

Potencial antimicrobiano de extractos de plantas medicinales y sus mezclas frente a bacterias asociadas con conjuntivitis

Antimicrobial potential of plant extracts and their mixtures against bacteria associated with conjunctivitis

Wendy Johanna Velasco Garcia¹, Ludy C. Pabón Baquero², Patricia Hernández-Rodríguez³

Resumen

Introducción. La conjuntivitis bacteriana es una de las infecciones oculares con mayor tasa de consulta oftálmica, siendo el género *Staphylococcus* el agente etiológico que presenta mayor resistencia a los antibióticos. **Objetivo.** Determinar el potencial antimicrobiano de extractos de plantas medicinales y sus mezclas frente a bacterias asociadas con conjuntivitis. **Métodos.** A partir de plantas como Belladona, Caléndula, Albahaca, Achiote y Romerillo se prepararon los extractos etanólicos y se evaluó su potencial antibacteriano frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*, mediante las técnicas de difusión en disco y dilución en tubo. El efecto de las mezclas se determinó para el extracto con mejor actividad y el antibiótico con mayor halo de inhibición a través de la técnica de tablero. **Resultados.** Se encontró que el extracto con mayor potencial para *S. aureus* fue el de achiote (hojas) con un halo de inhibición de 13 mm y CMI de 15 mg/mL, mientras que para *S. epidermidis* fueron los de hojas y frutos de achiote con halos de 16,6 y 9,6 mm y CMI de 15 y 30 mg/mL respectivamente. En relación con las combinaciones, el extracto de achiote y ciprofloxacina mostró un efecto de sinergia parcial para *S. aureus* con una CFI de 0,83 y un efecto aditivo para *S. epidermidis* con una CFI de 1,84. **Conclusiones.** Este trabajo se constituye en la base de futuras investigaciones orientadas hacia el desarrollo de bioproductos de uso ocular que puedan ser considerados como alternativa en el tratamiento de infecciones causadas por *Staphylococcus*.

1. Bióloga, Integrante del Semillero SIEZ. Universidad de La Salle (Bogotá- Colombia).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1169-0994>
CvLac: https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0000069399

2. Docente Investigador Departamento de Ciencias Básicas, Grupo BIOMIGEN (Biología Molecular e Inmunogenética).
Universidad de La Salle (Bogotá- Colombia).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8723-0436>.
CvLac: https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0000948780

3. Docente Investigador Departamento de Ciencias Básicas, Grupo BIOMIGEN (Biología Molecular e Inmunogenética).
Universidad de La Salle (Bogotá- Colombia).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1730-9648>
CvLac: https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0000183695

Correo electrónico de correspondencia: phernandez@unisalle.edu.co

Palabras claves: conjuntivitis, actividad antimicrobiana, extractos de plantas, *staphylococcus*, infecciones

Abstract

Introduction. Bacterial conjunctivitis is one of the ocular infections with the highest rate of ophthalmic consultation, being the *Staphylococcus* genus the etiological agent that presents the greatest resistance to antibiotics. **Objective.** To determine the antimicrobial potential of medicinal plant extracts and their mixtures against bacteria associated with conjunctivitis. **Methods.** From plants such as *Belladonna*, *Calendula*, *Basil*, *Achiote* and *Romerillo*, ethanolic extracts were prepared and their antibacterial potential against *S. aureus* and *S. epidermidis* was evaluated by means of disk diffusion and tube dilution techniques. The effect of the mixtures was determined for the extract with the best activity and the antibiotic with the highest inhibition halo through the board technique. **Results.** It was found that the extract with the highest potential for *S. aureus* was that of annatto (leaves) with an inhibition halo of 13 mm and MICs of 15 mg / mL, while for *S. epidermidis* it was those of annatto leaves and fruits with halos of 16.6 and 9.6 mm and MICs of 15 and 30 mg / mL respectively. In relation to the combinations, the annatto extract and ciprofloxacin showed a partial synergistic effect for *S. aureus* with a CFI of 0.83 and an additive effect for *S. epidermidis* with a CFI of 1.84. **Conclusions.** This work constitutes the basis for future research aimed at the development of bioproducts for ocular use that can be considered as an alternative in the treatment of infections caused by *Staphylococcus*.

Keywords: conjunctivitis, antibacterial activity, plant extracts, *staphylococcus*, infection.

Introducción

La conjuntivitis es una de las enfermedades oculares más comúnmente consultadas, la cual consiste en la inflamación o infección de la conjuntiva cuyo origen puede ser de tipo infeccioso o no infeccioso (1). La conjuntivitis de tipo bacteriano es causada por estafilococos y estreptococos (2), entre los que se han reportado a *S. epidermidis* (43-48%), *S. aureus* (35-28%), *Streptococ-*

cus pneumoniae (4%) y *Corynebacterium sp.* (2%), entre otros (3,4)

Dentro de los protocolos establecidos para disminuir propagación de la infección, se recomienda el uso de tratamientos tópicos, acompañado de estrategias de educación al paciente sobre técnicas de limpieza (5). Este tipo de tratamientos preliminares, a pesar de tener una alta efectividad en casos no agudos tiene como desventaja el tiempo

prolongado del tratamiento, si se compara con el uso de antibióticos comerciales (6,7). Sin embargo, por tratarse de una infección altamente contagiosa, en la práctica clínica si el problema no se ha resuelto en tres días, se opta por la medicación con antibióticos como penicilina, amoxicilina, gentamicina, ciprofloxacina, rifampicina, vancomicina y eritromicina sin un estudio microbiológico previo (8). Esta situación junto a la falta de valoración por un profesional de la salud y la automedicación ha llevado a problemas de resistencia de los microorganismos frente a los antibióticos comerciales (9).

El género *Staphylococcus* en especial las cepas de *S. aureus* tienen un amplio rango de resistencia a los antibióticos, considerándoseles como resistentes y multiresistentes, como respuesta a la presión selectiva dada por los tratamientos antimicrobianos (10). Además teniendo en cuenta los efectos adversos generados en el paciente como afectaciones al sistema nervioso central y periférico y complicaciones neurológicas durante el tratamiento con ciertos antibióticos (11), se ha propuesto la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento, donde el uso de las plantas medicinales ha permitido conocer de manera general sus propiedades benéficas para el ser humano (12). Sin embargo, la actividad antimicrobiana en general es reducida si se compara con el efecto directo de los antibióticos; por tal razón, se han postulado nuevas estrategias como las combinaciones entre extractos y antibióticos donde se potencializa la actividad del extracto y se reducen los efectos

adversos de los antibióticos (13). Por todo lo anterior, es importante la realización de estudios basados en la evaluación del potencial antimicrobiano de extractos de plantas medicinales y sus mezclas frente a microorganismos asociados con conjuntivitis bacterianas como *S. epidermidis* y *S. aureus*

Materiales y métodos

Selección de plantas

Se realizó una búsqueda de las plantas que son utilizadas comúnmente en la medicina tradicional Latinoamericana, para el tratamiento de conjuntivitis o de infecciones oculares. (14-18). Para la selección de especies, se tuvieron en cuenta como criterios combinados a) frecuencia de citación mayor a tres en los documentos seleccionados, b) la no existencia de reportes de actividad antimicrobiana para extractos etanólicos de especies recolectadas en Colombia frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*. Las plantas que cumplieron con estos criterios fueron adquiridas en las plazas de mercado de Bogotá-Colombia. Con un ejemplar completo de cada especie se realizó la identificación taxonómica a través de las claves del Gentry (19) y con la colaboración del personal científico del herbario del Museo de La Salle (Colombia).

Obtención de extractos

El material vegetal limpio se secó en un horno a 37°C por 3 días. Posteriormente,

se procedió a moler aproximadamente 300 g del material y se sometió a maceración con etanol al 96% en una proporción 1:2 (peso-volumen), el solvente se removió por destilación a presión reducida y se determinó el rendimiento de extracción.

Evaluación de susceptibilidad de extractos y de tres antibióticos comerciales

Preparación del inóculo

Se usaron cepas de referencia *S. epidermidis* ATCC14990 y *S. aureus* ATCC 25923. El inóculo de cada bacteria se preparó tomando de 3 a 4 colonias de la cepa y se sembró con la técnica de estría en placas con Muller Hinton (MH) solidificado, incubando a 37°C por 24 h. Para cada uno de los ensayos, se partió de un inóculo con una absorbancia de 0,1 utilizando un espectrofotómetro Genesys a una longitud de onda de 600 nm (20).

Difusión en disco

El inóculo se sembró masivamente sobre medio MH solidificado. Posteriormente, sensidiscos de 6mm de diámetro fueron impregnados con 15µL de cada uno de los extractos a una concentración de 30 mg/mL disueltos en DMSO al 10%, y fueron distribuidos en las cajas de Petri (21). Los antibióticos empleados para evaluar la susceptibilidad fueron marca: Becton Dickinson col): Ciprofloxacina (5µg), Oxitetraciclina (30µg), Eritromicina (15µg). Después de 24 h de incubación se tomaron los diámetros de inhibición de crecimiento alrededor

de los sensidiscos (22). Este procedimiento se realizó por triplicado y se tuvo en cuenta controles de medio y solvente.

Dilución en tubo

Para determinar la CMI de los extractos y de los dos antibióticos que presentaron mayor halo de inhibición en difusión en disco, se realizaron diluciones seriadas (60 – 1,8 mg/mL en DMSO al 10% para los extractos y 4 - 0,015 mg/mL de solución salina para los antibióticos). Para lo cual, se incubó por 24 h 500 µL de cada uno de los tratamientos con 500µL de inóculo en caldo MH. Posteriormente se agregó 50 µL de resazurina a 2 mg/mL y después de 2 horas se realizó la lectura de susceptibilidad e inhibición. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y se emplearon controles del crecimiento bacteriano, medio y solvente (DMSO 10% y solución salina).

Evaluación de la interacción entre combinaciones

Para la evaluación se empleó la técnica del tablero para el extracto y el antibiótico con la menor CMI y (23). Para lo cual se realizó previamente la preparación de 36 mezclas en una microplaca, cuyas concentraciones tanto del extracto como del antibiótico varió desde el doble de la CMI a cuatro diluciones por debajo de esta cantidad. Así mismo se evaluó cada uno de los tratamientos por separado. Posteriormente, en cada uno de los pozos se adicionó 100 µL del inóculo en caldo MH y se incubó por 24 h a 37°C. Posteriormente, se usó 20 µL de una solu-

ción de resazurina a 2 mg/mL y se incubó por 24 h más. Adicionalmente, para corroborar los resultados, se realizó el método de García (24), en el cual 2 μ L de cada uno de los tratamientos se incubó durante 24 h para determinar el crecimiento o no de colonias bacterianas. La interpretación de los resultados se realizó mediante isobogramas y el cálculo del índice de concentración fraccionaria inhibitoria (Σ CFI) (23).

Análisis estadístico

Todos los resultados fueron expresados como el promedio de los ensayos por tripli-

cado, con su respectiva desviación estándar. Los datos fueron analizados usando el programa estadístico InfoStat y Excel.

Resultados

La Tabla 1 presenta los rendimientos de extracción para la obtención de los extractos, se observa un alto porcentaje en belladona seguido del extracto de caléndula.

Tabla 1. Porcentaje de rendimiento de extracción para las plantas seleccionadas.

Nombre común	Nombre científico	% de rendimiento
Caléndula	Calendula officinalis	29,44
Albahaca	Ocimum basilicum	12,26
Belladona	Atropa belladonna	34,30
Achiote hojas	Bixa Orellana	13,72
Achiote fruto	Bixa Orellana	23,10
Romerillo	Diplostephium rosmarinifolium	7,66

Fuente. Elaboración propia.

En la actividad antimicrobiana evaluada por difusión en disco se encontró que los mayores halos de inhibición fueron para el extracto de hojas de achiote frente a *S. aureus* y los de frutos y hojas de achiote para *S. epidermidis* (Tabla 2). En cuanto a las CMI de los extractos, la mayoría mostraron una acción inhibitoria a 30 mg/mL; sin embargo, se resalta que la CMI del extracto de hojas de achiote fue de 15 mg/mL para ambas

cepas bacterianas. El extracto de romerillo no presentó actividad antimicrobiana frente a ninguna de las dos cepas evaluadas. Los resultados de los antibiogramas permitieron determinar que todos antibióticos presentaron efecto inhibitorio frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*, siendo la ciprofloxacina el de mayor efectividad. Las CMI de los antibióticos muestran valores más bajos frente a *S. aureus* que para *S. epidermidis*.

Tabla 2. Resultados de inhibición de los extractos y antibióticos frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*.

Tratamiento	<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>	
	Diámetro de inhibición (mm)	CMI (mg/mL)	Diámetro de inhibición (mm)	CMI (mg/mL)
Belladona	NI	NI	7,17±0,15	30
Caléndula	9,31±0,11	30	NI	30
Albahaca	7,41±0,10	60	NI	30
Achiote hojas	14,19±0,11	15	13,92±0,1	15
Achiote frutos	8,15±0,2	30	10,16±0,05	30
Ciprofloxacina	27,58±2	0,12	36,04±1,5	2,0
Oxitetraciclina	28,96±2,5	0,5	6,74±0,1	ND
Eritromicina	24,02±1,2	ND	32,81±0,6	2,0

*NI: no presentó inhibición *ND: no se determinó

Fuente. Elaboración propia.

Evaluación del efecto sinérgico

El diseño experimental permitió determinar que la mezcla ciprofloxacina y el extracto de hojas de achiote presentó un valor de CFI 0,83 frente a *S. aureus* correspondiente a un efecto de sinergismo parcial o bajo y un CFI de 1,24 frente a *S. epidermidis* cuyo efecto

es aditivo. Esto fue corroborado mediante la elaboración de los isobogramas que se presentan en la figura 1 y 2, en los cuales se observa gráficamente el efecto sinérgico frente a *S. aureus*, mediante una línea cóncava que conecta los ejes X y Y, y un efecto indiferente para *S. epidermidis* representado por una línea casi recta.

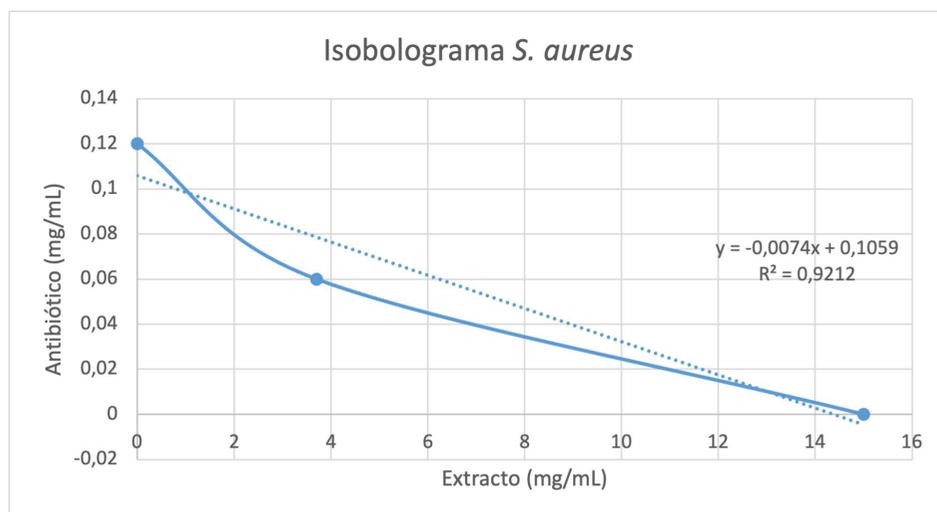
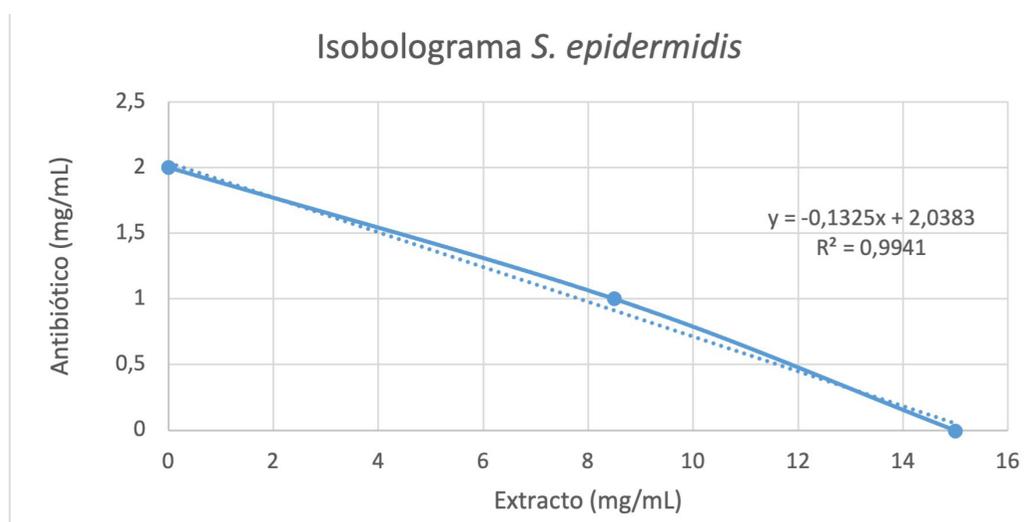
Figura 1. Isoblograma para la mezcla de ciprofloxacina con extracto de hojas de achiote frente a *S. aureus*.

Figura 2. Isoblograma para la mezcla de ciprofloxacina con extracto de hojas de achiote frente a *S. epidermidis*.



Discusión

Este estudio parte de la revisión de 54 plantas empleadas la medicina tradicional empleadas en el tratamiento de infecciones oculares y que permitió la selección de cinco de ellas (caléndula, albahaca, achiote, sauco y llantén). Los porcentajes de rendimientos para la obtención de los extractos etanólicos en general fue entre 7,6 y 34,3%, los cuales están acordes con lo reportado por otros autores. Por ejemplo, para *C. officinalis* los resultados de este estudio son superiores a los reportados previamente de 19,8 (25) y 19,5% (26) y cuyas diferencias pueden estar relacionadas con la época de recolección, ya que los cambios estacionales y las condiciones del suelo generan en la planta un estrés oxidativo que produce cambios en la producción de los metabolitos (27). Para albahaca, achiote, sauco y llantén no se ha realizado extracciones con etanol o es el primer

reporte de estudios fitoquímicos, por lo que no pueden ser comparados al no emplear el mismo solvente.

Los resultados de actividad antimicrobiana permitieron establecer que los extractos con mayor potencial inhibitorio frente a las dos cepas seleccionadas fueron el extracto de hojas de achiote (13mm para *S. aureus* y 16,6mm frente a *S. epidermidis*), seguido por el del fruto de achiote (9,6mm frente a *S. epidermidis*), a 30 mg/mL como la máxima concentración evaluada, con el fin de evitar que su actividad no estuviera asociada a su toxicidad (28). Así mismo, se obtuvieron como CMI's de 30 mg/mL para casi todos los extractos, a excepción del extracto hojas de achiote con 15 mg/mL para las dos cepas bacterianas.

C. officinalis es la especie que presenta el mayor número de reportes de evaluación de actividad antimicrobiana frente a cepas

del género *Staphylococcus*, variando los resultados de un estudio a otro. Para esta especie, se han reportado resultados previos de halos de inhibición de 28 mm (25) y 18 mm (29,30), para los extractos etanólico y metanólico respectivamente. Sin embargo, también hay reportes en los cuales esta especie no ha presentado actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* (26,31). La diferencia en los resultados, posiblemente se debe a la cantidad de extracto que fue utilizada para impregnar los discos, por el solvente de extracción, así como el lugar de procedencia del material vegetal (32). Las CMI concuerda con el obtenido por Roopashree y colaboradores (26), que reporta un valor de CMI de 32mg/mL, siendo cercano al obtenido en esta investigación.

Para la especie *O. basilicum* sólo existe un reporte CMI, el valor fue superior a lo reportado previamente para el etanólico (CMI: 4mg/mL)(33). En el caso de *B. orellana* se reporta una inhibición parcial del extracto de etanol/diclorometano frente a la cepa *S. aureus* (34). Adicionalmente, hay dos reportes, que coinciden entre ellos y en los cuales la CMI es de 1,28 mg/mL (33), pero inferiores con lo reportado en este estudio, lo que puede estar relacionado con el solvente de extracción utilizado (metanol), un solvente más polar que el empleado en el presente estudio. Para el extracto de *A. belladonna* existe un reporte cuyo valor de halo de inhibición fue de 1,2mm frente a *S. aureus* (35), resultado tan bajo que permitiría confirmar que esta especie no posee actividad frente a *S. aureus*, como se determinó

en este estudio. Finalmente, para la especie *D. rosmarinifolium* no hay reportes de estudios de actividad antimicrobiana frente a las dos bacterias empleadas.

Se conoce ampliamente el potencial antimicrobiano frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas (33) de especies de la familia Asteraceae, a la cual pertenece *C. officinalis* siendo consistente con los resultados previos reportados para otras especies como *Artemisia absinthium* (36) y *Baccharis dracunculifolia* (37), que han mostrado inhibición principalmente frente a *S. aureus*. El potencial de las especies de esta familia, ha sido asociado a la presencia de flavonoides, aceites volátiles y compuestos poliacetilénicos, diterpenos y ácidos fenólicos (38). Aunque ya se ha reportado el aislamiento de algunos compuestos para *C. officinalis* (26,30), *O. Basilicum* (39,40) y *B. orellana* (41), a ninguno en particular se ha atribuido los efectos antimicrobianos por lo que es importante continuar con la realización de estudios biodirigidos que permitan identificar cuáles son moléculas responsables de la actividad que presentaron las especies objeto de este estudio.

Los antibióticos seleccionados como controles para este estudio, mostraron sensibilidad frente a las cepas *S. aureus* y *S. epidermidis* de acuerdo a los patrones establecidas por CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) (42) y EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (43), y frente a la misma cepa de referencia *S. aureus* 25923, donde

se reporta para la ciprofloxacina un halo de inhibición 32mm (44) acorde al obtenido con el de la presente investigación y uno de 42mm (25), que aunque es superior, esta diferencia puede estar relacionada con la cantidad del antibiótico en el sensidisco (4500µg). En cuanto a las CMI para estos antibióticos frente a *S. epidermidis* se han reportado valores para la ciprofloxacina y la eritromicina de 0,25 mg/mL (45), y para el primer antibiótico otro reporte de 0,125 mg/mL (46). Para *S. aureus*, se reportan valores de CMI para la ciprofloxacina de 1,2 mg/mL (47), 0,024 mg/mL (48) y 0,5 µg/mL (49), siendo el resultado obtenido en el presente estudio un valor intermedio a los estudios previos, y cuyas diferencias pueden ser explicadas debido a la concentración del inóculo empleados en los ensayos, a la marca del antibiótico empleado o incluso al tipo de procedencia de la cepa de referencia (50).

A pesar del potencial antibacteriano que presentan las plantas medicinales frente a algunas cepas bacterianas, estas no son frecuentemente utilizadas, debido a las altas concentraciones necesarias para la inhibición de los microorganismos, la susceptibilidad a la degradación y las reacciones adversas que pueden aparecer si se emplean en dosis inadecuadas o por períodos prolongados (51). Sin embargo, el uso de mezclas de extractos con antibióticos, ofrece como ventajas la conservación del efecto del antibiótico, pero a su vez la disminución de los efectos secundarios, costos y de los casos de resistencia que se presentan frente a los me-

dicamentos comerciales. A partir de la evaluación de la mezcla de ciprofloxacina con extracto de hojas de achiote, se encontró un efecto de sinergismo parcial frente a *S. aureus* y un efecto aditivo frente a *S. epidermidis*, siendo este estudio el primer reporte del uso de esta mezcla en evaluaciones del tipo de interacciones que se presentan. Sin embargo, este tipo de estrategias también han sido evaluadas previamente para mezclas de otros extractos con ciprofloxacina, tales es el caso de *Platycarpha glomerata* que también presenta dos efectos diferentes, un efecto antagónico para el extracto de hojas frente a *S. aureus* 25925 (CFIs 2,5) y un efecto sinérgico al emplear el extracto de rizoma (CFIs 0,1) (44). Para la mezcla de *Ansellia africana* con este mismo antibiótico se obtuvo un efecto antagónico (CFI de 1,5) frente a *S. aureus* 14468.

Para otros antibióticos se ha establecido un efecto sinérgico al combinar el extracto etanólico de romero con cefuroxima frente a una cepa meticilino-resistente de *S. aureus*. (CFI de 0,62) (52), o el demostrado por ampicilina y *Cuspidaria convoluta* con valores de CFI entre 0.125 y 0.5 frente a una cepa de *S. aureus* y una multi-resistente (53). Sin embargo, también es posible encontrar efecto antagonista, como lo reportado para la mezcla entre vancomicina y el extracto de *Boesenbergia rotunda* para *S. aureus* 20651 cuya CFI fue de 1,02; mientras que se presentó un efecto aditivo frente a las cepas *S. aureus* 20652, *S. aureus* 29213 y *S. epidermidis* 14932, con un valor de CFI de 1 (54).

Conclusion

La mayoría de los extractos mostraron actividad frente a *S. aureus* a excepción de Belladona. Por el contrario, para *S. epidermidis* el número de extractos con actividad fue menor, solo belladona y achiote mostraron inhibición. Finalmente, la mezcla de ciprofloxacina con extracto de hojas de achiote frente a *S. aureus* mostró un efecto de sinergismo parcial, mientras que la misma mezcla presentó un efecto aditivo para *S. epidermidis*. En este sentido, el uso de los extractos de plantas como achiote podrían hacer parte de terapias alternativas para el tratamiento de infecciones oculares causadas por estas bacterias. Igualmente, la aplicación de evaluaciones sinérgicas entre sustancias es una alternativa que puede ser positiva de acuerdo a la interacción entre los tratamientos utilizados.

Agradecimiento:

Al personal científico del Museo de La Salle por su colaboración en la identificación en el material vegetal y al Departamento de Ciencias Básicas de Universidad de La Salle por el préstamo de los equipos empleados en este estudio. Adicionalmente, al Centro de Investigación en Salud y Visión (CISVI) y la Vicerrectoría de Investigación y Transferencia de la Universidad de La Salle por la financiación del proyecto.

Rol de los autores:

Los autores LP y PHR aportaron en toda la parte del diseño experimental, verificación

de los resultados y en general en el análisis de estos, siendo un aporte esencial en la construcción del documento final. WV se encargó de la parte experimental del estudio y de la búsqueda de información asociada a la selección del material y la necesaria para la construcción de la discusión de los resultados.

Conflicto de intereses:

Los autores no incurren en conflictos de intereses.

Fuentes de Financiamiento:

Financiado por Centro de Investigación en Salud y Visión (CISVI) y la Vicerrectoría de Investigación y Transferencia de la Universidad de La Salle, bajo el macroproyecto “Diseño de un prototipo de antifaz herbal con uso potencial para la conjuntivitis bacteriana”.

Referencias

1. Alfonso SA, Fawley JD, Lu XA. Conjunctivitis. Prim Care - Clin Off Pract. 2015;42:4543.
2. Viliani F, Edelstein M, Buckley E, Llamas A, Dar O. Mining and emerging infectious diseases: Results of the Infectious Disease Risk Assessment and Management (IDRAM) initiative pilot. Extr Ind Soc [Internet]. 2017;4(2):251–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exis.2016.08.009>
3. Khalil RM, Abdelbary GA, Basha M, Awad GEA, el-Hashemy HA. Enhancement of lomefloxacin Hcl ocular efficacy via niosomal encapsulation: in vitro characterization and in vivo evaluation. J Liposome Res. 2017;27(4):312–23.

4. Ndam LM, Mih AM, Tening AS, Fongod AGN, Temenu NA, Fujii Y. Phytochemical analysis, antimicrobial and antioxidant activities of *Euphorbia golondrina* L.C. Wheeler (Euphorbiaceae Juss.): an unexplored medicinal herb reported from Cameroon. *Springerplus*. 2016;5(1).
5. Everitt HA, Little PS, Smith PWF. A randomised controlled trial of management strategies for acute infective conjunctivitis in general practice. *Br Med J*. 2006;333(7563):321–4.
6. Visscher KL, Hutnik CML, Thomas M. Evidence-based treatment of acute infective conjunctivitis: Breaking the cycle of antibiotic prescribing. *Can Fam Physician*. 2009;55(11):1071–5.
7. Swe Swe-Han K, Mlisana KP, Pillay M. Analysis of clinical and microbiological data on *Acinetobacter baumannii* strains assist the preauthorization of antibiotics at the patient level for an effective antibiotic stewardship program. *J Infect Public Health* [Internet]. 2017;10(5):608–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2017.01.014>
8. Soliman OAE-A, Mohamed EAM, El-Dahan MS, Khatera NAA. Potential Use of Cyclodextrin Complexes for Enhanced Stability, Anti-inflammatory Efficacy, and Ocular Bioavailability of Loteprednol Etabonate. *AAPS PharmSciTech* [Internet]. 2016;18(4). Available from: <http://dx.doi.org/10.1208/s12249-016-0589-9>
9. Khameneh B, Diab R, Ghazvini K, Fazly Bazzaz BS. Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. *Microb Pathog* [Internet]. 2016;95:32–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.02.009>
10. Carreras B. Análisis bacteriológicos en el tratamiento de las conjuntivitis. Comparación de la resistencia a antibióticos entre 1982 y 2008. *Arch Soc Esp Oftalmol* [Internet]. 2012;87(4):107–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oftal.2011.11.017>
11. Esposito S, Canevini MP, Principi N. Complications associated with antibiotic administration: neurological adverse events and interference with antiepileptic drugs. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2017;50(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.01.027>
12. Petrovska B. Historical review of medicinal plants usage. *Pharmacogn Rev* [Internet]. 2012;6(11):1. Available from: <http://www.phcogrev.com/text.asp?2012/6/11/1/95849>
13. Tres jota c. Interacción entre fármacos y plantas medicinales. *An Sis San Navarra* [Internet]. 2006;29(2):1–12. Available from: <http://www.zcommunications.org/naked-imperialism-by-john-bellamy-foster>
14. Fonnegra, G. R.; Jiménez RSL. Plantas Medicinales Aprobadas en Colombia. Universidad de Antioquía. 2007;371.
15. Social. M de la P. Vademécum Colombiano de Plantas Medicinales. 2008;2008.
16. Arango M. Plantas medicinales: botánica de interés médico. Editorial Artes Gráficas Tizán. Colombia; 2006.
17. Gupta MP. 270 plantas medicinales iberoamericanas. P I D C y Tecnol C A Bello. 1995;1–576.
18. García Barriga H. Flora medicinal de Colombia: botánica medica. 1974. p. 99.
19. Gentry A. A Field Guide to the Families and Genera of Woody Plants of Northwest South America (Colombia, Ecuador, Peru). 1996;895.
20. Dias-Souza MV, dos Santos RM, Cerávolo IP, Cosenza G, Ferreira Marçal PH, Figueiredo FJB. Euterpe oleracea pulp extract: Chemical analyses, antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus*, cytotoxicity and interference on the activity of antimicrobial drugs. *Microb Pathog* [Internet]. 2018;114(November 2017):29–35. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.006>

21. Chakraborty S, Afaq N, Singh N, Majumdar S. Antimicrobial activity of *Cannabis sativa*, *Thuja orientalis* and *Psidium guajava* leaf extracts against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Integr Med* [Internet]. 2018;16(5):350–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2095496418300815>
22. Ali Y, Islam MA, Muzahid NH, Sikder MOF, Hosain MA, Marzan LW. Characterization, prevalence and antibiogram study of *Staphylococcus aureus* in poultry. *Asian Pac J Trop Biomed* [Internet]. 2017;7(3):253–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.12.001>
23. Shi C, Zhao X, Meng R, Liu Z, Zhang G, Guo N. Synergistic antimicrobial effects of nisin and p-Anisaldehyde on *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. 2017;84:222–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.056>
24. García Beltrán JM, Espinosa C, Guardiola FA, Esteban MÁ. In vitro effects of *Origanum vulgare* leaf extracts on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes, cytotoxic, bactericidal and antioxidant activities. *Fish Shellfish Immunol* [Internet]. 2018;79(April):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.05.005>
25. 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* [Internet]. 2012;18(3):173–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctcp.2012.02.003>
26. Roopashree TS, Dang R, Shobha Rani RH, Narendra C. Antibacterial activity of antipsoriatic herbs: *Cassia tora*, *Momordica charantia* and *Calendula officinalis*. *Int J Appl Res Nat Prod*. 2008;1(3):20–8.
27. Isah T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biol Res*. 2019;52(1):39. Published 2019 Jul 29. doi:10.1186/s40659-019-0246-3
28. Lagarto A, Bueno V, Guerra I, Valdés O, Vega Y, Torres L. Acute and subchronic oral toxicities of *Calendula officinalis* extract in Wistar rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2011;63(4):387–91.
29. Farjana A, Md. NZ, Kabir S. Antimicrobial activity of medicinal plant leaf extracts against pathogenic bacteria. *Asian Pacific J Trop Dis*. 2014;4(14):S920–3.
30. Meziou-Chebouti N, Merabet A, Behidj N, Bissadd F, Mokadem A, Akkacha N. Antimicrobial Activity of Phenolic Extracts of Flowers *Calendula Officinalis* Cultivated in Algeria. 14th SGEM Geo-Conference Water Resour For Mar Ocean Ecosyst [Internet]. 2014;2:319–324 pp. Available from: <http://dx.doi.org/10.5593/SGEM2014/B32/S14.043%0Ahttps://sgemworld.at/sgemlib/spip.php?article4489>
31. Vora J, Srivastava A, Modi H. Antibacterial and antioxidant strategies for acne treatment through plant extracts. *Informatics Med Unlocked* [Internet]. 2017;(October):1–5. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352914817302010>
32. Ortiz DM, Posada SL, Noguera RR. Efecto de metabolitos secundarios de las plantas sobre la emisión entérica de metano en rumiantes. *Livest Res Rural Dev*. 2014;26(11).
33. Sharma A, Flores-Vallejo R del C, Cardoso-Taketa A, Villarreal ML. Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2017;208:264–329. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.04.045>
34. Chariandy CM, Seaforth CE, Phelps RH, Pollard G V., Khambay BPS. Screening of medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties. *J Ethnopharmacol*. 1999;64(3):265–70.

35. Munir N, Iqbal AS, Altaf I, Bashir R, Sharif N, Saleem F, et al. Evaluation of antioxidant and antimicrobial potential of two endangered plant species *Atropa belladonna* and *Matricaria chamomilla*. *African J Tradit Complement {&} Altern Med*. 2014;11:111–7.
36. Cruz-Galvez AM, Gómez-Aldapa CA, Villagómez-Ibarra JR, Chavarría-Hernández N, Rodríguez-Baños J, Rangel-Vargas E, et al. Antibacterial effect against foodborne bacteria of plants used in traditional medicine in central Mexico: Studies in vitro and in raw beef. *Food Control [Internet]*. 2013;32(1):289–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.018>
37. Oliveira DF, Pereira AC, Figueiredo HCP, Carvalho DA, Silva G, Nunes AS, et al. Antibacterial activity of plant extracts from Brazilian southeast region. *Fitoterapia*. 2007;78(2):142–5.
38. Bouasla A, Bouasla I. Ethnobotanical survey of medicinal plants in northeastern of Algeria. *Phytomedicine*, 2017, vol. 36, p. 68-81.
39. Al-Abbasy DW, Pathare N, Al-Sabahi JN, Khan SA. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil isolated from Omani basil (*Ocimum basilicum* Linn.). *Asian Pacific J Trop Dis*. 2015;5(8):645–9.
40. Opalchenova G, Obreshkova D. Comparative studies on the activity of basil--an essential oil from *Ocimum basilicum* L.--against multidrug resistant clinical isolates of the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by using different test methods. *JMicrobiolMethods*. 2003;54(1):105–10.
41. Paredes Medina A, Perez Ortiz Z, Palacios Rosales V. Determinación de la actividad antimicrobiana de los frutos del *Bixa orellana* L. en cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* y *Klebsiella pneumoniae*. *Univ Nac Auton Nicar*. 2004;1:1–61.
42. CLSI. Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twent Informational Suppl. 2010;M100-S20.
43. Van den Driessche, F., Brackman, G., Swimberghe, R., Rigole, P., & Coenye T. Screening a repurposing library for potentiators of antibiotics against *Staphylococcus aureus* biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;49:315–20.
44. Penduka D, Mthembu W, Cele KH, Mosa RA, Zobolo AM, Opoku AR. Extracts of *Ansellia africana* and *Platycarpha glomerata* exhibit antibacterial activities against some respiratory tract, skin and soft tissue infections implicated bacteria. *South African J Bot [Internet]*. 2018;116:116–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.02.403>
45. Peeters L, Argudín M, Azadikhah S, Butaye P. Antimicrobial resistance and population structure of *Staphylococcus aureus* recovered from pigs farms. *Vet Microbiol*. 2015;180(1–2):151–6.
46. Kadry AA, Tawfik AKF, Abu El-Asrar AA, Shibl AM. Elucidation of antibiotic effectiveness against *Staphylococcus epidermidis* during intraocular lens implantation. *Int J Antimicrob Agents*. 2001;18(1):55–9.
47. Osonwa UE, Ugochukwu JI, Ajaegbu EE, Chukwu KI, Azevedo RB, Esimone CO. Enhancement of antibacterial activity of ciprofloxacin hydrochloride by complexation with sodium cholate. *Bull Fac Pharmacy, Cairo Univ [Internet]*. 2017;55(September):0–1. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1110093117300443>
48. Choi JG, Choi JY, Mun SH, Kang OH, Bharaj P, Shin DW, et al. Antimicrobial activity and synergism of Sami-Hyanglyun-Hwan with ciprofloxacin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Asian Pac J Trop Med [Internet]*. 2015;8(7):538–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtm.2015.06.010>
49. Wang D, Lu C, Sun F, Cui M, Mu H, Duan J, et al. A tanshinone I derivative enhances the activities of antibiotics against *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo. *Res Microbiol [Internet]*. 2017;168(1):46–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2016.08.002>

50. Obaidat M, Roess A, Mahasneh A, Al-Hakimi R. Antibiotic-resistance, enterotoxin gene profiles and farm-level prevalence of *Staphylococcus aureus* in cow, sheep and goat bulk tank milk in Jordan. *Int Dairy J* [Internet]. 2018;81:28–34. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.02.001>
51. Posadzki P, Watson L, Ernst E. Adverse effects of herbal medicines: an overview of systematic reviews. *Clinical medicine*, 2013, vol. 13, no 1, p. 7.
52. Naser J, Awni Abu-Hijleh K. Antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. alone and in combination with cefuroxime against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [Internet]. Vol. 3, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2010. p. 121–3. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1995764510600491>
53. Torres CA, Nuñez MB, Isla MI, Castro MP, Gonzalez AM, Zampini IC. Antibacterial synergism of extracts from climbers belonging to Bignoniaceae family and commercial antibiotics against multi-resistant bacteria. *J Herb Med* [Internet]. 2017;8:24–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hermed.2017.02.002>
54. Teethaisong Y, Pimchan T, Srisawat R, Hobbs G, Eumkeb G. *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. extract potentiates the antibacterial activity of some β -lactams against β -lactam-resistant staphylococci. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 2018;12:207–13. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.10.019>