

TRABAJOS ORIGINALES ORIGINALS WORKS

Actividad antimicrobiana de *centaurea solstitialis* y *centaurea calcitrapa*

Antimicrobial activity of centaurea solstitialis and centaurea calcitrapa

TORIBIO MS¹, ORIANI DS², SKLIAR MI^{3*}

¹Cátedra de Farmacología, ²Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de la Pampa, c/5 y 116, (6360) General Pico (La Pampa), Argentina. ³Cátedra de Farmacognosia, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, San Juan 670, (8000) Bahía Blanca, Argentina.

*Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: mskliar@uns.edu.ar

RESUMEN

Centaurea solstitialis y *Centaurea calcitrapa* (Asteraceae), son plantas conocidas vulgarmente como Abrepuño amarillo y Abrepuño colorado respectivamente. Son malezas que se desarrollan en la región pampeana, siendo la primera de ellas la más abundante. Investigaciones realizadas en otros países han demostrado que el género *Centaurea* posee propiedades antimicrobianas. El objetivo de este trabajo fue comprobar si esta actividad biológica se encuentra presente en las malezas que crecen en la provincia de La Pampa (Argentina). Se evaluó la Concentración Inhibitoria Mínima y la Concentración Bactericida Mínima mediante el método de dilución en caldo de extractos metanólicos de capítulos secos de ambas especies. Los resultados obtenidos demuestran que *Centaurea calcitrapa*, bajo nuestras condiciones de trabajo, presenta actividad antimicrobiana en cuatro de las diez cepas ensayadas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Salmonella typhimurium*), mientras que *Centaurea solstitialis* muestra menor actividad antibacteriana inhibiendo sólo a dos cepas (*Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*).

PALABRAS CLAVE: *Centaurea solstitialis*. *Centaurea Calcitrapa*. Actividad antimicrobiana. Extractos metanólicos. CIM. CBM. Abrepuño.

ABSTRACT

Centaurea solstitialis and Centaurea calcitrapa (Asteraceae), commonly known as Abrepuño amarillo and Abrepuño colorado respectively, are weeds that grow in the Province of Pampea Argentina, the former of which being the most abundantly encountered species. Research carried out in other countries has demonstrated that the genus Centaurea possesses antimicrobial properties. The objective of this work was to ascertain the extent to which such a biological activity may be present in these species, found growing in this particular Argentinian Province. Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Bactericide Concentration was evaluated by means of the dilution method, in broth of methanolic extracts of dry heads of both species. The results obtained, under the working conditions of this study, demonstrated that Centaurea calcitrapa, presents antimicrobial activity against four of the ten assayed strains: Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae and Salmonella typhimurium, while Centaurea solstitialis shows antibacterial activity to a lesser extent, with inhibitory activity only being found against two strains: Streptococcus agalactiae and Staphylococcus aureus.

KEY WORDS: *Centaurea solstitialis*. *Centaurea calcitrapa*. Antimicrobial activity. Methanolic extracts. MIC. MBC. Abrepuño.

INTRODUCCIÓN

El género *Centaurea* presenta aproximadamente 700 especies. Entre ellas se encuentran *Centaurea solstitialis* (Cs) y *Centaurea calci-*

INTRODUCTION

There are approximately 700 species of the *Centaurea* genus. In the region of Pampea in Argentina, *Centaurea solstitialis* (Cs) and

trapa (Cc) (Asteraceae), conocidas vulgarmente como Abrepuño amarillo y Abrepuño colorado respectivamente. Ambas son malezas que se desarrollan en la región pampeana, siendo la primera de ellas la más abundante.

Estas especies representan un importante aporte a la etnofarmacología, siendo reconocida Cc por su efecto febrífugo y diurético¹ y Cs por su actividad antiulcerogénica². Ésta última, además, ha sido informada por su actividad febrífuga³ y antidiabética⁴. En los últimos años se han incrementado los estudios para evaluar la actividad antimicrobiana de las plantas, debido a que, en determinadas comunidades, han demostrado ser eficaces cuando la quimioterapia convencional falla⁵.

Se han aislado numerosos compuestos químicos del género *Centaurea* y en particular Cc y Cs presentan importantes cantidades de flavonoides^{6,7} y lactonas sesquiterpénicas^{8,9}. Cc presenta actividad hipoglucémica y antibiótica contra *Brucella abortus*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*¹⁰. Mientras que Cs ha demostrado ser activa contra *Helicobacter pylori*¹¹.

No existen trabajos de referencia que evalúen la actividad antimicrobiana en las malezas que crecen en la Provincia de La Pampa. Esta investigación tuvo como objetivo comprobar si la citada actividad biológica se encuentra presente en ambas especies vegetales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

Los capítulos de Cc y Cs fueron recolectados en el mes de enero en la zona rural de Trenel, Departamento Trenel, Provincia de La Pampa, Argentina. Los ejemplares fueron identificados por el profesor P. E. Steibel (Facultad de Agronomía - Universidad Nacional de La Pampa, Santa Rosa) y depositados en el Herbario bajo el siguiente registro: 18-I-2000, M. Toribio 4 para Cc y R. Toso 1, SRFA para Cs. Los capítulos fueron secados a temperatura ambiente.

Centaurea calcitrapa (Cc) (Asteraceae), are commonly known as Abrepuño amarillo and Abrepuño colorado respectively, with the former being the most abundantly found species.

These species have an important contribution to make to ethnopharmacological resources, given that Cc is widely recognised for its febrifuge and diuretic¹ effects and Cs for its antiulcerogenic activity². The latter has also been described as presenting febrifugal³ and antidiabetic⁴ activity. Throughout recent years an increasing number of studies have been carried out to evaluate the antimicrobial activity of plants, due to the fact that in certain communities, plant remedies have been demonstrated to be effective, when conventional chemotherapy fails⁵.

Numerous chemical compounds of *Centaurea* genus have been isolated and in particular Cc and Cs present great quantities of flavonoids^{6,7} and sesquiterpenic lactones^{8,9}. Cc presents hypoglycemic and antibiotic activities against *Brucella abortus*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*¹⁰, while Cs has been demonstrated to be active against *Helicobacter pylori*¹¹.

However, no work has been carried out to evaluate the antimicrobial activity of these species of weeds growing in La Pampa Province. The objective of this research was to determine the extent of the possible biological activity present in the weeds growing in this particular area.

MATERIAL AND METHODS

Vegetable material

The heads of Cc and Cs were harvested in January in the rural area of Trenel in the Province of La Pampa. The samples were identified by professor P.E. Steibel (Faculty of Agronomy, - Universidad Nacional de La Pampa, Santa Rosa) and deposited in the Herbarium under the registration: 18-I-2000, M. Toribio 4 for Cc and R. Toso 1, SRFA for Cs. The heads of the plants were subsequently dried to room temperature.

Preparación de extractos

a) Extractos acuosos

A 10 g de capítulos secos de Cs se le agregaron 200 ml de agua destilada en ebullición durante 20 minutos (2x). La solución obtenida se filtró por gasa y se llevó a sequedad con rotavapor a presión reducida (rendimiento 22,8 %). Igual procedimiento se llevó a cabo con 10 g de capítulos secos de Cc, obteniéndose un rendimiento de 20,9 %.

b) Extractos metanólicos

Los extractos acuosos secos se retomaron con 30 ml de metanol (3x), se filtraron por papel de filtro y se llevaron a sequedad con rotavapor a presión reducida (rendimiento de Cc 10,2 % y de Cs 12,22 %). Los extractos metanólicos secos fueron resuspendidos con 5 ml de agua destilada estéril.

Microorganismos utilizados

Para la determinación de la actividad antimicrobiana fueron utilizadas las siguientes cepas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus intermedius* (CIDEF)*, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Streptococcus agalactiae* (CIDEF), *Salmonella typhimurium* (Collection OMS 2/86), *Citrobacter freundii* (Collection BE 161/90), *Proteus spp.* (CIDEF), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Candida albicans* (6615).

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM)

Se determinó la CIM¹² mediante el método de dilución en caldo en tubos con medio de cultivo Müller-Hinton, conteniendo cantidades crecientes de extracto metanólico de capítulos secos de Cc y Cs (100 ml, 200 ml, 300 ml), que corresponden a concentraciones de 204, 408 y 612 mg/ml y de 244, 488 y 732 mg/ml respectivamente. El inóculo utilizado para determinar la CIM fue preparado según Bauer et al. (1966)¹³. Se incubaron a 37 °C durante 24 h. Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado y se utilizaron

Preparation of aqueous extracts

a) Aqueous extracts

200 ml of boiling distilled water were added to 10 g of dry heads of Cs for 20 minutes (2x). The obtained solution was filtered through a gauze and was taken to dryness with a rotavapor to reduced pressure (yield 22.8 %). The same procedure was followed for 10 g of dry heads of Cc, obtaining a yield of a 20.9 %.

b) Methanolic extracts

Dry aqueous extracts were treated with 30 ml of methanol (3x), filtered through filter paper and taken to dryness with a rotavapor to reduced pressure (producing a yield of 10.2 and 12.22 % of Cc and Cs, respectively). Dry methanolic extracts were resuspended with 5 ml of sterile distilled water.

Microorganisms used

In order to determine antimicrobial activity, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus intermedius* (CIDEF)*, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Streptococcus agalactiae* (CIDEF), *Salmonella typhimurium* (Collection OMS 2/86), *Citrobacter freundii* (Collection BE 161/90), *Proteus spp.* (CIDEF), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Candida albicans* (6615) strains were used.

Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericide Concentration (MBC)

MIC¹² was determined by means of the dilution method, in broth, in tubes with Müller-Hinton culture medium, containing increasing quantities of methanolic extract of dry heads of Cs y Cs (100 ml, 200 ml, 300 ml), which correspond to 204, 408 and 612 mg/ml and 244, 488 and 732 mg/ml concentrations, respectively. The inoculum used to determine MIC, was prepared according to Bauer et al. (1966)¹³, and was incubated at 37°C for 24h. Determination procedures were carried out in duplicate and Chloramphenicol (Sigma C 0378 Lot 92H0288) and Nystatin (Sigma N 3503

como referencias estandar Cloranfenicol (Sigma C 0378 Lote 92H0288) y Nistatina (Sigma N 3503 Lote 33H0762). Para evaluar el efecto bactericida del extracto metanólico se determinó la CBM. De los tubos que no presentaron turbidez, se tomaron alícuotas de 0,1 ml y se cultivaron en placas de Petri. Se incubaron a 37 °C durante 24 horas y luego se realizó el recuento de UFC/ml.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestra la actividad antimicrobiana que presentan los extractos metanólicos de capítulos secos de *Centaurea solstitialis* y de *Centaurea calcitrapa*. El extracto de *Centaurea solstitialis* mostró actividad antimicrobiana con valores de CIM y CBM de 244 y 488 mg/ml respectivamente para *Staphylococcus aureus* y de una CIM de 244 mg/ml para *Streptococcus agalactiae*. Mientras que el extracto metanólico de *Centaurea calcitrapa* mostró una CIM de 408 mg/ml para *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* y de 612 mg/ml para *Salmonella typhimurium* y *Streptococcus agalactiae*. Éste último presentó también el mismo valor de CBM. Los extractos metanólicos de *Centaurea solstitialis* y de *Centaurea calcitrapa* no mostraron actividad antimicrobiana para *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus intermedius*, *Citrobacter freundii*, *Proteus spp*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*, bajo nuestras condiciones de trabajo.

Lot 33H0762) were used as standard references. MBC was determined to evaluate the bactericidal effect of the methanolic extract. 0.1ml aliquots were taken from the tubes that did not present turbidity and were cultivated in Petri dishes. These were subsequently incubated at 37°C for 24h, after which a further determination of UFC/ml was carried out.

RESULTS

Table 1 shows the antimicrobial activity of methanolic extracts of dry heads of *Centaurea solstitialis* and of *Centaurea calcitrapa*. The *Centaurea solstitialis* extract showed antimicrobial activity values for MIC and MBC of 244 and 488 mg/ml respectively for *Staphylococcus aureus*, and an MIC of 244 mg/ml for *Streptococcus agalactiae*. On the other hand, *Centaurea calcitrapa* methanolic extract showed an MIC of 408 mg/ml for *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* and 612 mg/ml for *Salmonella typhimurium* and *Streptococcus agalactiae*. The latter of these also showed the same value for MBC. Under our experimental conditions, *Centaurea solstitialis* and *Centaurea calcitrapa* methanolic extracts did not show antimicrobial activity against *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus intermedius*, *Citrobacter freundii*, *Proteus spp.*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*.

TABLA I: Actividad antimicrobiana de extractos metanólicos de *Centaurea solstitialis* y de *Centaurea calcitrapa*.**TABLE I:** Antimicrobial activity of *Centaurea solstitialis* and *Centaurea calcitrapa* methanolic extracts.

Microorganismos Microorganisms	Inóculo Inoculum	<i>Centaurea solstitialis</i>		<i>Centaurea calcitrapa</i>		Clo ^a Chl ^a	Nis ^b Nys ^b
		CIM mg/ml	CBM mg/ml	CIM mg/ml	CBM mg/ml		
<i>S. aureus</i>	7,4x10 ⁴	244	488	408	-	S	-
<i>S. epidermidis</i>	6,9x10 ⁶	-	-	-	-	S	-
<i>S. intermedius</i>	1,6x10 ⁶	-	-	-	-	S	-
<i>P. aeruginosa</i>	6,0x10 ⁴	-	-	408	-	S	-
<i>S. agalactiae</i>	4,4x10 ⁵	244	-	612	612	S	-
<i>S. typhimurium</i>	1,0x10 ⁵	-	-	612	-	S	-
<i>C. freundii</i>	2,6x10 ⁵	-	-	-	-	S	-
<i>Proteus spp.</i>	4,0x10 ⁵	-	-	-	-	S	-
<i>Escherichia coli</i>	1,2x10 ⁵	-	-	-	-	S	-
<i>Candida albicans</i>	7,6x10 ⁵	-	-	-	-	S	S

Los experimentos fueron realizados por duplicado. Las dosis, expresadas en mg/ml, de la Concentración Inhibitoria Mínima y de la Concentración Bactericida Mínima, se calcularon a partir del rendimiento del extracto metanólico proveniente de 10 g de capítulos secos de *Centaurea solstitialis* y de *Centaurea calcitrapa*. ^aCloranfenicol: 10 µ/ml, ^bNistatina: 500 UI/ml. S: sensible, (-): no presenta actividad.

The experiments were carried out in duplicate. The doses, expressed in mg/ml, of the Minimum Inhibitory Concentration and of the Minimum Bactericide Concentration, were calculated from yields of the methanolic extract from 10g of dry heads of *Centaurea solstitialis* and *Centaurea calcitrapa*. ^aChloramphenicol: 10 µ/ml, ^bNystatin: 500 UI/ml. S: sensitive. (-): did not present any activity.

DISCUSIÓN

Karawaya et al.(1975)¹⁰, utilizando el método de difusión en disco, demostraron que el extracto de éter de las hojas de Cc tiene actividad antimicrobiana. Este extracto presentó una zona de inhibición contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*, mientras que *Escherichia coli* y *Candida albicans*, entre otras, fueron resistentes, adjudicándosele la responsabilidad de esta actividad biológica a cnicina, una lactona sesquiterpénica. Estos datos son coinci-

DISCUSSION

Karawaya et al. (1975)¹⁰, using the disk diffusion method, demonstrated that ether extract of Cc leaves presents antimicrobial activity. This extract showed an inhibition area against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium*, while *Escherichia coli* and *Candida albicans*, among others, were resistant, Cnicin, a sesquiterpene lactone, was the agent responsible for this activity. This data coincides with that obtained from this work, in which a methanolic

dentes con los obtenidos en el presente trabajo, en el que se utilizó extracto metanólico de capítulos de Cc. De estos resultados, se deduciría que el mismo principio activo aislado de las hojas podría también encontrarse presente en los capítulos. Sin embargo, Ríos et al (1987)⁵, utilizando el método de dilución en caldo y empleando extractos de Cc recolectada en el área mediterránea de España, demostraron que esos extractos no poseían actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Existen diversas variables que podrían explicar esta aparente disparidad en los resultados. Por un lado, la relación inóculo versus concentración del extracto ensayado y por el otro, la composición química de las plantas, influenciada por las características edáficas y climáticas del lugar de recolección¹⁴.

No se han encontrado trabajos que evalúen la actividad antibacteriana de Cs.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos demuestran que *Centaurea calcitrapa*, bajo nuestras condiciones de trabajo, presenta actividad antimicrobiana en cuatro de las diez cepas ensayadas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Salmonella typhimurium*), mientras que *Centaurea solstitialis* muestra menor actividad antibacteriana, ya que sólo inhibe a dos cepas (*Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*).

extracto de Cc heads was used. From these results, it might be inferred that the same active principle isolated from leaves could also be present in the heads. However, Ríos et al. (1987)⁵, using the dilution method in broth and extracts of Cc harvested in the Spanish mediterranean area, demonstrated that these extracts did not present activity against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. There are some variables that may provide a plausible explanation for this apparent disparity in the results obtained. On the one hand, the inoculum versus concentration relationship of the assayed extract and on the other, the chemical composition of the plants influenced by the edaphic and climatic characteristics pertinent to the area of collection concerned¹⁴.

Research on the evaluation of the antibacterial activity of Cs has not been found.

CONCLUSION

Under the experimental conditions of this work, the results obtained demonstrate that *Centaurea calcitrapa*, presents antimicrobial activity in four of the ten assayed strains (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* and *Salmonella typhimurium*), while *Centaurea solstitialis* was found to present antibacterial activity to a lesser extent, inhibiting only two strains (*Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus*).

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Font Quer P. Plantas Medicinales. El Dioscórides Renovado. Editorial Labor S.A., Barcelona, España; 1995: p. 850-852.
2. Yesilada E, Sezik E, Fujita T, Tanaka S, Tabata M. Screening of some Turkish medicinal plants for their antiulcerogenic activities. *Phytotherapy Res* 1993; 7: 263-265.
3. Kamanzi P, Voirin B, Raynaud ET. Methoxy flavonoids from the flowers of *Centaurea solstitialis* L. (Compositae). *Plant Méd Phytothér* 1983; 17: 52-56.
4. Masso JL, Bertran MN, Adzet T. Contribution to a chemical and pharmacological study of several species of *Centaurea* (Compositae). *Plant Méd Phytothér* 1979; 13:41-45.
5. Ríos JL, Recio MC, Villar A. Antimicrobial activity of selected plants employed in the spanish mediterranean area. *J Ethnopharmacol* 1987; 21: 139-152.
6. Frontera MA, Tomas MA, Brunengo MC, Badajos MA, Tombesi OL, Ponce MA, et al. Estudio químico de la maleza *Centaurea calcitrapa*. *Rev Latinoamer Quím* 1991; 22: 29-31.
7. Hamburger M, Wolfender J, Hostettmann K. Search for chlorinated sesquiterpene lactones in the neurotoxic thistle *Centaurea solstitialis* by liquid chromatography mass spectrometry, and model studies on their possible artifactual formation. *Natural Toxins* 1993; 1: 315-327.

8. González A, Bermejo J, Massanet GM. Aportación al estudio quimiotaxonómico del género *Centaurea*: determinación estructural de las lactonas sesquiterpénicas presentes en centaureas de Canarias y de la península Ibérica. *Rev Latinoamer Quim* 1977; 8:176-180.
 9. Jakupovic J, Jia Y, Pathak VP, Bohlmann F, King RM. Bisabolone derivatives and sesquiterpene lactones from *Centaurea* species. *Planta Med* 1986; 5: 399-401.
 10. Karawya MS, Hilal SH, Hifnawy MS, El-Hawary SS. Isolation and preliminary pharmacological and microbiological screening of cnicin from *Centaurea calcitrapa* L. growing in Egypt. *Egypt J Pharm Sci* 1975; 4: 445-455.
 11. Yesilada E, Gurbuz I, Shibata H. Screening of Turkish antiulcerogenic folk remedies for anti-*Helicobacter pylori* activity. *J Ethnopharmacol* 1999; 3: 289-293.
 12. Leiva J. Determinación de la concentración mínima inhibitoria y de la concentración mínima bactericida. En: Díaz R, Gamazo C, López Goñi I. Editor. *Manual Práctico de Microbiología*. Editorial Masson, España; 1995: p. 127.
 13. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Truck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Amer J Clin Pathol* 1966; 45: 493-496.
 14. Evans WC. *Farmacognosia*, Trease-Evans, 13ª Edición. Editorial Interamericana, Mc Graw-Hill, México D.F., México; 1991: p. 85-90. (Footnotes)
- * CIDEF: Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa.