

Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos vegetales contra *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina

Evaluation of antibacterial activity of plant extracts against vancomycin resistant *Enterococcus faecalis*

Avaliação da atividade antibacteriana de extratos vegetais contra *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina

• • •

Diana N. Mojica A¹, Román Y. Ramírez-Rueda^{1*}, Mery I. Espitia M¹

Recibido: Febrero de 2015. Aceptado: Junio de 2015

Citación Vancouver: Mojica DN, Ramírez-Rueda RY, Espitia MI. Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de plantas contra *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina. Salud Soc Uptc. 2015;2(1): pp. 27-32

Resumen

Introducción: *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina (EfrV) posee resistencia a glucopeptidos, beta-lactámicos, aminoglicosidos, lincosamidas y trimetoprim-sulfametoxazol. Actualmente se cuenta con pocas opciones terapéuticas para el tratamiento de la infección por EfrV. Las infecciones comúnmente causadas por enterococos incluyen, infección de vías urinarias (IVU), endocarditis, bacteriemia, infecciones asociadas a catéter, infecciones de heridas, e infecciones intra-abdominales y pélvicas. En muchas oportunidades las cepas que causan estos cuadros infecciosos se originan de la microbiota intestinal. **Objetivo:** Evaluar el efecto antibacteriano de extractos de siete plantas reportadas por los habitantes de la zona rural de Soracá (Colombia), como agentes con potencial acción curativa ante infecciones. **Materiales y Métodos:** Se elaboraron extractos metanólicos y diclorometánicos de las plantas en estudio a través de extracción continua mediante Soxhlet. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos contra *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (resistente a vancomicina), por medio del método de microdilución en caldo propuesto por el CLSI. **Resultados:** Cuatro extractos tuvieron una CMI de 1,25 mg/mL, y el extracto diclorometánico de las hojas de *C. officinalis* tuvo

una CMI de 0,625 mg/mL. **Conclusión:** Estos resultados demuestran la capacidad inhibitoria de dichas plantas y validan parcialmente el conocimiento etnofarmacológico de los habitantes de la zona rural de Soracá.

Palabras clave: *Extractos vegetales, plantas medicinales, Calendula officinalis, Enterococcus faecalis, Resistencia a la Vancomicina, Etnofarmacología.* (Fuente: DeCS)

Abstract

Introduction: Vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* (VREf) has glycopeptide, beta-lactams, aminoglycosides, lincosamides and trimethoprim-sulfamethoxazole resistance. Currently there are few therapeutic options for the treatment of VREf infection. Infections commonly caused by enterococci include urinary tract infection (UTIs), endocarditis, bacteremia, catheter-related infections, wound infections, and intra-abdominal and pelvic infections. Many infecting strains originate from the patient's intestinal microbiota. **Objective:** Antibacterial activity of extracts from seven plants reported by residents of Soracá (Colombia) as agents with potential curative action against infections was evaluated. **Materials and Methods:** Dichloromethane and

1. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. (Tunja – Colombia)

* E-mail para correspondencia: roman.ramirez@uptc.edu.co

methanol extracts of plants under study were developed through continuous extraction by Soxhlet. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the extracts against *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (vancomycin resistant) was determined through the broth microdilution method proposed by the CLSI. **Results:** Four extracts had an MIC of 1,25 mg/mL, and dichloromethane extract of the leaves of *C. officinalis* had an MIC of 0,625 mg/mL. **Conclusion:** Our results demonstrate the inhibitory capacity of these plants and partially validate the ethnopharmacological knowledge of the rural residents of Soracá.

Keywords: *Plant extracts, medicinal plants, Calendula officinalis, Enterococcus faecalis, Vancomycin Resistance, Ethnopharmacology.* (Source: DeCS)

Resumo

Introdução: *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina (EfRV) tem resistência a glicopeptídeos, beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, lincosamidas e trimetoprim-sulfametoxazol. Atualmente existem poucas opções terapêuticas para o tratamento da infecção por EfRV. Infecções comumente causadas por enterococos incluem infecção do trato urinário (UTIs), endocardite, bacteremia, infecções relacionadas ao cateter, infecções de feridas e infecções intra-abdominais e pélvicas. Muitas cepas infectantes são originárias da microbiota intestinal do paciente. **Objetivo:** O efeito antibacteriano de extratos de sete plantas relatadas pelos habitantes das zonas rurais de Soracá (Colômbia) como agentes com potencial ação curativa, foi avaliada contra infecções. **Materiais e métodos:** Extratos metanólicos e diclorometano de plantas em estudo foram desenvolvidos através de extração contínua por Soxhlet. Foi determinada a concentração mínima inibitória (CMI) dos extratos contra *E. faecalis* ATCC51299 (Resistente à vancomicina), através da metodologia de microdiluição em caldo proposto pelo CLSI. **Resultados:** Quatro extratos tinham uma MIC de 1,25 mg/mL e extrato diclorometânico de folhas de *C. officinalis* tinha uma MIC de 0,625 mg/mL. **Conclusão:** Estes resultados demonstram a capacidade inibitória de tais plantas e validar parcialmente o conhecimento etnofarmacológico dos habitantes das zonas rurais de Soracá.

Palavras chave: *Extratos vegetais, Plantas medicinais, Calendula officinalis, Enterococcus faecalis, Resistência a vancomicina, Etnofarmacologia.* (Fonte: DeCS)

INTRODUCCIÓN

El incremento de las infecciones ocasionadas por bacterias resistentes a múltiples antibióticos en ambientes hospitalarios y extrahospitalarios cada vez es más frecuente. Lo anterior genera el aumento de los costos en el tratamiento, las estancias hospitalarias y el fracaso terapéutico (1). Desde el año 2.009 solo dos nuevos antibióticos han sido aprobados para uso clínico en los Estados Unidos y alrededor de nueve productos de suministro intravenoso con mecanismos de acción novedosos contra bacilos gramnegativos están en fases de evaluación II y III (2). La velocidad en la elaboración de nuevos antibióticos es inversamente proporcional a la evolución de las bacterias para el desarrollo de la resistencia a los mismos; así desde 1.980 la producción de nuevos antibióticos ha venido decayendo, tanto que en la actualidad se produce menos de una tercera parte de los antibióticos que se producían en aquella época (3). Por lo anterior una prioridad en las líneas de investigación a nivel mundial debería ser la búsqueda de nuevas fuentes de compuestos antimicrobianos, para lo cual la naturaleza brinda infinidad de recursos. Uno de esto recursos y seguramente el más diverso es la flora (4). El conocimiento empírico de las propiedades medicinales de las plantas se ha transmitido al interior y entre las comunidades humanas de generación en generación para diversos fines, incluyendo el tratamiento de enfermedades infecciosas. La tradición de "curar con plantas" tiene soporte científico, debido a que los compuestos activos producidos durante el metabolismo secundario vegetal, son generalmente responsables de diversas actividades biológicas (5).

Uno de las bacterias que ha sobresalido por su constate adaptación a los antibióticos a través de diversos mecanismos de resistencia es el *Enterococcus faecalis*, este microorganismo hace parte de la microbiota normal de intestino grueso, pero ciertas cepas causan infecciones del tracto urinario, de heridas y tejidos blandos, entre otras (6). La aparición de la resistencia a los glicopeptidos en 1.988, hizo que el tratamiento farmacológico para este microorganismo fuera mucho más difícil (7), considerando también la resistencia a beta-lactámicos, aminoglicosidos, lincosamidas y trimetoprim-sulfametoxazol (8). La resistencia de los enterococos está mediada por la aparición de genes que se denominan Van, y que se han dividido en seis tipos que incluyen desde la A hasta la F según la expresión de la resistencia a vancomicina y teicoplanina (9). El desarrollo de las cepas de enterococos resistentes a vancomicina

(ERV) ha hecho casi imposible su tratamiento, antibióticos de última generación deben ser usados para combatir infecciones causadas por estas cepas de enterococos multiresistentes como el *E. faecalis* del cual ya se ha reportado su resistencia al linezolid (10).

Una buena parte de los fármacos utilizados para tratar diversas dolencias, tiene su origen en las plantas, la razón de ser de esta afirmación es que las plantas representan una fuente importante de moléculas (11), algunas de estas conocidas y seguramente otra gran cantidad por conocer; es por esto que realizar bioprospección teniendo las plantas como fuente potencial de moléculas con actividad antimicrobiana, es una opción que debe ser tenida en cuenta como una de los principales recursos naturales en la búsqueda de antibióticos. Basado en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antibacteriana contra *E. faecalis* resistente a vancomicina, de los extractos de algunas plantas que se encuentran en Soracá (Colombia) y que son catalogadas por la población rural como plantas usadas para combatir infecciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo es de tipo experimental en el cual se aplican 16 tratamientos (extractos) a una cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 (resistente a vancomicina). Los tratamientos se aplicaron por triplicado y los resultados se compararon con controles positivos y negativos. El procedimiento detallado se expone a continuación:

Selección de las plantas: Las plantas fueron recolectadas en la zona rural del municipio de Soracá (Colombia), previa entrevista aplicada a los pobladores de la zona; dicha entrevista se orientó a cuestionarles sobre la existencia y el uso de plantas para tratar enfermedades infecciosas. La planta o parte de la misma que fue reportada en la entrevista se recolectó en bolsas de cierre hermético y de forma individual, bajo la guía de las personas que reportaban su uso.

Identificación de las plantas: Se depositó un ejemplar completo de cada una de las siete plantas recolectadas para ser identificadas taxonómicamente y catalogadas en el herbario de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.

Obtención de los extractos: Inicialmente se procedió al lavado del material vegetal con agua destilada estéril para eliminar impurezas del ambiente y del terreno, posteriormente se sometió a una temperatura de 40°C, el

tiempo necesario para ser deshidratado. Seguidamente el material fue pulverizado y se sometió a extracción continua por solventes mediante Soxhlet. Los solventes utilizados fueron diclorometano (DCM) al 99,5% y metanol (MET) al 99, 5%. El producto de la extracción por Soxhlet se llevó a sequedad por medio de rotaevaporación a 40°C para los extractos diclorometánicos y 60°C para los metanólicos, a los cuales se aplicó presión reducida hasta obtener la fracción sólida del mismo. Una vez obtenidos los extractos, se almacenaron en congelación hasta su uso posterior.

Ensayo de actividad antibacteriana: El potencial inhibitorio de los extractos se probó contra *E. faecalis* ATCC 51299 (resistente a vancomicina), para esto se utilizó el método de microdilución en caldo propuesto por el CLSI (12). Los extractos fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) al 99,5% hasta alcanzar una concentración final de 10 mg/mL del extracto y 2% de DCM. Inicialmente se hizo un tamizaje probando los extractos a una concentración de 10 mg/ml, llevando hasta la concentración mínima inhibitoria (CMI) aquellos extractos que presentaron actividad a la concentración probada en el tamizaje. Se utilizaron para el ensayo, un control de inhibición (cloranfenicol 50 µg/mL), un control de crecimiento (pocillo sin extracto), y un control de esterilidad (pocillo sin inóculo bacteriano). La lectura se realizó de forma visual después de 24 horas de incubación, aplicando 10 µL de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) de concentración 1 mg/mL como revelador de actividad metabólica. Con los extractos que inhibieron el crecimiento de *E. faecalis* ATCC 51299 en el tamizaje, se llevó a cabo la determinación de la CMI de los mismos, diluyendo seis veces el extracto, partiendo de una concentración de 10 mg/mL hasta 0,156 mg/mL. Cada ensayo se realizó por triplicado. Para determinar el resultado final de inhibición se aplicaron promedios a los resultados de la CMI de cada montaje.

RESULTADOS

Selección e identificación taxonómica de las plantas: Se reportaron siete plantas con las cuales se realizó el estudio. También se seleccionó (según la entrevista) la parte de la planta a utilizar para los ensayos de actividad antimicrobiana. Las plantas reportadas fueron: Caléndula (hojas y flores), Hinojo (hojas), Malva (hojas), Llantén (hojas), Sauco (hojas), Haba (hojas) e Hierba mora (frutos). Las siete plantas recolectadas fueron identificadas taxonómicamente y catalogadas en el herbario de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Los resultados de la clasificación taxonómica muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Identificación taxonómica del material vegetal.

Nombre común	Nombre científico	No. Registro del herbario de la Uptc
Caléndula	<i>Calendula officinalis</i>	UPTC 020939
Hinojo	<i>Foeniculum vulgare Mill.</i>	UPTC 020941
Malva	<i>Malva parviflora L.</i>	UPTC 020944
Llantén	<i>Plantago australis Lam.</i>	UPTC 020938
Sauco	<i>Sambucus nigra L.P</i>	UPTC 020940
Haba	<i>Vicia faba L.</i>	UPTC 020943
Hierba mora	<i>Solanum americanum Mill.</i>	UPTC 020942

Ensayo de actividad antibacteriana: Inicialmente se realizó un tamizaje en donde se sometió a la cepa de *E. faecalis* ATCC 51299 a una concentración de 10 mg/mL de cada uno de los extractos (metanólico y diclorometánico de cada planta). Los resultados del ensayo de pueden observar en la tabla 2.

Tabla 2. Resultados de la prueba de tamizaje de actividad bactericida (10 mg/mL) contra *Enterococcus faecalis* ATCC 51299

Material vegetal/Tipo de extracto	Metanólico (MET)		Diclorometánico (DCM)	
	I	NI	I	NI
<i>Calendula officinalis</i> (hojas)		x	x	
<i>Calendula officinalis</i> (flores)	x		x	
<i>Foeniculum vulgare Mill.</i> (hojas)		x		x
<i>Malva parviflora L.</i> (hojas)		x		x
<i>Plantago australis Lam.</i> (hojas)		x	x	
<i>Sambucus nigra L.P</i> (hojas)		x	x	
<i>Vicia faba L.</i> (hojas)		x		x
<i>Solanum americanum Mill</i> (fruto)		x	x	

I: Inhibición; NI: No inhibición

Con los extractos que inhibieron el crecimiento de la bacteria en el tamizaje (10 mg/mL), se llevó a cabo la determinación de la concentración mínima inhibitoria diluyendo seis veces la concentración inicial hasta llegar a 0,156 mg/mL. Las réplicas de cada uno de los tratamientos arrojaron los mismos resultados, por lo tanto los promedios arrojaron datos homogéneos. Los resultados de la prueba de CMI pueden ser observados en la tabla 3.

Tabla 3. CMI de los extractos que fueron positivos en el tamizaje

Extracto/Conc del extracto	10 mg/mL	5 mg/mL	2,5 mg/mL	1,25 mg/mL	0,625 mg/mL	0,321 mg/mL	0,156 mg/mL
<i>C. officinalis</i> (hojas) DCM	I	I	I	I	I	NI	NI
<i>C. officinalis</i> (flores) MET	I	I	I	I	NI	NI	NI
<i>C. officinalis</i> (flores) DCM	I	I	I	I	NI	NI	NI
<i>P. australis Lam.</i> (hojas) DCM	I	I	I	I	NI	NI	NI
<i>S. nigra L.P</i> (hojas) DCM	I	I	I	I	NI	NI	NI
<i>S. americanum Mill</i> (fruto) DCM	I	I	I	I	NI	NI	NI

I: Inhibición; NI: No inhibición

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Una de las estrategias usada para enfocar la búsqueda de compuestos con actividad biológica a partir de fuentes naturales, es la que se basa en el conocimiento de los usos etnomedicinales de las plantas de cierta región (13). Una vez acumulada suficiente evidencia empírica del uso de plantas para tratar alguna patología, puede entrarse a la fase de validación *In Vitro* de la actividad biológica reportada. En este trabajo se reportan siete plantas que según los habitantes de la zona rural de Soracá (Colombia), poseen un efecto sobre el curso normal de las infecciones, haciendo que estas se resuelvan de manera satisfactoria. Con el objetivo de validar el conocimiento popular mencionado anteriormente, se obtuvieron extractos metanólicos y diclorometánicos de las plantas reportadas, considerando el posible efecto antibacteriano de metabolitos secundarios polares y no polares respectivamente contra *E. faecalis* resistente a vancomicina ATCC 51299.

Son pocos los trabajos en los que se prueba la capacidad inhibitoria de los extractos de las plantas aquí estudiadas contra enterococos resistentes a vancomicina (ERV), sin embargo, algunos reportes hacen alusión a la capacidad inhibitoria de los extractos de *C. officinalis* contra enterococos sensibles a vancomicina (ESV), como por ejemplo el realizado con el extracto de la flor de dicha planta en metanol y etanol cuyos halos de inhibición midieron 13 y 15 mm respectivamente (14). También se reportan CMI que van desde 7,5 a 17,5 mg/mL en un estudio hecho con cinco tipos de extractos (agua, etanol, cloroformo, n-butanol y éter de petróleo) de las hojas, flores, tallo y raíz de *C. officinalis* (15). Extractos de otras especies de *Calendula* como los extractos metanólico y hexánico de las flores de *C. arvensis* poseen también efecto inhibitorio a CMI de 25 µg/mL y 12,5 µg/mL respectivamente contra *E. faecalis* vancomicina sensible (16). Es de resaltar que en el presente estudio el extracto con mayor capacidad inhibitoria resultó ser el de las hojas de *C. officinalis* en DCM con una CMI de 0,625 mg/mL, concentración por la cual sería recomendable continuar el estudio fitoquímico para aislar el/los metabolito(s) responsable(s) de la actividad antibacteriana.

Aunque el extracto metanólico de las hojas de *C. officinalis* tuvo una CMI mayor (1,25 mg/mL) al de las hojas, dicha concentración es superior en eficacia a la de algunos estudios reportados.

Del presente trabajo también se obtuvo una CMI de 1,25 mg/mL contra ERV usando extractos diclorometánicos de las hojas de *Plantago australis*, sin embargo extractos de esta planta sólo se reportan en la literatura con efecto

antioxidante (17). Especies como *P. major* han sido estudiadas ampliamente y existen reportes que confirman su capacidad inhibitoria frente a *E. faecalis*, en concentraciones de 500 mg/mL, observándose halos de inhibición de 10 mm con extractos metanólicos de las hojas (18).

Sobre *Sambucus nigra* son pocos los reportes que existen de su actividad antimicrobiana y ninguno específicamente contra EFRV. Un estudio publicado en 2010 en donde se probaron algunos constituyentes de las flores y frutos de *S. nigra* contra *S. aureus* resistente a meticilina (SARM), demuestra que las flavonas, flavonoides y dihidroflavonas inhiben el crecimiento de SARM (19). La actividad antibacteriana de extractos de *S. nigra* también ha sido evaluada con otras bacterias de importancia clínica como *E. coli*, inhibiendo dicha bacteria a una CMI de 0,0038 mg/mL (20). También se han logrado inhibir bacterias grampositivas del género *Streptococcus* como *S. pyogenes* y estreptococos del grupo C y G (21). Por el contrario, uno de los pocos estudios que evalúa la acción antimicrobiana del extracto metanólico de *S. nigra* sobre *Enterococcus raffinosus* muestra resultados negativos (22). El haber obtenido una inhibición de EFRV con extractos de *S. nigra* a una CMI de 1,25 mg/mL es un hallazgo importante, que abre las puertas hacia futuras investigaciones sobre efecto antimicrobiano de esta planta en bacterias grampositivas multi-drogoresistentes.

La CMI del extracto diclorometánico del fruto de *Solanum americanum* fue de 1,25 mg/mL. No se tienen reportes de la acción antimicrobiana de extractos de *S. americanum* sobre ERV excepto el del presente estudio. En contraste otras especies han sido más estudiadas, tal es el caso de *S. nigrum*, de la cual se informa una inhibición de *E. faecalis* sensible a vancomicina a partir de extractos clorofórmicos de la hoja con un halo de inhibición de 2,7 mm (23). Por el contrario otros estudios reportan la no inhibición de *E. faecalis* con concentraciones de hasta 100 mg/mL de extracto hexánico, acetónico y metanólico de las hojas de *S. nigrum* (22). Extractos acuosos de *Solanum torvum* tuvieron un importante efecto inhibitorio sobre *Enterococcus sp.*, inhibiendo esta bacteria a una CMI de 0,025 mg/mL (24). El presente hallazgo representa un aporte más al estudio de las actividades biológicas de las especies de *Solanum sp.* y pone de presente el potencial farmacológico de este género y en especial del fruto del mismo, constituyente de la planta que no posee reportes de actividad antimicrobiana.

La actividad antibacteriana encontrada en aproximadamente un 30% de las plantas reportadas por los habitantes de la zona rural de Soracá (Colombia) resultó ser lo suficientemente

buena en la inhibición de EFRV, con MICs entre 1,25 y 0,625 mg/mL, por esta razón vale la pena considerar la continuación del estudio fitoquímico de sus componentes, con el ánimo de encontrar las moléculas responsables de la actividad antibacteriana. El hallazgo de que tales extractos inhiben el crecimiento de EFRV es un hecho importante en la lucha contra la resistencia bacteriana, que pone de presente nuevas fuentes de posibles moléculas con efecto antimicrobiano frente a bacterias grampositivas multiresistentes.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaración no tener ningún conflicto de intereses. La presente investigación fue financiada por fondos de Colciencias (convocatoria 617 de 2013) y la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia.

AGRADECIMIENTOS

Al grupo del herbario de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia en cabeza de su directora María Eugenia Morales, quienes realizaron la identificación taxonómica de las planta en estudio. En especial a los residentes de la zona rural de Soracá por haber transmitido su conocimiento, el cual sirvió como base para el desarrollo de este estudio.

REFERENCIAS

1. Spellberg B, Guidos R, Gilbert D, Bradley J, Boucher HW, Scheld WM, et al. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2008;46(2):155-64.
2. Freire-Moran L, Aronsson B, Manz C, Gyssens IC, So AD, Monnet DL, et al. Critical shortage of new antibiotics in development against multidrug-resistant bacteria—time to react is now. *Drug resist update.* 2011;14(2):118-24.
3. Taubes G. The bacteria fight back. *Science.* 2008;321(5887):356-61.
4. Ríos JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol.* 2005;100(1):80-4.
5. González-Lamothe R, Mitchell G, Gattuso M, Diarra MS, Malouin F, Bouarab K. Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. *Int J Mol Sci* 2009;10(8):3400-19.
6. Woodford N, Livermore DM. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. *J Infect.* 2009;59:S4-S16.
7. Uttley AC, Collins C, Naidoo J, George R. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet.* 1988;331(8575):57-8.
8. Moellering Jr RC. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clin Infect Dis.* 1992;14:1173-78.
9. Pootoolal J, Neu J, Wright GD. Glycopeptide antibiotic resistance. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2002;42(1):381-408.
10. Johnson A, Tysall L, Stockdale M, Woodford N, Kaufmann M, Warner M, et al. Emerging linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*

isolated from two Austrian patients in the same intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002;21(10):751-4.

11. Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(4):564-82.

12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. M07-A9 Document Nine edition. 2012.

13. Heinrich M, Gibbons S. Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. *J Pharm Pharmacol.* 2001;53(4):425-32.

14. Efstratiou E, Hussain AI, Nigam PS, Moore JE, Ayub MA, Rao JR. Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. *Complement Ther Clin Pract.* 2012;18(3):173-6.

15. Mathur R, Goyal M. Antimicrobial and phytochemical estimation of *Calendula officinalis* against human pathogenic micro organisms. *Int J Innov Biosc.* 2011;1:1-10.

16. Abudunia A-M, Ansar MH, Taoufik J, Ramli Y, Essassi EM, Ibrahim A, et al. Evaluation of antibacterial activity of extracts from *Calendula avaris* flowers. *J Chem Pharm Res.* 2014;6(8):156-61.

17. Nemitz MC, Banderó Filho V, Zanetti GD, Zanotto CZ, Manfron MP. Phenolic compounds and antioxidant activity of the leaves of *Plantago australis* L. (Plantaginaceae). *Lat Am J Pharm.* 2010;29(7):1082-7.

18. Abd-Razik BM, Hasan HA, Murtadha MK. The Study of Antibacterial Activity of *Plantago Major* and *Ceratonia Siliqua*. *The Iraqi Postgraduate Medical Journal* 2012;11(1):130-5.

19. Hearst C, McCollum G, Nelson D, Ballard LM, Millar BC, Goldsmith CE, et al. Antibacterial activity of elder (*Sambucus nigra* L.) flower or berry against hospital pathogens. *J Med Plants Res.* 2010;4(17):1805-9.

20. Arjoon AV, Saylor CV, May M. In Vitro efficacy of antimicrobial extracts against the atypical ruminant pathogen *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. *BMC Complement Altern Med.* 2012;12(1):169.

21. Krawitz C, Mraheil MA, Stein M, Imirzaloglu C, Domann E, Pleschka S, et al. Inhibitory activity of a standardized elderberry liquid extract against clinically-relevant human respiratory bacterial pathogens and influenza A and B viruses. *BMC Complement Altern Med.* 2011;11(1):16.

22. Hleba L, Vukovi N, Horská E, Petrová J, Sukdolak S, Ka ániová M. Phenolic profile and antimicrobial activities to selected microorganisms of some wild medical plant from Slovakia. *Asian Pac J Trop Dis.* 2014 8//;4(4):269-74.

23. Yogananth N, Buvanewari S, Muthezhilan R. Larvicidal and antibacterial activities of different solvent extracts of *Solanum nigrum* LINN. *Global J Biotech Biochem.* 2012;7(3):86-9.

24. Umera-Begam A, Senthilkumar R. Antibacterial activity of a traditional medicinal plant against pathogenic microorganisms causing urinary tract infection. *World J Pharm Pharm Sci.* 2014;3(7):1116-26.