

ARTÍCULO ORIGINAL

Recibido para publicación: febrero 27 de 2015.

Aceptado en forma revisada: julio 29 de 2015.

ISSN: 2145-5333

Actividad antibacteriana de extractos de plantas provenientes del área rural de soracá contra *staphylococcus aureus* resistente a meticilina (sarm)

Antibacterial activity of plant extracts from rural area of soracá against methicillin-resistant *staphylococcus aureus* (sarm)

[Román Y. Ramírez-Rueda](#)¹, Diana Natalia Mojica Ávila², Mery Isabel Espitia Mayorga²

RESUMEN

Introducción: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) es una cepa bacteriana resistente a una gran variedad de antibióticos, incluidos los carbapenems y la vancomicina. Actualmente se cuenta con muy pocas opciones terapéuticas para el tratamiento de la infección por SARM, por lo tanto el enfoque hacia las plantas como fuente de moléculas con acción antibacteriana es una buena opción para investigar posibles compuestos activos. **Objetivo:** Evaluar la actividad antibacteriana de extractos metanólicos y diclorometánicos de plantas (reportadas por la población rural de Soracá Colombia como tratamiento empírico para las infecciones) contra SARM. **Métodos:**

Estudio experimental en el cual se aplicaron 16 tratamientos (extractos) a una cepa de SARM. Los extractos provinieron de siete plantas y se obtuvieron por medio de extracción continua con solventes (metanol y diclorometano) usando Soxhlet. El método de microdilución en caldo fue usado para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos, realizando inicialmente un tamizaje a una concentración de 10 mg/mL y luego hallando la CMI de los extractos que tuvieron actividad a tal concentración. La inhibición se verificó por lectura visual después de aplicar 3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). **Resultados:** De los 16 extractos probados, seis inhibieron al SARM en concentración de 10 mg/mL. Tales extractos tuvieron efecto a una CMI de 1,25 mg/mL. **Conclusión:** Los seis extractos de las plantas que tuvieron acción inhibitoria frente a SARM son fuentes potenciales de moléculas que deben ser estudiadas más a fondo con el fin de aportar al estudio de posibles alternativas contra la resistencia bacteriana.

Palabras clave: Extractos vegetales, plantas medicinales, fitoterapia, *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina, Etnofarmacología.

¹ Magister en Microbiología. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Correo electrónico para correspondencia: roman.ramirez@uptc.edu.co

² Estudiante de Química. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia

ABSTRACT

Introduction: Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a bacterial strain resistant to a wide variety of antibiotics, including carbapenems and vancomycin. Currently there are very few therapeutic options for MRSA infection therapeutic treatment; therefore the focus on plants as a source of molecules with antibacterial action is a good choice to look into possible active compounds. **Objective:** To evaluate the antibacterial activity of methanol and dichloromethane plants extracts (reported by the rural population Soracá-Colombia as empirical therapy for infections) against MRSA. **Methods:** Experimental study in which 16 treatments (extracts) were applied to a strain of MRSA. The extracts were from seven plants and were obtained by continuous extraction with solvents (methanol and dichloromethane) using Soxhlet. The broth microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of extracts, initially performing a screening at concentration of 10 mg/mL and then finding the MIC of extracts which were active at this concentration. Inhibition was verified by visual reading after applying 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). **Results:** From 16 extracts tested, six of them inhibited MRSA in a concentration of 10 mg/mL. Such extracts had an MIC of 1.25 mg/mL. **Conclusion:** Six plants extracts that had inhibitory activity against MRSA are potential sources of molecules to be studied further in order to contribute to the study of alternatives against bacterial resistance.

Keywords: Plant extracts, medicinal plants, phytotherapy, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, *Ethnopharmacology*.

INTRODUCCIÓN

A través del tiempo, el conocimiento de las propiedades medicinales de las plantas se ha transmitido al interior y entre las comunidades humanas para diversos fines, incluyendo el tratamiento de enfermedades infecciosas. Lo anterior tiene un soporte científico ya que los compuestos activos producidos durante el metabolismo secundario vegetal, son generalmente responsables de diversas actividades biológicas. Actualmente, los datos sobre la actividad antimicrobiana de productos de numerosas plantas se han confirmado científicamente, y van en paralelo con el número creciente de informes sobre microorganismos patógenos multiresistentes a los agentes antimicrobianos (1). La progresiva ocurrencia y continua diseminación de la resistencia bacteriana ha generado un incremento en la morbi-mortalidad, y en los costos generados por la atención médica a pacientes que padecen de infecciones por bacterias multidrogaresistentes (MDR) (2). Una de las bacterias que se distingue por su constante adaptación a los antibióticos por medio del desarrollo de mecanismos de resistencia es el *Staphylococcus aureus*, siendo la primera bacteria en la cual se detectó la resistencia a la penicilina (3). Con el avance de la química en 1.960 se introdujo al mercado de los antibióticos la metilina (penicilina semisintética), cuyo uso supuso un gran avance en el tratamiento de las infecciones estafilocócicas resistentes a penicilina, sin embargo, la primera cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (SARM) se describió en 1.961, solo algunos meses después del inicio de la utilización clínica del antibiótico (4). SARM es resistente a todos los betalactámicos (incluyendo cefalosporinas y carbapenems) (5), y habitualmente a aminoglucósidos, eritromicina, clindamicina, tetraciclinas, sulfamidas, quinolonas y rifampicina, mientras que suele ser sensible a los glucopéptidos (6). A principios del siglo XXI se reportó en los Estados Unidos la primera cepa de SARM con elevada resistencia a la vancomicina (uno de los pocos

antibióticos efectivos contra dicha bacteria), (7) es así que el espectro de antibióticos que en la actualidad son efectivos contra esta bacteria es bastante reducido.

La infección por SARM se produce generalmente de forma endógena en zonas con alteraciones previas de la barrera mucocutánea debido a heridas traumáticas, intervenciones quirúrgicas, drogadicción parenteral, enfermedades dermatológicas, cateterismo intravascular, entre otras causas. Lo anterior ocasiona la colonización de la bacteria con posterior propagación, lo que se traduce en infecciones que afectan al tejido cutáneo y subcutáneo ocasionando abscesos, infecciones de herida quirúrgica, infección asociada al catéter intravascular o sondaje urinario. La diseminación sanguínea de la bacteria puede provocar shock séptico e infecciones metastásicas graves como la endocarditis bacteriana aguda, miocarditis, pericarditis, meningitis, artritis, osteomielitis o neumonía (8). La importancia que confiere la resistencia ampliada a los fármacos antimicrobianos, es el aumento de la mortalidad en pacientes con patologías infecciosas causadas por bacterias MDR, comparada con la mortalidad de infecciones causadas por bacterias que no poseen tal característica, esto puede evidenciarse, entre otros, en un estudio que compara la mortalidad en pacientes con bacteriemia causada por SARM y la causada por *S. aureus* meticilino-sensible (SAMS) en donde la infección con SARM aumenta significativamente el riesgo de muerte (OR: 1,93) (9). Bacterias como el *S. aureus* desarrollan mecanismos de resistencia con facilidad en poco tiempo, esta tasa de resistencia es mucho mayor a la creación o descubrimiento de nuevos antibióticos, lo cual hace importante la investigación de alternativas terapéuticas derivadas de diversas fuentes.

Las plantas representan una fuente importante de moléculas (10), algunas de estas bien conocidas y seguramente otra gran cantidad por conocer; es por esto, que realizar bioprospección enfocándose en las plantas como fuente potencial de moléculas con actividad antimicrobiana, es una opción que debe ser tenida en cuenta como recurso principal en la búsqueda de antibióticos. Basado en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antibacteriana contra SARM de extractos de algunas plantas que se encuentran en Soracá (Boyacá -Colombia) y que son catalogadas por la población rural como plantas usadas para combatir infecciones.

MÉTODOS

Corresponde a un estudio experimental en el cual se aplican varios tratamientos (extractos) a una cepa de SARM. 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 de la zona rural del municipio de Soracá (11) previa entrevista aplicada a los pobladores de la zona, la cual 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.

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% en dicho orden. 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 *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (resistente a meticilina), para esto se utilizó el método de microdilución en placa 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)-2,5difeniltetrazolio (MTT) de concentración 1 mg/mL como revelador de actividad metabólica. Con los extractos que inhibieron el crecimiento de *S. aureus* ATCC 43300 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.

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 *S. aureus* ATCC 43300 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 antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

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

I: Inhibición; NI: No inhibición

Con los extractos que inhibieron el crecimiento de *S. aureus* ATCC 43300 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. 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 contra *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

Extracto/Concent. 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	NI	NI	NI
<i>C. officinalis</i> (13) MET	I	I	I	I	NI	NI	NI
<i>C. officinalis</i> (13) DCM	I	I	I	I	NI	NI	NI
<i>P. australis</i> Lam. (hojas) DCM	I	I	I	I	NI	NI	NI
<i>S. nigra</i> L.P (hojas) DCM	I	I	I	I	NI	NI	NI
<i>S. americanum</i> Mill (fruto) DCM	I	I	I	I	NI	NI	NI

I: Inhibición; NI: No inhibición

DISCUSIÓN

Una de las maneras de enfocar la búsqueda de compuestos con actividad biológica, es la que se basa en el conocimiento de los usos etnomedicinales de las plantas de cierta región. Al recopilar suficiente evidencia empírica del uso de plantas para tratar alguna patología, puede entrarse a la fase de validación de la actividad biológica reportada. En este trabajo se reportan siete plantas que según los habitantes de la zona rural de Soracá (11), poseen un efecto sobre el curso normal de las infecciones,

haciendo que estas curen. Pensando en 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.

Estudios con características similares al aquí mencionado se reportan en otros países como Marruecos, en donde se evaluó la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos y hexánicos de la flor de *Calendula arvensis*, que lograron inhibir una cepa de SARM en concentraciones de 25 µg/mL y 6,25 µg/mL respectivamente (14). Otros estudios específicamente de extractos de *C. officinalis* muestran resultados positivos para la inhibición de cepas resistentes y sensibles a la meticilina de *S. aureus*. Utilizando el extracto etanólico de las flores de *C. officinalis*, Shanab y colaboradores lograron inhibir el crecimiento de una cepa de SARM a una CMI de 0,781 mg/mL (15).

Ensayos realizados con la misma planta, pero contra *S. aureus* sensible a meticilina (MSSA) se han realizado, obteniendo CMIs que van desde los 64 mg/mL hasta 0,125 mg/mL, dependiendo de la naturaleza del extracto(16). En otros trabajos en los que se utilizan extractos de metanólicos y etanólicos de flor de *C. officinalis* se han obtenido halos de inhibición entre 14 y 28 mm usando la técnica de difusión en agar (17, 18).

Un estudio de cinco tipos de extractos (agua, etanol, cloroformo, n-butanol y éter de petróleo) de las hojas, flores, tallo y raíz de *C. officinalis* arrojó CMIs que van desde los 7,5 a 10 mg/mL según el tipo de extracto y parte de la planta utilizada (19). En el presente estudio se obtuvo una CMI de 1,25 mg/mL tanto de las hojas como de las flores de *C. officinalis*, de extractos diclorometánicos y metanólicos respectivamente. El hallazgo de actividad antibacteriana a bajas concentraciones de extractos diclorometánicos de las hojas de *C. officinalis* no se encuentra reportado hasta el momento en la literatura científica.

Por otra parte extractos diclorometánicos de hojas de *Sambucus nigra* L.P también presentaron CMI sobre SARM de 1,25 mg/mL; concentración significativamente menor a la reportada en un estudio realizado con extracto etanólico de la hojas de la misma planta sobre la misma bacteria (CMI₅₀: 5,2 mg/mL) utilizando la misma técnica microbiológica (20). Lo anterior lleva a pensar que la diversidad de metabolitos en esta planta es suficientemente grande para seguir realizando estudios cuyo objetivo sea hallar moléculas con actividad antibacteriana. También se encuentran estudios que utilizan extractos del fruto maduro de *S. nigra* contra bacterias como *S. aureus* meticilina sensible, obteniendo una CMI de 5 mg/mL (21) o un halo de inhibición de 17 mm para SARM sometiéndola a fracciones del extracto (22). CMIs de 0,2 mg/mL se han observado cuando se someten bacterias como *S. epidermidis* a extractos metanólicos de la flor de *S. nigra* (23), lo cual afianza la anterior afirmación y pone a esta planta como un candidato idóneo para hacer investigación de compuestos activos contra bacterias grampositivas.

Extractos de *Solanum americanum* Mill han sido sometidos a estudio con buenos resultados sobre MSSA, empleando toda la planta y metanol como solvente para obtener el extracto; luego de las pruebas de actividad antimicrobiana se logró establecer una concentración mínima bactericida de 12,5 mg/mL usando el Soxhlet como método de extracción (24). En el presente estudio el extracto diclorometánico de fruto de *S. americanum* Mill tuvo acción antibacteriana sobre SARM a una CMI de 1,25 mg/mL. Particularmente sobre esta especie de *Solanum* no hay muchos reportes de actividad antibacteriana, no obstante, para *S. nigra* existen estudios que

reportan CMI que van de 4 a 8 µg/mL (25), o halos de inhibición que van desde 3,4 a 15,2 mm usando una concentración de 20 mg/mL (26).

Del presente trabajo también se obtuvo una CMI de 1,25 mg/mL usando extractos diclorometánicos de las hojas de *Plantago australis*, sin embargo, extractos de esta planta sólo se reportan en la literatura con efecto antioxidante (27). Especies como *P. major* han sido estudiadas ampliamente y existen reportes que confirman su capacidad inhibitoria frente a *S. aureus*, en concentraciones tan altas como 125 mg/mL, observándose halos de inhibición de 10 mm con extractos metanólicos de las hojas (28) o halos de 13 mm con 133mg/mL (29) y tan bajas como 14,2 mg/mL de extracto acetónico (30). El hecho de que el extracto diclorometánico de las hojas de *Plantago australis* presentara inhibición a una concentración de 1,25 mg/mL hace que dicha planta debe ser tenida en cuenta para desarrollar posteriores trabajos sobre su capacidad antibacterial.

CONCLUSIONES

La actividad antibacteriana encontrada en aproximadamente un 30% de las plantas reportadas por los habitantes de la zona rural de Soracá resultó ser lo suficientemente buena (1,25 mg/mL) en la inhibición de SARM, por lo tanto vale la pena considerar la continuación del estudio fitoquímico de sus componentes con el ánimo de encontrar el/los principio(s) activo(s) que son responsables de la actividad antibacteriana. El hecho de que tales extractos inhiban el crecimiento de SARM es un evento importante en la lucha contra la resistencia bacteriana que muestra nuevas fuentes de posibles moléculas con efecto anti-SARM.

BIBLIOGRAFIA

1. Silva N, Fernandes JA. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 2010;16(3):402-13.
2. Livermore DM. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. Clin Infect Dis. 2003;15(36 S1):S11-23.
3. Rammelkamp CH, Maxon T. Resistance of Staphylococcus aureus to the Action of Penicillin. Proc Soc Exp Biol Med. 1942;51:4.
4. Barber M. Methicillin-resistant staphylococci. J Clin Pathol. 1961;14(4):385-93.
5. Brown DFJ, Reynolds PE. Intrinsic resistance to β-lactam antibiotics in staphylococcus aureus. FEBS Letters. 1980;122(2):275-8.
6. Graninger W, Leitha T, Breyer S, Francesconi M, Lenz K, Georgopoulos A. Methicillin- and gentamicin-resistant Staphylococcus aureus: susceptibility to fosfomicin, cefamandole, N-formimidoyl-thienamycin, clindamycin, fusidic acid and vancomycin. Drugs Exp Clin Res. 1985;11(1):23-7.
7. Centers for Disease Control. Staphylococcus aureus resistant to vancomycin, United States. 2002.
8. Goulida IM, David MZ, Esposito S, Garau J, Linae G, Mazzei T, et al. New insights into methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. International Journal of Antimicrobial Agents. 2012;39:96 -104.
9. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW,

- Carmeli Y. Comparison of Mortality Associated with Methicillin-Resistant and Methicillin Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*. 2003 January 1, 2003;36(1):53-9.
10. Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999;12(4):564–82.
 11. Colombia P. Encuesta Nacional de Demografía y Salud (ENDS 2005).[en línea] 2005.[Fecha de acceso: 18 de junio de 2015].
 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. Penaloza-Plascencia M, Montoya-Fuentes H, Flores-Martinez SE, FierroVelasco FJ, Penaloza-Gonzalez JM, Sanchez-Corona J. Molecular identification of 7 human papillomavirus types in recurrent respiratory papillomatosis. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 2000 Sep;126(9):1119-23. PubMed PMID: 10979126.
 14. 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.
 15. Shanab A, Ali B, Adwan GM, Adwan KM, Abu Shanab FB. Efficacy of aqueous and ethanol extracts of some Palestinian medicinal plants for potential antibacterial activity. *The Islamic Univ J*. 2008;16(2):77-86.
 16. Khalid KA, Teixeira da Silva J. Biology of *Calendula officinalis* Linn.: focus on pharmacology, biological activities and agronomic practices. *Med Aromat Plant Sci Biotechnol*. 2012;6(1):12-27.
 17. 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.
 18. Hamad MN, Mohammed HJ, Merdaw MA. Antibacterial Activity of *Calendula Officinalis* Flowers In Vitro. *Ibn Al- Haitham J for Pure & Appl Sci*. 2011;24(3):56-62.
 19. Mathur R, Goyal M. Antimicrobial and phytochemical estimation of *Calendula officinalis* against human pathogenic micro organisms. *Int J Innov Biosc*. 2011;1:1-10.
 20. Quave CL, Plano LR, Pantuso T, Bennett BC. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol*. 2008;118(3):418-28.
 21. Mohammadsadeghi S, Malekpour A, Zahedi S, Eskandari F. The antimicrobial activity of elderberry (*Sambucus nigra* L) extract against gram positive bacteria, gram negative bacteria and yeast. *Res J App Sci*. 2013;8(4):240-3.
 22. 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.
 23. Hleba L, Vuković N, Horská E, Petrová J, Sukdolak S, Kačániová M. Phenolic profile and antimicrobial activities to selected microorganisms of some wild medical plant from Slovakia. *Asian Pac J Trop Dis*. 2014;4(4):269-74.
 24. Babalola IT, Adelakun EA, Garba SY. Evaluation of Antimicrobial Activity of Crude Methanol Extract of *Solanum nodiflorum* Jacq (Solanaceae) *J Pharmacogn Phytochem*. 2005;10(4):1-5.
 25. Sridhar T, Josthna P, Naidu C. In vitro antibacterial activity and phytochemical analysis of *Solanum nigrum* (Linn.)-An important antiulcer medicinal plant. *J Exp Sci*. 2011;2(8):24-9.
 26. Abbas K, Niaz U, Hussain T, Saeed MA, Javaid Z, Idrees A, et al. Antimicrobial activity of fruits of *Solanum nigrum* and *Solanum xanthocarpum*. *Acta poloniae pharmaceutica*. 2014;71(3):415.

27. 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.
28. 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.
29. Saltan G, Altanlar N. Antimicrobial activity of some plants used in folk medicine. *J Fac Pharm.* 2003;32(3):159-63.
30. Metiner K, Ozkan O, Ak S. Antibacterial effects of ethanol and acetone extract of *Plantago major* L. on Gram positive and Gram negative bacteria. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2012;18(3):503-5.