

Antimikrobiální aktivita vybraných léčivých rostlin z Peru

Rigorózní práce

Mgr. BLANKA SVOBODOVÁ

2009

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto rigorózní práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele doc. Ing. Ladislava Kokošky, PhD. (Institut tropů a subtropů České zemědělské univerzity v Praze), a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

V Praze dne.....

.....
Podpis

Seznam zkratk

ATCC	American Type Culture Collection
CFU	Colony-forming unit (Kolonie tvořící jednotka)
DMSO	Dimethyl sulfoxid
G+	Grampozitivní (bakterie)
G-	Gramnegativní (bakterie)
MIC	Minimal inhibition concentration (Minimální inhibiční koncentrace)
TBS	Tris-buffer saline (Tris-fosfátový fyziologický pufr)

Obsah

<u>1. Předmluva.....</u>	<u>5</u>
<u>2. Úvod.....</u>	<u>7</u>
<u>2.1. Antimikrobiální aktivita vyšších rostlin.....</u>	<u>7</u>
<u>2.2. Léčivé rostliny z peruánské Amazonie.....</u>	<u>7</u>
<u>2.3. Screeningové metody antimikrobiální aktivity.....</u>	<u>7</u>
<u>3. Experimentální část.....</u>	<u>9</u>
<u>3.1. Materiál a metody.....</u>	<u>9</u>
<u>3.1.1. Chemikálie.....</u>	<u>9</u>
<u>3.1.2. Rostlinný materiál.....</u>	<u>10</u>
<u>3.1.3. Mikroorganismy.....</u>	<u>13</u>
<u>3.1.4. Testy antimikrobiální aktivity.....</u>	<u>14</u>
<u>4. Výsledky a diskuze.....</u>	<u>15</u>
<u>5. Závěr.....</u>	<u>22</u>
<u>6. Literatura.....</u>	<u>23</u>
<u>7. Přílohy.....</u>	<u>28</u>

1. Předmluva

Hlavním důvodem, proč se pozornost vědecké komunity v poslední době soustřeďuje na hledání antimikrobiálních látek z rostlin, je problém stoupající rezistence bakterií ke stávajícím antibiotikům a jiným biocidním látkám. Čas, který uplyne od doby uvedení antibiotika na trh a vytvořením bakteriální rezistence proti němu, se neustále zkracuje a tento fakt vybízí k hledání strukturně zcela odlišných látek s podobnou aktivitou [1]. Dalším z nesporných důvodů, které hovoří ve prospěch antimikrobiálních látek z rostlin, je stoupající zájem o produkty přírodního původu, vzhledem k jejich dostupnosti, nižším vedlejším účinkům, nízké toxicitě a především vysoké biodegradabilitě, v porovnání se standardně používanými antibiotiky a konzervanty [2]. Jestliže k výše uvedeným faktům přičteme ještě omezené spektrum antimikrobiálního účinku a nežádoucí vedlejší účinky některých klinicky používaných antibiotik, jeví se výzkum nových antimikrobiálních látek jako zcela nezbytný [3].

Jelikož výrazná antimikrobiální aktivita esenciálních olejů a komplexních extraktů získaných z některých tradičně využívaných léčivých rostlin již našla uplatnění při výrobě celé řady potravinářských přípravků, jako jsou např. konzervační prostředky, fytofarmaceutika a potravní doplňky, rozšiřuje se v poslední době zájem výzkumníků na nové, méně prozkoumané druhy [4].

Až 74 % z celkového počtu látek, používaných z důvodů jejich výrazných zdraví prospěšných a terapeutických účinků a získávaných komerčně z vyšších rostlin, bylo objeveno na základě etnobotanických informací, protože je tento přístup obecně považován jako nejefektivnější při hledání nových biologicky zajímavých látek [5].

Z několika stovek tisíců rostlinných druhů vyskytujících se na Zemi byl z hlediska obsahových látek a jejich biologické aktivity doposud prozkoumán pouze nepatrný podíl. Vezmeme-li v úvahu, že jediná rostlina může obsahovat i několik tisíc látek, jeví se možnosti objevu nových chemických struktur jako zcela evidentní [6]. Odhaduje se, že z celkového množství cca 155 000 semenných druhů rostlin vyskytujících se v tropech je asi 120 000 součástí flory tropických deštných lesů. Specifické klimatické a vegetační podmínky těchto oblastí, jakými jsou např. vysoká teplota, vlhkost a nepřerušované vegetační období, vedou k enormní diverzitě rostlinami produkovaných struktur

sekundárních metabolitů. Tyto látky nejsou pouze odpadními produkty metabolismu, ale především specializovanými adaptačními prostředky zapojenými do vzájemných vztahů organismů a prostředí, např. jako atraktanty opylovačů, signální látky, obranné látky proti predátorům a parazitům nebo nositelé odolnosti vůči škůdcům a chorobám. Pouze 5 – 15 % vyšších rostlin bylo doposud systematicky zkoumáno na přítomnost biologicky aktivních látek, a proto jsou druhy pocházející z tropických a subtropických oblastí perspektivním zdrojem nových vysoce účinných biologicky aktivních látek [7].

Z výše uvedených důvodů lze předpokládat, že systematický výzkum antimikrobiální aktivity léčivých rostlin z peruánské Amazonie, vybíraných na základě etnobotanické inventarizace, povede k objevení nových biologicky aktivních extraktů, esenciálních olejů a látek, které by mohly být následně využity při vývoji nových zemědělských a potravinářských výrobků určených pro zlepšení výživy a zdraví lidí.

2. Úvod

2.1. Antimikrobiální aktivita vyšších rostlin

Vyšší rostliny produkují stovky až tisíce různých chemických sloučenin s různou biologickou aktivitou. Tyto sloučeniny hrají většinou důležitou ekologickou roli. Může se jednat například o opylovací atraktanty, chemickou obranu proti hmyzu, býložravcům a mikroorganismům. Ve snaze přizpůsobit se měnícím se vnějším podmínkám syntetizují rostliny značné množství přírodních látek s antimikrobiálním účinkem. Mezi ně patří izoflavonoidy, indoly, fytosteroly, sesquiterpeny, alkaloidy, třísloviny, vitamíny a velký počet dalších fytochemických látek. U mnoha zástupců výše zmíněných skupin přírodních látek již byla prokázána aktivita proti rostlinným a lidským patogenním mikroorganismům [8].

2.2. Léčivé rostliny z peruánské Amazonie

Flóra peruánské Amazonie představuje obrovský rezervoár nových, dosud neobjevených látek s antimikrobiální aktivitou. V Peru se vyskytuje více než 17 tisíc rostlinných druhů, z nichž asi 30 % je endemických [9]. Navzdory bohaté tradici použití léčivých rostlin v peruánské lidové medicíně bylo doposud podrobeno detailnímu studiu chemického složení a biologické aktivity méně než 1 % z nich [10]. Přestože se celá řada těchto druhů využívá tradičně při léčbě rozličných infekčních onemocnění, zánětů a poranění, bylo doposud publikováno pouze několik studií zabývajících se stanovením jejich antibakteriální a antifugální aktivity [9, 11, 12, 13, 14].

2.3. Screeningové metody antimikrobiální aktivity

Biologicky aktivní látky jsou v hrubých extraktech obvykle přítomny ve velmi malých koncentracích. Testovací metoda proto musí být dostatečně citlivá, aby tyto látky byly detekovány. Testy antibakteriální aktivity mohou být rozděleny do tří skupin, a to difúzní, diluční a bioautografické metody. Pro screening rostlinných extraktů proti vybrané sérii mikroorganismů je nejvhodnější k určení minimálních inhibičních koncentrací (MIC)

bujónová mikrodiluční metoda na 96-jamkových mikrotitračních destičkách. Jedná se o metodu robustní, časově nenáročnou a finančně nenákladnou, s dobrou reprodukovatelností, asi 30krát citlivější než jiné metody používané v literatuře. Výhodou je také relativně malá spotřeba vzorku, použitelnost pro velká množství vzorků a možnost kvantitativních výsledků vhodných k porovnání nezávisle na čase. S každým testem se provádí jedna až dvě série jamek se známým antibiotikem k poskytnutí referenčních MIC hodnot pro testovaný mikroorganismus [15].

3. Experimentální část

3.1. *Materiál a metody*

3.1.1. Chemikálie

Chemikálie

Ethanol 96% pharm.

Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, CZ

Dimethyl sulfoxid, p.a.

Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, CZ

Tris- buffer saline pH 7,6

Sigma-Aldrich, Praha, CZ

Antibiotika

Ciprofloxacin

Sigma-Aldrich, Praha, CZ

Nystatin

Sigma-Aldrich, Praha, CZ

Kultivační média - bujóny

Mueller-Hinton (pH 7,4 ± 0,2)

Oxoid, Basingstoke, UK

Brain heart infusion (pH 7,4 ± 0,2)

Oxoid, Basingstoke, UK

Wilkins-Chalgren anaerob (pH 7,1 ± 0,2)

Oxoid, Basingstoke, UK

3.1.2. Rostlinný materiál

Testované rostlinné druhy (Tabulka 1) byly vybrány na základě etnobotanické inventarizace rostlin používaných mezi Indiány komunity Shipibo-Conibo v okrese Calleria (Peru). Rostlinný materiál byl nasbírán za pomoci místních léčitelů či zakoupen u herbalistů na trhu v Pucallpě. Kritériem pro výběr druhů bylo jejich užití v indikacích, které přítomnost antimikrobiálních vlastností naznačují (jako např. léčení ran a zánětů horních cest dýchacích, popř. použití ke konzervaci potravin). Po botanické autentizaci získaných rostlin (Ing. Polesný) byl materiál usušen a herbářové položky byly uloženy v herbáriu Fakulty lesnictví, National University of Ucayali, Pucallpa a v herbáriu Institutu tropů a subtropů České zemědělské univerzity v Praze.

Tabulka 1. Etnobotanická data testovaných peruánských léčivých rostlin

Druh (čeleď) a herbářová položka	Lidový název	Použitá část	Tradiční použití
<i>Abuta grandifolia</i> (Mart.) Sandwith (Menispermaceae) POL 0012	Abuta	Kůra	Anémie, revmatismus, horečky, zánět spojivek [16], tuberkulóza, malárie, jaterní problémy, žaludeční vředy [10], horečky [17], diabetes, diuretikum, záněty dělohy [11]
<i>Brunfelsia grandiflora</i> D. Don (Solanaceae) POL 0001	Chiri sanango	Kořen	Diuretikum, antipyretikum, revmatismus, syfilis, žlutá zimnice [10, 18, 19]
<i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze (Caesalpinaceae) POL 0002	Tara	Lusky	Záněty očí [20]
<i>Cordia alliodora</i> (Ruiz & Pav.) Oken (Boraginaceae) POL 0014	Ajosquiro	Kůra	Revmatismus, záněty, chřipka, malárie [21]
<i>Dipteryx micrantha</i> Harms (Leguminosae) POL 0013	Shihuahuaco	Kůra	Furunkulózy [22], popáleniny [21]
<i>Dracontium lorentense</i> K. Krause (Araceae) POL 0003	Sacha jergón	Oddenek	Uštknutí hadem [10], průjmy [18]
<i>Equisetum giganteum</i> L. (Equisetaceae) POL 0004	Cola de caballo	Nadzemní část	Průjmy, ošetření ran, adstringentní [10]

Tabulka 1. (Pokračování) Etnobotanická data testovaných peruánských léčivých rostlin

Druh (čeled') a herbářová položka	Lidový název	Použitá část	Tradiční použití
<i>Maytenus macrocarpa</i> Briq. (Celastraceae) POL 0005	Chuchuhuasi	Kůra kmene, kořene	Tonikum, revmatismus, záněty, afrodisiakum [10]
<i>Naucleopsis glabra</i> Spruce ex Pittier (Moraceae) POL 0015	Tamamuri	Kůra	Revmatismus, anémie, poruchy trávení, žaludeční vředy [21]
<i>Phyllanthus amarus</i> Schum. et Thonn. (Euphorbiaceae) POL 0007	Chanca piedra	Nadzemní část	Diuretikum, sedativum, adstringentní, tonikum, diabetes, onemocnění ledvin, záněty močových cest [10, 18]
<i>Piper aduncum</i> L. (Piperaceae) POL 0006	Matico	Nadzemní část	Antiseptikum, tonikum, průjmy, revmatismus, hemostatikum [10, 18]
<i>Pterocarpus rohrii</i> Vahl (Leguminosae) POL 0016	Palisangre	Kůra	Horečky [18], hojení ran [23]
<i>Terminalia catappa</i> L. (Combretaceae) POL 0008	Almendra	Listy	Onemocnění žlučníku, úplavice [18]
<i>Uncaria tomentosa</i> DC. (Rubiaceae) POL 0009	Uña de gato	Kůra	Záněty, diabetes, rakovina, virózy [10]

Příprava extraktu

Sušený rostlinný materiál byl rozemlet na prášek pomocí homogenizátoru (Restsch Grindomix, 5000 ot/min). Extrakty byly připraveny macerací 15 g materiálu v 450 ml 80% ethanolu při pokojové teplotě po dobu 5 dní. Následovala filtrace za sníženého tlaku (Sartorius) odpaření za vakua (Rotavapor R-200) při 40°C. Výtěžky jsou shrnuty v Tabulce 2.

Tabulka 2. Výtěžek odpařených ethanolových extraktů rostlin

Druh	Testovaná část	Výtěžek (g)	Výtěžek (%)
<i>Abuta grandifolia</i>	Kůra kmene	0,77	5,13
<i>Brunfelsia grandiflora</i>	Kořen	2,03	13,53
<i>Caesalpinia spinosa</i>	Lusky	7,30	48,67
<i>Cordia alliodora</i>	Kůra kmene	0,83	5,53
<i>Dipteryx micrantha</i>	Kůra kmene	1,19	7,93
<i>Dracontium lorentense</i>	Oddenek	1,18	7,87
<i>Equisetum giganteum</i>	Nadzemní část	1,10	7,33
<i>Maytenus macrocarpa</i>	Kůra kmene	1,79	11,93
<i>Maytenus macrocarpa</i>	Kůra kořene	1,67	11,13
<i>Naucleopsis glabra</i>	Kůra kmene	0,66	4,40
<i>Phyllanthus amarus</i>	Nadzemní část	1,97	13,13
<i>Piper aduncum</i>	Nadzemní část	0,91	6,07
<i>Pterocarpus rohrii</i>	Kůra kmene	1,88	12,53
<i>Terminalia catappa</i>	Listy	2,18	14,53
<i>Uncaria tomentosa</i>	Kůra kmene	1,00	6,67

Zásobní roztok extraktu

Navážených 0,16 mg hrubého extraktu bylo rozpuštěno v 0,5 ml DMSO a poté bylo přidáno 4,5 ml sterilního TBS o pH 7,6 k dosažení zásobního roztoku o koncentraci 32 mg/ml pro jednotlivé testování.

3.1.3. Mikroorganismy

Byly testovány následující kmeny: *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 a *Candida albicans* ATCC 10231. *S. pyogenes* byl kultivován a testován na brain-heart infusion bujónu, *B. fragilis* ve Wilkins-Chalgren anaerobním bujónu při

anaerobních podmínkách (Anaerobic Jar HP1). Pro ostatní mikroorganismy byl použit Mueller-Hinton bujón. Ciprofloxacin a Nystatin byly použity jako pozitivní kontroly citlivosti mikroorganismů (Tabulka 3, str. 16).

3.1.4. Testy antimikrobiální aktivity

In vitro antimikrobiální aktivita byla testována pomocí bujónové mikrodiluční metody [24] s použitím 96-jamkových mikrotitračních destiček. Extrakty byly testovány v jedenácti koncentracích, a to od 16 do 0,0156 mg/ml. Každá jamka byla zaočkována 5 μ l bakteriální suspenze o denzitě odpovídající 10^7 CFU/ml. Mikrotitrační destičky byly inkubovány 24 hodin (nebo 48 hodin pro kvasinku) při 37 °C. Růst mikroorganismů byl sledován turbidimetricky pomocí UV-VIS spektrofotometru Helios ϵ (Spectronic Unicam) při 600 nm. Minimální inhibiční koncentrace (MIC) byly vypočteny pomocí kontroly růstu a definovány jako nejnižší koncentrace zachycující 80% redukci nárůstu v porovnání s kontrolou nárůstu v jamce bez extraktu. Roztok DMSO (5% v/v) v TBS sloužil jako negativní kontrola. Všechny vzorky byly testovány ve třech opakováních.

4. Výsledky a diskuze

Úloha testovaných rostlin v tradiční medicíně obyvatel peruánské Amazonie byla zdokumentována několika autory [10, 17, 21, 25, 26]. Nejčastějším použitím zkoumaných rostlin je léčba kožních infekcí a zánětů (6 rostlin), průjmová onemocnění (5 rostlin) a revmatismus (5 rostlin). Základní formou přípravy je odvar, nálev a macerát, a proto byly z hlediska etnobotanického přístupu připraveny 80% ethanolové extrakty.

U sedmi (50 %) ze 14 testovaných rostlin doposud nebyla zkoumána antimikrobiální aktivita. Jak dokládá tato studie, bioaktivita byla nalezena u 93 % vybraných léčivých rostlin.

V Tabulce 3 jsou shrnuty minimální inhibiční koncentrace (MIC) pro testované extrakty. Patnáct ethanolových extraktů ze čtrnácti rostlinných druhů (patřících do 13 čeledí) bylo testováno na přítomnost antimikrobiálních látek proti sérii devíti bakterií (6 grampozitivních a 3 gramnegativní) a jedné kvasince.

S výjimkou extraktu kůry kmene *Maytenus macrocarpa*, byla u všech extraktů prokázána antibakteriální aktivita proti nejméně čtyřem kmenům bakterií (*Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis*) při koncentraci 16 mg/ml a méně. Extrakty ukázaly silnější účinek na grampozitivní bakterie (88 %) než na gramnegativní bakterie (53 %) a testovanou kvasinku (35 %).

Nejširší spektrum účinku bylo zachyceno u druhů *Abuta grandifolia*, *Maytenus macrocarpa*, *Naucleopsis glabra* a *Pterocarpus rohrii*, jež inhibovaly všechny testované mikroorganismy v koncentračním rozmezí od 0,0625 do 16 mg/ml.

U extraktu z kůry kořene *Maytenus macrocarpa* byl zjištěn nejužší rozsah hodnot MIC proti všem testovaným kmenům, a to od 0,125 mg/ml (*B. cereus*, *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* a *E. coli*) do 0,25 mg/ml (*E. faecalis*, *S. Aureus*, *P. aeruginosa* a *C. albicans*). Stejně hodnoty byly nalezeny bez ohledu na druh bakterie a specifikace pro grampozitivní, gramnegativní skupinu bakterií či kvasinku.

Tabulka 3. Minimální inhibiční koncentrace (mg/ml) ethanolových extraktů peruánských léčivých rostlin (bujónová mikrodiluční metoda)

Druh	Použitá část	Mikroorganismus									
		G+ bakterie						G- bakterie			Kvasinka
		<i>B.c.</i>	<i>B.s.</i>	<i>E.f.</i>	<i>S.a.</i>	<i>S.e.</i>	<i>S.p.</i>	<i>B.f.</i>	<i>E.c.</i>	<i>P.a.</i>	<i>C.a.</i>
<i>Abuta grandifolia</i>	Kůra kmene	0,25	0,5	0,25	0,5	0,25	1	2	2	2	8
<i>Brunfelsia grandiflora</i>	Kořen	4	16	8	4	4	NA	16	NA	16	NA
<i>Caesalpinia spinosa</i>	Lusky	8	16	0,5	16	16	NA	16	NA	NA	NA
<i>Cordia alliodora</i>	Kůra kmene	1	2	1	2	0,5	NA	NA	1	1	2
<i>Dipteryx micrantha</i>	Kůra kmene	2	1	0,5	4	1	8	2	NA	NA	NA
<i>Dracontium lorentense</i>	Oddenek	8	NA	8	8	16	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Equisetum giganteum</i>	Nadzemní část	8	16	8	8	16	4	8	NA	NA	NA
<i>Maytenus macrocarpa</i>	Kůra kmene	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Maytenus macrocarpa</i>	Kůra kořene	0,125	0,125	0,25	0,25	0,125	0,125	0,25	0,125	0,25	0,25

Tabulka 3. (pokračování) MIC (mg/ml) ethanolových extraktů peruánských léčivých rostlin (bujónová mikrodiluční metoda)

Druh	Použitá část	Mikroorganismus									
		G+ bakterie						G- bakterie			Kvasinka
		<i>B.c.</i>	<i>B.s.</i>	<i>E.f.</i>	<i>S.a.</i>	<i>S.e.</i>	<i>S.p.</i>	<i>B.f.</i>	<i>E.c.</i>	<i>P.a.</i>	<i>C.a.</i>
<i>Naucleopsis glabra</i>	Kůra kmene	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,0625	4	4	4	4
<i>Phyllanthus amarus</i>	Nadzemní část	16	1	0,25	4	1	4	4	16	8	NA
<i>Piper aduncum</i>	Nadzemní část	1	1	2	1	2	2	NA	NA	NA	NA
<i>Pterocarpus rohrii</i>	Kůra kmene	0,25	0,25	0,5	4	0,25	4	16	4	8	16
<i>Terminalia catappa</i>	Listy	2	4	8	1	0,25	16	16	8	4	NA
<i>Uncaria tomentosa</i>	Kůra kmene	1	1	0,25	1	1	NA	NA	8	NA	NA
Ciprofloxacin/nystatin	µg/ml	1	4	1	1	1	0,5	2	1	1	4
<p>NA = neaktivní (MIC > 16 mg/ml), G+ (grampozitivní), G- (gramnegativní) bakterie <i>B.c.</i>, <i>Bacillus cereus</i>; <i>B.s.</i>, <i>Bacillus subtilis</i>; <i>B.f.</i>, <i>Bacteroides fragilis</i>; <i>E.f.</i>, <i>Enterococcus faecalis</i>; <i>E.c.</i>, <i>Escherichia coli</i>; <i>P.a.</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>; <i>S.a.</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>; <i>S.e.</i>, <i>Staphylococcus epidermidis</i>; <i>S.p.</i>, <i>Streptococcus pyogenes</i>; <i>C.a.</i>, <i>Candida albicans</i>.</p>											

Maytenus macrocarpa představuje nejzajímavější testovanou rostlinu. Zatímco extrakt z kůry kořene byl v této studii nejúčinnějším, extrakt kůry kmene nevykazoval žádnou inhibici, což poukazuje na selektivní akumulaci antimikrobiálních látek v podzemních částech rostliny. Vzhledem k získaným výsledkům se jeví kůra kořene jako slibný zdroj látek se širokým spektrem účinku, jelikož extrakt inhiboval všechny testované kmeny (v úzkém rozmezí 0,125 až 0,25 mg/ml) včetně *P. aeruginosa*, jež v klinické praxi vykazuje formy s vysokou rezistencí proti četným antibiotikům [27]. Široké spektrum účinku také vysvětluje rozšířené použití této rostliny v peruánské lidové medicíně, a to zejména při léčbě průjemových onemocnění a infekcí dýchacího ústrojí [28]. Antimikrobiální aktivita *M. macrocarpa* nebyla dosud publikována, nicméně zástupci rodu *Maytenus* již studováni byli. V jejich kořeni byly identifikovány triterpenoidy, které inhibovaly grampozitivní bakterie a *C. albicans* [29]. Proto se lze domnívat, že za silný mikrobiální účinek *M. macrocarpa* mohou podobné sloučeniny z této kategorie či přítomnost tříslovin, které byly v této rostlině dříve identifikovány [28].

Abuta grandifolia byla dříve testována *in vitro* (extrakt z listů a kůry) a byla zjištěna inhibice *Bacillus subtilis* [11] a *Pseudomonas aeruginosa* [30], což je v souladu s našimi výsledky, kde extrakt z kůry také působil proti růstu těchto bakterií (*B. subtilis* MIC 0,5 mg/ml and *P. aeruginosa* MIC of 2 mg/ml). Fytochemické studie potvrdily přítomnost isochinolinových alkaloidů berberinu a palmatinu [25], jejichž silná antimikrobiální aktivita je známa [31], a proto se dá spojovat i s účinkem této rostliny.

Nejnižší MIC byla sledována u extraktu z *Naucleopsis glabra*, který inhiboval *S. pyogenes* při koncentraci 0,0625 mg/ml. *N. glabra* byla účinnější na grampozitivní bakterie (MIC: 0,0625 mg/ml proti *S. pyogenes* a 0,125 mg/ml u *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. faecalis* a *S. epidermidis*), zatímco pro gramnegativní bakterie a kvasinku byla MIC 4 mg/ml. U *Naucleopsis glabra* nebyla doposud v literatuře popsána žádná studovaná biologická aktivita a až na přítomnost steroidních glykosidů není mnoho popsáno ani o chemickém složení [32]. Zástupci rodu *Naucleopsis* jsou známí obsahem pyranokumarinu seselinu v latexu a kůře kmene [33], který má výrazný antimikrobiální účinek [34].

Pterocarpus rohrii působil především na grampozitivní bakterie (*B. cereus*, *B. subtilis* a *S. epidermidis* při koncentraci 0,25 mg/ml a také *E. faecalis* 0,5 mg/ml), zatímco u gram-

negativních bakterií a kvasinky, s MIC v rozmezí 4 až 16 mg/ml, byl účinek slabší. O této rostlině není doposud mnoho známo, nicméně zástupce stejného rodu, *P. indicus* byl testován a ukázal široké spektrum účinku proti bakteriím i prvokům [35]. Ovšem proti *C. albicans* byl *P. indicus* aktivní [36], zatímco naše studie ukazuje pouze slabou inhibici kvasinky. Lze tudíž předpokládat, že námi testovaný druh obsahuje nižší procento antifungálních látek než *P. indicus*. Ve stejné studii byl extrakt z listů mírně účinný proti *P. aeruginosa* a *E. coli*, stejně tak jako v této studii (MIC 4 mg/ml u *E. coli* a 8 mg/ml u *P. aeruginosa*).

Dva extrakty (*Terminalia catappa* a *Phyllanthus amarus*) inhibovaly všechny testované bakterie, ale na kvasinku neúčinkovaly. Výrazná aktivita byla zachycena také u druhu *Uncaria tomentosa*, kde extrakt působil proti šesti bakteriálním kmenům, přičemž pro pět z nich se pohybovalo v rozmezí MIC 0,25 až 1 mg/ml. Ostatní extrakty ukázaly pouze slabý antimikrobiální účinek na testované mikroorganismy. Publikované výsledky analýz *Phyllanthus amarus* z Indie působení hrubého extraktu na růst *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella paratyphi* a *Staphylococcus aureus* [37]. Mezi látky izolované z *Phyllanthus amarus* patří corilagin, geraniin a kyselina gallová [38], u nichž byla publikována *in vitro* aktivita proti *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* [39]. U methanolových a methylenchloridových extraktů z nadzemní části *Terminalia catappa* byl prokázán antifungální účinek, ovšem extrakty byly neaktivní v testech antibakteriálních [40]. Pawar a Pal [41] zjistili výraznou inhibici *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* u chloroformového a methanolového extraktu z kořene, což naše výsledky potvrdily. *Terminalia catappa* obsahuje v listech třísloviny a flavonoidní glykosidy [42, 43], z nichž v literatuře [39, 44] byly popsány látky s antimikrobiálním potenciálem.

Uncaria tomentosa má široké spektrum biologických aktivit od protizánětlivých po antivirální [45]. Antibakteriální aktivita byla zkoumána u mnoha kmenů, [46]. Izolovaný oxindolový alkaloid isopteropodin inhiboval grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis*, s MIC 150 µg/ml, resp. 250 µg/ml [47]. Tato skutečnost podtrhuje selektivní inhibici ethanolového extraktu použitého v této studii. Z dalších látek byly nalezeny triterpeny s prokazatelným antimikrobiálním účinkem [48].

Antimikrobiální vlastnosti *Piper aduncum* byly zdokumentovány v literatuře [49, 50]. Kyselina benzoová a její deriváty, hydrochalkony a chromeny z listů byly aktivní proti široké škále mikroorganismů, včetně *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Cryptococcus neoformans*, *Mycobacteria intracellulare*, *Micrococcus luteus* a *Pseudomonas aeruginosa* [51, 52, 53]. Chemické složení esenciálního oleje a jeho antibakteriální účinky byly také popsány [54, 55].

Průměrný inhibiční účinek, převážně vůči grampozitivním bakteriím, byl pozorován u *Dipteryx micrantha*, což odpovídá jeho častému použití při léčení kožních infekcí. Data popisující antimikrobiální vlastnosti této rostliny nebyla publikována. Pouze protikandidózní účinek kumarinu a retusinu, jakožto látek izolovaných z kůry, byly dříve zmíněny v literatuře [56]. Z antimikrobiálních látek přítomných v *D. micrantha* lze zmínit kyselinu salicylovou a triterpen lupeol [57, 58].

Výsledky screeningu indikují širokospektrou aktivitu u *Cordia alliodora*. Ethanolový extrakt inhibuje stejnou měrou jak grampozitivní, tak gramnegativní bakterie i kvasinky. Antifungální účinek byl popsán u dichlormetanového extraktu kůry kořene, který inhiboval fytopatogenní houbu *Cladosporium cucumerinum* a kvasinku *Candida albicans* [59]. Fenylypropanoidy z kůry kořene byly nalezeny jako látky zodpovědné za antifungální vlastnosti [60].

Extrakty z *Brunfelsia grandiflora*, *Caesalpinia spinosa*, *Dracontium lorentense* a *Equisetum giganteum* ukázaly pouze slabou inhibici, a to převážně u grampozitivních kmenů bakterií. Účinek *B. grandiflora* lze přisuzovat skopoletinu, psychoaktivnímu furokumarinu, který má protizánětlivé a antimikrobiální účinky [61]. Např. skopoletin izolovaný z *Foeniculum vulgare* byl aktivní proti několika kmenům bakterií [62]. Z dalších látek se známou antimikrobiální aktivitou a izolovaných z rostlin rodu *Brunfelsia* lze jmenovat farnesol a geraniol [63, 64]. Lusky *C. spinosa* obsahují až 25 % kyseliny gallové [65], jež byla popsána pro *in vitro* antimikrobiální účinek proti *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* [66, 67]. Vodný extrakt *Equisetum giganteum* neprokázal žádný signifikantní účinek při koncentraci 62,5 µg/ml v agarovém difúzním testu proti *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* [68, 69]. U *D. lorentense* nebyly podobné studie aktivity a chemického složení zatím publikovány.

Nejcitlivějším mikroorganismem v této studii byl *Enterococcus faecalis*, jenž byl inhibován všemi testovanými druhy, a to s MIC v rozmezí od 0,125 do 8 mg/ml. Nejnížší MIC (0,0625 mg/ml) byla nalezena pro extrakt z kůry kmene *N. glabra*.

5. Závěr

Screening antimikrobiální aktivity čtrnácti léčivých rostlin z Peru, vybraných na základě jejich adekvátního použití v tradičním lidovém léčení, poskytl extrakty se silným inhibičním účinkem na vybranou skupinu deseti patogenních mikroorganismů (zástupci grampozitivních, gramnegativních bakterií a kvasinek).

U sedmi rostlin, jmenovitě *Brunfelsia grandiflora*, *Caesalpinia spinosa*, *Dipteryx micrantha*, *Dracontium lorentense*, *Maytenus macrocarpa*, *Naucleopsis glabra* a *Pterocarpus rohrii* nebyla doposud tato aktivita studována.

Ethanolové extrakty *Abuta grandifolia*, *Maytenus macrocarpa*, *Naucleopsis glabra* a *Pterocarpus rohrii* ukázaly nejsilnější inhibiční účinky podporující jejich potenciální použití v potravinářském či farmaceutickém průmyslu při vývoji nových přírodních potravinových doplňků, funkčních potravin, potravinových aditiv a farmaceutických přípravků.

Předpokládáme, že některé dříve izolované a popsané látky mohou být přítomné v těchto rostlinách a zodpovědné za jejich antimikrobiální aktivitu. Nicméně, následně bude třeba provést detailnější fytochemické studie k určení látek zodpovědných za tuto aktivitu.

6. Literatura

- [1] Cowan M.M.: Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* **12**, 564-582 (1999)
- [2] Kalembe D., Kunicka A.: Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry* **10**, 813-829 (2003)
- [3] Greenwood D., Slack R.C.B., Peutherer J.F.: *Lékařská mikrobiologie*. 1. české vyd. Přel. J. Schindler. Grada Publishing, Praha, 690 s. (1999)
- [4] Tepe B., Sokmen M., Sokmen A., Daferera D., Polissiou M.: Antimicrobial and antioxidative activity of the essential oil and various extracts of *Cyclotrichium origanifolium* (Labill.) Manden. & Scheng. *Journal of Food Engineering* **69**:3, 335-342 (2005)
- [5] Farnsworth N.R.: The role of ethnopharmacology in drug development. V: Chadwick D.J. a Marsh J. (Ed.) *Bioactive compounds from plants*. John Wiley, Chichester, s. 2-21 (1990)
- [6] Hostettmann K., Marston A., Wolfender J.L.: Strategy in the search for new biologically active plant constituents. V: Hostettmann K., Marston A., Maillard M., Hamburger M. (Ed.) *Phytochemistry of plants used in traditional medicine*. Clarendon Press, Oxford, s. 17-45 (1995)
- [7] Pieters L., Vlietinck A.J.: Bioguided isolation of pharmacologically active plant components, still a valuable strategy for the finding of new lead compounds? *Journal of Ethnopharmacology* **100**:1-2, 57-60 (2005)
- [8] Hamburger M., Hostettmann K.: Bioactivity in plants - the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* **30**:12, 3864-3874 (1991)
- [9] Rojas R., Bustamante B., Bauer J., Fernandez I., Alban J., Lock O.: Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* **88**:2-3, 199-204 (2003)
- [10] Desmarchelier, C., Schaus, F.W.: *Sixty medicinal plants from the Peruvian Amazon*. Soukromý náklad, Lima, Peru, 270 s. (2000)
- [11] Jovel E.M., Cabanillas J., Towers G.H.N.: An ethnobotanical study of the traditional medicine of the Mestizo people of Suni Mirano, Loreto, Peru. *Journal of Ethnopharmacology* **53**:3, 149-156 (1996)
- [12] Desmarchelier C., Repetto M., Coussio J., Llesuy S., Ciccía G.: Total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of medicinal plants used in southwest Amazonia (Bolivia and Peru). *International Journal of Pharmacognosy* **35**:4, 288-296 (1997)
- [13] Pierre-Canel L., Neto C., Hammond G.: Evaluation and identification of anticancer and antioxidant agents from Peruvian medicinal plants. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **219**:1, 302 (2000)

- [14] Neto C.C., Owens C.W., Langfield R.D., Comeau A.B., Onge J.S., Vaisberg A.J. et al.: Antibacterial activity of some Peruvian medicinal plants from the Callejon de Huaylas. *Journal of Ethnopharmacology* **79:1**, 133-138 (2002)
- [15] Eloff J.N.: A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica* **64:8**, 711-713 (1998)
- [16] Lossio, L.C., Delgado, H.S., Ruiz, A.G., Donayre, R.A., Ruiz, J.G., Panduro, M.P., Sifuentes, T.C.: *Plantas medicinales de la Amazonia Peruana*. Instituto Peruano de Seguridad Social, Instituto de Medicina Tradicional, Iquitos, Peru, 255 s. (1995)
- [17] Estrella, E.: *Plantas medicinales amazonicas: realidad y perspectivas*. Tratado de Cooperacion Amazonica, Lima, Peru, 302 s. (1995)
- [18] Schultes, R.E., Raffauf, R.F.: *The Healing Forest*. Dioscorides press, Portland, USA, 500 s. (1990)
- [19] Plowman T.: *Brunfelsia* in ethnomedicine. *Botanical museum leaflets* **25**, 289-320 (1977)
- [20] Duke J.A., Reed C.F.: *Caesalpinia spinosa* (Mol.) Ktz. V: J.A. Duke (Ed.), *Handbook of Legumes of World Economic Importance*, Plenum Press, New York, USA, s. 32-33 (1981)
- [21] Arevalo, G.V.: *Las plantas medicinales y su beneficio en la salud: Shipibo-Conibo*. AIDSESEP, Lima, Peru, 353 s. (1994)
- [22] Bourdy G., Dewalt S.J., de Michel L.R.C., Roca A., Deharo E., Munoz V.: Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group. *Journal of Ethnopharmacology* **70:2**, 87-109 (2000)
- [23] Reynel C., Pennington T.D., Pennington R.T., Flores C., Daza A.: *Árboles útiles de la Amazonia peruana y sus usos*. Lima, Peru, 250 s. (2003)
- [24] Jorgensen, J.H., Turnidge, J.D., Washington, J.A.: Antibacterial susceptibility tests: Dilution and disk diffusion methods. In: Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., Tenover, R.H. (Ed.) *Manual of clinical microbiology*. Washington, D.C., USA: ASM Press. s. 1526-1543 (1999)
- [25] Duke, J.A., Vásquez, M.R.: *Amazonian ethnobotanical dictionary*. CRC Press, Boca Raon, Florida, USA, 215 s. (1994)
- [26] Schultes R.E.: Ethnobotany, Biological Diversity, and the Amazonian Indians. *Environmental Conservation* **19:2**, 97-100 (1992)
- [27] Poole K.: Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Current Opinion in Microbiology* **4:5**, 500-508 (2001)

- [28] Taylor, L.: The Healing Power of Rain Forest. Square One Publishers, New York, USA, 535 s. (2005)
- [29] de Leon L., Beltran B., Moujir L.: Antimicrobial activity of 6-oxophenolic triterpenoids. Mode of action against *Bacillus subtilis*. *Planta Medica* **71**:4, 313-319 (2005)
- [30] Mongelli E., Desmarchelier C., Coussio J., Ciccía G.: Actividad antimicrobiana e interaccion con el ADN de plantas medicinales de la Amazonia Peruana. *Revista Argentina de microbiología* **27**:4, 199-203 (1995)
- [31] Iwasa K., Nanba H., Lee D.U., Kang S.I.: Structure-activity relationships of protoberberines having antimicrobial activity. *Planta Medica* **64**:8, 748-751 (1998)
- [32] Shrestha T., Kopp B., Bisset N.G.: The Moraceae-based dart poisons of South America. Cardiac glycosides of *Maquira* and *Naucleopsis* species. *Journal of Ethnopharmacology* **37**:2, 129-143 (1992)
- [33] Alvarenga M., Braz-Filho R., Gottlieb O.R.: Seselin from *Naucleopsis caloneura*. *Phytochemistry* **11**:4 1184-1185 (1972)
- [34] Tsai W.J., Chen Y.C., Wu M.H.: Seselin from *Plumbago zeylanica* inhibits phytohemagglutinin (PHA)-stimulated cell proliferation in human peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Ethnopharmacology* **119**:1, 67-73 (2008)
- [35] Khan M.R., Omoloso A.D.: Antibacterial activity of *Pterocarpus indicus*. *Fitoterapia* **74**:6, 603-605 (2003)
- [36] Ragasa C.Y., De Luna R.D., Hofilena J.G.: Antimicrobial terpenoids from *Pterocarpus indicus*. *Natural Product Research* **19**:4, 305-309 (2005)
- [37] Srinivasan D., Nathan S., Suresh T., Perumalsamy P.L.: Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Journal of Ethnopharmacology* **74**:1, 217-220 (2001)
- [38] Foo L.Y.: Amariin, a di-dehydrohexahydroxydiphenoyl hydrolyzable tannin from *Phyllanthus amarus*. *Phytochemistry* **33**:2, 487-491 (1993)
- [39] Adesina S.K., Idowu O., Ogundaini A.O., Oladimeji H., Olugbade T.A., Onawunmi G.O.: Antimicrobial constituents of the leaves of *Acalypha wilkesiana* and *Acalypha hispida*. *Phytotherapy Research* **14**:5, 371-374 (2000)
- [40] Goun E., Cunningham G., Chu D., Nguyen C., Miles D.: Antibacterial and antifungal activity of Indonesian ethnomedical plants. *Fitoterapia* **74**:6, 592-596 (2003)
- [41] Pawar S.P., Pal S.C.: Antimicrobial activity of extracts of *Terminalia catappa* root. *Indian Journal of Medical Sciences* **56**:6, 276-278 (2002)

- [42] Lin T.C., Hsu F.L.: Tannin and related compounds from *Terminalia catappa* and *Terminalia parviflora*. Journal of the Chinese Chemical Society **46**:4, 613-618 (1999)
- [43] Lin Y.L., Kuo Y.H., Shiao M.S., Chen C.C., Ou J.C.: Flavonoid glycosides from *Terminalia catappa* L. Journal of the Chinese Chemical Society **47**:1, 253-256 (2000)
- [44] Basile A., Giordano S., Lopez-Saez J.A., Cobianchi R.C.: Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. Phytochemistry **52**:8, 1479-1482 (1999)
- [45] Heitzman M.E., Neto C.C., Winiarz E., Vaisberg A.J., Hammond G.B.: Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). Phytochemistry **66**:1, 5-29 (2005)
- [46] Maria A.S., Lopez A., Diaz M.M., Alban J., deMera A.G., Orellana J.A.V.: Evaluation of the toxicity of *Uncaria tomentosa* by bioassays *in vitro*. Journal of Ethnopharmacology **57**:3, 183-187 (1997)
- [47] Garcia R., Cayunao C., Bocic R., Backhouse N., Delporte C., Zaldivar M. et al.: Antimicrobial activity of isopteropodine. Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences **60**:5-6, 385-388 (2005)
- [48] Akbar E. and Malik A.: Antimicrobial triterpenes from *Debregeasia salicifolia*. Natural Product Letters **16**, 339-344 (2002)
- [49] Lentz D.L., Clark A.M., Hufford C.D., Meurer-Grimes B., Passreiter C.M., Cordero J.: Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology **63**:3, 253-263 (1998)
- [50] Lemos G.C.S., Oliveira L.O., Eberli B.B., Motta O.V. and Folly M.M.: Bactericidal activity of macela (*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.) and jaborandi-falso (*Piper aduncum* L.) against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis, Revista Brasileira de Plantas Mediciniais **3**, 67-72 (2000)
- [51] Nair M.G., Burke B.A.: Antimicrobial *Piper* metabolite and related compounds, Journal of Agricultural and Food Chemistry **38**, 1093-1096 (1999)
- [52] Orjala J., Wright A.D., Behrends H., Folkers G., Sticher O., Ruegger H.: Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from *Piper Aduncum*. Journal of Natural Products **57**:1, 18-26 (1994)
- [53] Orjala J., Erdelmeier C.A.J., Wright A.D., Rali T., Sticher O.: 5 new prenylated p-hydroxybenzoic acid-derivatives with antimicrobial and molluscicidal activity from *Piper aduncum* leaves. Planta Medica **59**:6, 546-551 (1993)
- [54] Tirillini B., Velasquez E.R., Pellegrino R.: Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Piper angustifolium*. Planta Medica **62**:4, 372-373 (1996)

- [55] Maia J.G.S., Zohhbi M.G.B., Andrade E.H.A., Santos A.S., da Silva M.H.L., Luz A.I.R., Bastos C.N.: Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the Amazon region. *Flavour and Fragrance Journal* **13**:4, 269-272 (1998)
- [56] Citoglu G.S., Sever B., Antus S., Baitz-Gacs E., Altanlar N.: Antifungal flavonoids from *Ballota glandulosissima*. *Pharmaceutical Biology* **41**:7, 483-486 (2003)
- [57] Corthout J., Pieters L., Claeys M., Geerts S., Vandenberghe D., Vlietinck A.: Antibacterial and molluscicidal phenolic acids from *Spondias mombin*. *Planta Medica* **60**:5, 460-463 (1994)
- [58] Ajaiveoba E.O., Onocha P.A., Nwozo S.O., Sama W.: Antimicrobial and cytotoxicity evaluation of *Buchholzia coriacea* stem bark. *Fitoterapia* **74**:7-8, 706-709 (2003)
- [59] Rahalison L., Hamburger M., Hostettmann K., Monod M., Frenk E.: A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemical Analysis* **2**:5, 199-203 (1991)
- [60] Ioset J.R., Marston A., Gupta M.P., Hostettmann K.: Antifungal and larvicidal compounds from the root bark of *Cordia alliodora*. *Journal of Natural Products* **63**:3, 424-426 (2000)
- [61] Iyer R.P., Brown J.K., Chaubal M.G., Malone M.H.: *Brunfelsia hopeana* I: Hippocratic screening and antiinflammatory evaluation. *Lloydia* **40**:4, 356-360 (1977)
- [62] Kwon Y.S., Choi W.G., Kim W.J., Kim W.K., Kim M.J., Kang W.H. et al.: Antimicrobial constituents of *Foeniculum vulgare*. *Archives of Pharmacy Research* **25**:2, 154-157 (2002)
- [63] Muroi H., Kubo I.: Combination effects of antibacterial compounds in green tea flavor against *Streptococcus mutans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**:7, 1102-1105 (1993)
- [64] Ramage G., Saville S.P., Wickes B.L., Lopez-Ribot J.L.: Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:11, 5459-5463 (2002)
- [65] Galvez J.M., Riedl B., Conner A.H.: Analytical studies on tara tannins. *Holzforschung* **51**:3, 235-243 (1997)
- [66] Panizzi L., Caponi C., Catalano S., Cioni P.L., Morelli I.: *In vitro* antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. *Journal of Ethnopharmacology* **79**:2, 165-168 (2002)
- [67] Anesini C., Perez C.: Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* **39**:2, 119-128 (1993)
- [68] Portillo A., Vila R., Freixa B., Adzet T., Caniguer S.: Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* **76**:1, 93-98 (2001)

7. Přílohy

Klouček P., Polesný Z., **Svobodová B.**, Vlková E., Kokoška L.: Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callería District. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 99: 309-312.

Klouček P., **Svobodová B.**, Polesný Z., Langrová I., Smrček S., Kokoška L.: Antimicrobial activity of some medicinal barks used in Peruvian Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, 2007, 111:427-429.