiol* 2006; 102:1544-50. 31. Janssen AM, Chin NLJ, Scheffer JJC i wsp. Screening for antimicrobial activity of some essential oils by the agar overlay technique. *Pharmaceut Week Sci Ed* 1986; 8:289-92. 32. Crociani F, Biavati, Alessandrini A i wsp. Growth inhibition of essential oils and other antimicrobial agents towards *Bifidobacterium* from dental caries. 27th Int Symp. on Essential oils. Vienna 1996; 40-4. 33. Morris JA, Khettry A, Seitz EW. Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. *J Am Oil Chem Soc* 1979; 56:595-03.

otrzymano/received: 04.02.2014
zaakceptowano/accepted: 14.02.2014

Adres/address:
*dr hab. Anna Kędzia, prof. nadzw.
Zakład Mikrobiologii Jamy Ustnej, Katedra Mikrobiologii
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Do Studzienki 38, 80-227 Gdańsk
tel.: +48 (58) 349-21-85
e-mail: anak@gumed.edu.pl