

REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA  
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
MÉRIDA EDO. MÉRIDA

**COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE  
ESENCIAL DE LA *Tithonia diversifolia* (HEMSL.) A. GRAY (ASTERACEAE)  
CONTRA CEPAS DE REFERENCIA ATCC**

(Trabajo de Grado para optar al Título de Licenciada en Bioanálisis)

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

Autora: María A. Villegas Moreno

Tutora: M. Sc. Silvana B. Villarreal R.

Cotutor: Dr. Luis B. Rojas Fermín

OCTUBRE, 2019

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por ser el fundamento en mi vida y forjar en mí un carácter comprometido a crecer y alcanzar las metas.

Por el apoyo incondicional que me brindaron cada día mis padres y mi familia con ese apoyo que es incondicional.

A mis profesores por la notable preparación en las aulas de clases en los años de estudio.

A mí querida y estimada tutora profesora Silvana Villarreal R., por la paciencia y dedicación que me tuvo durante el proceso de elaboración de mi Tesis de Grado.

A mi cotutor el profesor Luis B. Rojas Fermín por todo su apoyo, guía, conocimientos compartido. Gracias por ser parte fundamental en esta investigación.

A la profesora Yndra Cordero de Rojas, por toda su colaboración.

Al Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (IIFFB) de la Universidad de Los Andes, y todas las personas que allí hacen vida, por su colaboración.

María A. Villegas M.

## DEDICATORIA

Le dedico esta tesis en primer lugar a Dios que me ha dado la oportunidad de vivir, y que me ha regalado una familia, que me ha apoyado en el día a día de mi vida para conseguir mis metas y realizar mis sueños.

Dedicado a mis padres, que me dieron su apoyo y que han estado a cada momento a mi lado, apoyándome para no rendirme en el camino de alcanzar mis metas en mis estudios profesionales con sus consejos y motivaciones.

María A. Villegas M.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ÍNDICE GENERAL

	pp.
LISTA DE CUADROS.	
LISTA DE ESQUEMAS.	
LISTA DE TABLAS.	
LISTA DE FIGURAS.	
LISTA DE GRÁFICOS.	
RESUMEN.	
INTRODUCCIÓN.	
CAPÍTULOS	
I. Planteamiento del Problema.....	3
Objetivos de la Investigación.	
Objetivo General.....	7
Objetivos Específicos.....	7
Justificación de la Investigación.....	8
II. Marco Teórico Referencial.	
Antecedentes de Trabajos Previos.....	10
Antecedentes Históricos Epistemológicos.....	14
Bases Teóricas.	
Aceites Esenciales.....	16
Propiedades Generales de los Aceites Esenciales.....	17
Uso de los Aceites Esenciales.....	17
Composición Química de los Aceites Esenciales.....	18
Proceso de Obtención de los Aceites Esenciales.....	23
Análisis de la Composición de los Aceites Esenciales.....	26
Actividad Farmacológica de los Aceites Esenciales.....	27
Actividad Antibacteriana.....	27
Bacterias Gram positivas.....	29
Género <i>Staphylococcus</i> .....	29
Género <i>Enterococcus</i> .....	30

Bacterias Gram negativa.....	30
Género <i>Escherichia</i> .....	31
Género <i>Klebsiella</i> .....	31
Género <i>Pseudomonas</i> .....	31
Mecanismo de Acción de los Agentes Antibacterianos.....	32
Mecanismos de Resistencia Bacteriana.....	34
Familia Asteraceae.....	36
Descripción Botánica de la Familia Asteraceae.....	37
Distribución Geográfica de la Familia Asteraceae.....	38
Usos Generales de la Familia Asteraceae.....	38
Género <i>Tithonia</i> .....	40
Especie <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray.....	41
Características Botánicas de la <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray.....	41
Nombres Comunes <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray.....	42
Composición Química de la Especie <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray.....	43
Hipótesis de la Investigación.....	45
Operacionalización de las Variables.....	46
I. Marco Metodológico.....	48
Enfoque de la Investigación.....	48
Tipo y Diseño de la Investigación.....	48
Población y Muestra.....	49
Procedimientos de la Investigación.	
Extracción del Aceite Esencial de la Especie <i>Tithonia diversifolia</i> .....	50
Técnica para la Caracterización de los Compuestos Volátiles del Aceite Esencial de la Especie <i>Tithonia diversifolia</i> .	
Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas.....	50
Cálculo de los Índices de Kováts.....	51

Prueba de Susceptibilidad Antibacteriana.....	52
Método de Difusión en Agar con Discos.....	52
Concentración Inhibitoria Mínima.....	54
Organización de la Información.....	54
IV. Resultados Y Discusiones.....	56
V. Conclusiones y Recomendaciones.....	65
REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS.....	67

## LISTA DE CUADROS

Cuadros	pp.
1 Componentes Mayoritarios Aislados de las Partes Aéreas de <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray.....	13
2 Molécula de Isopreno.....	20
3 Ejemplos de Monoterpenos.....	21
4 Ejemplos de Sesquiterpenos.....	22
5 Ejemplos de Derivados del Fenil Propano.....	23
6 Compuestos Derivados de la <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray.....	44

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquemas	pp.
1 Metabolitos Secundarios de los Aceites Esenciales.....	19
2 Clasificación Taxonómica de la Familia Asteraceae.....	37
3 Clasificación Taxonómica de la <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray.....	42
4 Obtención de los Aceites Esenciales de <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray.....	51
5 Análisis Microbiológico y Lectura de los Halos de Inhibición.....	54
6 Camino Metodológico.....	55

## LISTA DE TABLAS

Tablas	pp.
1 Propiedades Farmacológicas de Algunos Aceites Esenciales.....	28
2 Mecanismo de Acción de los Agentes Antibacterianos.....	33
3 Operacionalización de las Variables.....	47
4 Microorganismos y Compuestos de Referencia Usados en la Prueba de Susceptibilidad Antibacteriana.....	53
5 Componentes del Aceite Esencial de las Hojas de la <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray.....	58
6 Componentes del Aceite Esencial de las Flores de la <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray.....	58
7 Ensayo Preliminar de los Aceites Esenciales Puros de la <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray.....	62
8 Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de las Flores de la <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray.....	64

## LISTA DE FIGURAS

Figuras	pp.
1 Bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	29
2 Estructura de las Bacterias Gram negativas y Gram positivas.....	36
3 Distribución Geográfica de la Familia Asteraceae.....	38
4 Planta <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae).....	49
5 Voucher <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae).....	49
6 Cromatograma del Aceite Esencial de las Hojas de la <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray.....	57
7 Cromatograma del Aceite Esencial de las Flores de la <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray.....	57

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráficos	pp.
1 Principales Componentes del Aceite Esencial de las Hojas de <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray.....	13
2 Principales Componentes del Aceite Esencial de las Flores de <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray.....	20

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS

COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE  
ESENCIAL DE LA *Tithonia diversifolia* (HEMSL.) A. GRAY (ASTERACEAE)  
CONTRA CEPAS DE REFERENCIA ATCC  
(Trabajo de Grado)

Autora: María A. Villegas Moreno  
Tutora: M Sc. Silvana B. Villarreal Rivas  
Cotutora: Dr. Luis B. Rojas Fermín

## RESUMEN

El género *Tithonia* cuenta con más de 10 especies, es originario de Centroamérica pero se encuentra ampliamente distribuido en el área tropical de diferentes continentes; este género es frecuente en Venezuela, tanto en jardines como plantas semi-silvestres, y pueden hallarse en zonas cálidas como en zonas de clima templado, se han hecho diversos estudios donde se contemplan la actividad antibacteriana de los extractos y aceites esenciales de miembros de la familia Asteraceae y específicamente del género *Tithonia*. Por lo tanto se realizó la extracción del AE por el método de Hidrodestilación utilizando la trampa de Clevenger de las hojas y flores de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, donde se obtuvo 1,2 mL de aceite a partir 1 kg de hojas y 0,6 mL de aceite en relación a 1,320 kg de flores y se caracterizó por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM), lográndose identificar como componentes mayoritarios:  $\alpha$ -pineno (54,44 %), limoneno (19,26 %), trans- $\beta$ -ocimeno (10,90 %),  $\alpha$ -farneseno (4,17 %) y el sabineno (4,03 %) para las hojas; y el  $\alpha$ -pineno (53,55 %), limoneno (11,57 %), 2-4-hexadienal (8,99%), trans- $\beta$ -ocimeno (4,42 %), 1,8-cineol (3,68 %),  $\alpha$ -farneseno (3,17 %) y el terpineol (3,05 %) para las flores. La actividad antibacteriana se determinó por el método de difusión en agar con disco, frente a bacterias de referencia internacional *Staphylococcus aureus* (ATCC 27923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). El AE de las flores de *T. diversifolia* inhibió el crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* con una CIM de 12,5 ppm y de *Enterococcus faecalis* con una CIM de 50 ppm.

**Palabras claves:** Asteráceas, *Tithonia diversifolia*, aceites esenciales, actividad antibacteriana.

## INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas con fines curativos se remontan desde los orígenes del hombre, llevando al mismo al descubrimiento de las características poseídas por cada planta, dichos conocimientos han sido transmitidos al pasar de los años despertando así la curiosidad de los investigadores, produciéndose el nacimiento de diversas interrogantes sobre las plantas, en cuanto a que sustancias le conferían la capacidad de curar una enfermedad, y cuales las hacían tóxicas (Domínguez, 1973).

El desarrollo de tecnología y metodología de extracción y separación de compuestos químicos hicieron posible identificar la composición de diversas plantas; entre estos: terpenos y diversos compuestos aromáticos. Con respecto a los aceites esenciales, resinas, extractos y especias son conocidos y utilizados desde tiempos remotos en un gran número de aplicaciones, perfumes, medicinas, cosméticos y otros. Existen diversos manuscritos egipcios, chinos y alrededor de 200 citas en la biblia relacionadas con el empleo de estas sustancias (Ortuño, 2006).

El motivo por el cual se realizó esta investigación, fue para compilar información referente a la amplitud que representa el estudio de los productos naturales. Es por esta razón que se pretendió aportar conocimientos acerca de una familia tan importante para el hombre como es la Asteraceae, esta familia posee cerca de 1500 géneros y unas 23000 especies, que comprenden individuos perfectamente adaptados a vivir en zonas alpicas de las montañas, como en zonas desérticas (Do Rosio & Bonissoni, 2012). También es conocida por sus propiedades terapéuticas, cosméticas y aromáticas, entre las principales actividades biológicas de sus especies, resalta las propiedades antihelmínticos, antiinflamatorios, astringentes, colestéricos, antihemorrágicos, antimicrobianos, antioxidantes, diuréticos, analgésicos y antiespasmódicos (Ferreira *et al.*, 2019).

Entre los individuos pertenecientes a esta familia el estudio se enfocó en la especie *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray también conocida como botón de oro, la

cual se ha reportado efectos antiinflamatorios, antibacterianos, antiparasitarios, antitumoral, antioxidante, antimicrobial y antileucémico (Izco, 2004; Do Rosio & Bonissoni, 2012; Fabri *et al.*, 2011; Agboola *et al.*, 2016).

Asimismo, análisis de la composición química del extractos de la especie *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray han revelado la presencia de compuestos etanólicos, y terpenos que forman parte de los aceites esenciales; los extractos mostraron poseer actividad contra cepas bacterianas grampositivas como *Staphylococcus aureus* y cepas gramnegativas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Shigella*; de igual modo actividad contra la *Candida albicans*, pero las investigaciones muestran que dicho desempeño no llega a un porcentaje lo suficientemente significativo; de igual modo no debe dejarse de lado el hecho de que se ha trabajado con los extractos obtenidos de la planta, y que al utilizar el aceite esencial de la misma estos resultados pueden variar o no significativamente (Kareru *et al.*, 2010; Cruz & Vela, 2011).

Por su parte, la resistencia a antibióticos comerciales constituye uno de los problemas más serios y generalizados en el mundo, tanto en hospitales como en comunidades y provoca una mortalidad elevada cada año. El uso inapropiado de estos fármacos es el factor que más influye en la resistencia a antibióticos, lo que hace ineficaces y costosos los tratamientos médicos y pueden conllevar a la muerte del paciente (Munita & Arias, 2016). La búsqueda de nuevas plantas con valores medicinales permite incrementar el conocimiento sobre las propiedades invaluable de muchas especies vegetales y su uso para el tratamiento de numerosas patologías (Ekaluo *et al.*, 2015). Algunos autores plantean que los aceites con un alto porcentaje de compuestos monoterpénicos poseen significativas propiedades antimicrobianas (Benites *et al.*, 2011).

Debido a lo anteriormente descrito, en la presente investigación se planteó determinar la composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas y flores de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae) contra cepas de referencia ATCC.

## CAPÍTULO I

### EL PROBLEMA

#### Planteamiento del Problema

En las últimas décadas se ha observado el uso indiscriminado de antibióticos, lo que ha provocado la aparición de clonas multirresistentes en ambientes hospitalario y en la comunidad. Asimismo, la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos no han probado nuevas moléculas antibióticas, en un momento en el cual la falla a tratamiento se manifiesta con inaceptable frecuencia en la forma de un mayor costo económico y en vidas humanas (Rocha *et al.*, 2015).

Por su parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en su plan de acción contra el crecimiento de la resistencia a los antibióticos ha propuesto: generar y compartir información epidemiológica; aplicación de medidas de prevención de infecciones; optimizar el uso de antibióticos a través del desarrollo de políticas nacionales y globales sobre el consumo y producción de antibióticos; restricciones sobre el consumo de antibióticos como promotores del crecimiento en ganado, y un uso razonado para el consumo humano. Además de estímulos para seguir con el estudio y desarrollo en el área buscando nuevas alternativas terapéuticas (De León-Rosales *et al.*, 2015; Rocha *et al.*, 2015).

En lo que respecta, a la resistencia antibiótica puede definirse como la capacidad de un microorganismo para sobrevivir en presencia de un compuesto tóxico (antibiótico o antiséptico), permitiendo que las bacterias se multipliquen en presencia del fármaco (Da Silva & Domínguez, 2016). Esta capacidad de resistencia bacteriana cobra importancia a nivel mundial en el área de salud pública por su efecto en el control de

enfermedades y su impacto en las limitaciones terapéuticas, restringiendo la capacidad de fármacos disponibles, lo que ha prolongado los estadías de hospitalización, aumentando costos médicos e incluso generando mortalidad (Troncoso *et al.*, 2017).

Por lo tanto, el surgimiento de cepas resistentes a antibióticos ha resultado en un serio problema de salud, obligando a la búsqueda de nuevas fuentes, encontrándose en los aceites esenciales un alto potencial para ello. Estos resultados hacen relevante el estudio de los aceites esenciales debido a la importancia que tienen para la industria farmacéutica y de alimentos. El estudio científico de las plantas medicinales es una fuente relevante para el descubrimiento de nuevos fármacos que luego se sintetizan, pero también permite un conocimiento más profundo de los vegetales que conduce a que muchos productos naturales sean reconocidos como fitofármacos (Vivot *et al.*, 2012).

Actualmente, uno de los problemas más comunes es que existen plantas medicinales que tienen una actividad antimicrobiana conocida por la población, sin embargo no han sido analizadas a fondo, para determinar cuáles son sus beneficios, pasando muchas veces desapercibidas. La mayoría de estas plantas sometidas a estudio han demostrado poseer efectos antibacterianos y antifúngicos, muy aparte de que poseen otras propiedades curativas además de las mencionadas; las cuales podrían estar relacionadas con la biosíntesis de metabolitos biológicamente activos, según el hábitat donde crecen las plantas (Ochoa *et al.*, 2012).

Por lo antes expuesto, se planteó el estudio de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, que es una planta medicinal perteneciente a la familia botánica Asteraceae, reconocida en todo el mundo por sus propiedades biológicas debido a la riqueza de su estructura química, en la que están presentes compuestos fenólicos y alcaloides, además de aceites esenciales con significativa actividad antibacteriana, antioxidante, antiviral, vasodilatador, cáncer quimiopreventivos, bioinsecticida y repelente (Chagas *et al.*, 2012; Miranda *et al.*, 2015; Miranda *et al.*, 2016; Lezcano-Más *et al.*, 2016).

Además, es una especie comúnmente conocida como botón de oro, falso girasol o girasol mexicano, goza de una amplia adaptación edafoclimática pues ha sido reportada en más de 50 países (Terry *et al.*, 2016; Mauricio *et al.*, 2017). Adicionalmente, debido a su fácil establecimiento en zonas de topografía con pendiente, es una especie empleada en la rehabilitación de suelos, protección de taludes y biorremediación; así como de ser una excelente especie de uso apícola por su abundante floración (Mustonen *et al.*, 2015).

Ahora bien, en la investigación realizada por Do Rocio & Bonissoni, (2012), para la revista, Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, muestra una recopilación sobre las propiedades medicinales adjudicadas a la planta *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray; entre las propiedades medicinales que la características están el tratamiento contra la diabetes, la malaria, enfermedades infecciosas, entre otras.

Por otra parte, la investigación realizada por Wanzala *et al.*, (2016), señala que en México, el lugar de origen de la planta, se usa para tratar esguinces, fracturas óseas y contusiones. La población Mexicana la cultiva en sus jardines y lo usan para aliviar problemas dermatológicos, para quejas gastrointestinales y antiinflamatorio. Además, en el sur de China se utiliza la *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, para tratar enfermedades de la piel (como el pie de atleta), diurético, hepatitis, ictericia y cistitis. En Taiwán, en infusión para mejorar el hígado.

Por consiguiente, los resultados obtenidos constituyen un aporte al conocimiento de la bioactividad de ésta especie vegetal diseminada en distintas latitudes del país y los beneficios que brinda a la población. En busca de indagar en lo anteriormente descrito, en la presente investigación se evaluó la composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae) contra cepas de referencia ATCC y debido a ello se formularon las siguientes interrogantes:

- ¿Cuál es la composición química del aceite esencial obtenido a partir de las hojas y flores de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, perteneciente a la familia botánica Asteraceae?
- ¿Qué actividad antibacteriana presentarán los aceites esenciales de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, contra cepas bacterianas de referencia ATCC, a través del método de difusión en agar con disco?

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## Objetivos de la Investigación

### Objetivo General

Determinar la composición química y actividad antibacteriana contra cepas de referencia ATCC del aceite esencial de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, perteneciente a la familia Asteraceae en Mérida - Venezuela.

### Objetivos Específicos

- Extraer el aceite esencial de las hojas y flores de la especie *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, por hidrodestilación empleando la Trampa de Clevenger.
- Identificar los compuestos de los aceites esenciales obtenidos, por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
- Calcular los índices de Kováts de los compuestos identificados.
- Analizar la actividad antibacteriana de los compuestos volátiles extraídos de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, a través del método de difusión en agar con disco frente a cepas de referencia ATCC.
- Establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los aceites con actividad antibacteriana de la especie *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, en cepas ATCC.

## Justificación de la Investigación

Existe una fuerte conexión entre la medicina científica común con las plantas, el cómo estas conforme a su composición fitoquímica proporcionan alternativas en el tratamiento de enfermedades; el avance tecnológico ha facilitado al investigador químico orgánico herramientas que le permiten conocer y aislar los metabolitos pertenecientes a las plantas, brindando así un sin número de conocimientos en el área farmacológica.

Por su parte, el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes ha desarrollado líneas de investigación orientadas al estudio de los productos naturales para la evaluación de las plantas pertenecientes a Venezuela, específicamente de la región andina; esto proporciona una amplia gama de soluciones al creciente déficit de fármacos empleados en el tratamiento de diversas enfermedades, garantizando así una mejor calidad de vida, ampliando las alternativas en los tratamientos médicos.

Diversas especies de plantas de la zona de los Andes Venezolanos, poseen cualidades medicinales, como lo son las propiedades antiinflamatorias, antibacterianas entre otras. El uso desmedido e inconsciente de los antibióticos actuales ha intensificado la resistencia de diversos agentes patógenos a dichos antibióticos, despertando así el interés en el estudio de plantas de origen medicinal; en este caso el enfoque estuvo dirigido a un miembro de la familia botánica Asteraceae, conocida como *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, llamada popularmente Árnica y botón de oro; que ha demostrado gran actividad biológica y en investigaciones recientes se ha empezado a estudiar las propiedades antibacterianas del aceite de esta planta, extraídos de las partes aéreas dando a conocer así sus propiedades curativas proporcionando la alternativa del uso de sus aceites esenciales para la erradicación de agentes patógenos para el ser humano.

La intención de la actual investigación fue determinar la propiedad antibacteriana *in vitro* de una planta natural con propiedades significativas, ya que especies de su misma familia han sido estudiadas preliminarmente por tener principios activos de importancia médica. Con la finalidad de conseguir una opción terapéutica ante alguna afección posiblemente causada por microorganismos patógenos para el hombre.

En este contexto, destaca el importante papel que han desempeñado las plantas como fuente de importante actividad farmacoterapéutica, además debido al incremento de diversas bacterias multirresistentes, ha dificultado el tratamiento de ciertas infecciones, por lo que representa un problema de salud pública. En la siguiente investigación se estimó la composición química y actividad bacteriana del aceite esencial de las hojas y flores de la especie *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, perteneciente a la familia Asteraceae, asimismo, la concentración mínima inhibitoria que ejercen los compuestos volátiles de esta especie vegetal en cepas de referencia ATCC, con la finalidad de facilitar alternativas en el área farmacológica, aportando así conocimientos valiosos para el área de la salud; y dar pie a investigaciones futuras donde se estudie más a fondo las propiedades antibacterianas de esta planta.

## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

#### Antecedentes de Trabajos Previos

El estudio de las propiedades medicinales de las plantas resulta un beneficio para la sociedad, brindando alternativas para el tratamiento de diversas enfermedades cuyos microorganismos causales, se han vuelto resistentes a una gran parte de los antibióticos de uso regular en la actualidad, trayecto como consecuencia que las enfermedades cada vez sean más peligrosas para la vida del hombre (Rocha *et al.*, 2015).

En este orden de ideas la investigación realizada por Gakuubi *et al.*, (2016) señala que etnofarmacológicamente, la *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, tiene muchas aplicaciones en la historia de la vida humana. Por lo que se plantearon investigar la composición química, así como las actividades antiinflamatoria y antibacteriana de los aceites esenciales de las hojas y las inflorescencias de la especie *Tithonia diversifolia*. Los aceites esenciales fueron analizados por cromatografía de gases con detector de ionización de llama y acoplados con espectrometría de masas, donde ambos aceites se componen principalmente de  $\alpha$ -pineno [1] y  $\beta$ -pineno [2] (ver cuadro 1). Tanto el aceite de las hojas (AEH) como el de las inflorescencias (AEI) mostraron potentes propiedades anti-edematógenas, similar a los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos, inhibiendo el edema, pero no inhibieron el reclutamiento celular. El AEI mostró una actividad antimicrobiana más potente contra microorganismos cariogénicos que AEH. Ambas aceites inhibieron significativamente la producción de ácidos por *Streptococcus mutans* a concentraciones que no eran tóxicas para los fibroblastos gingivales humanos (concentraciones de 25 a 125  $\mu\text{g/mL}$  para AEH y de 25 a 250  $\mu\text{g/mL}$  para AEI).

Tal como lo señaló el estudio realizado por Kareru *et al.*, (2010), en el cual se investigó la actividad antimicrobiana de diferentes extractos de plantas incluyendo a la *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, revelando que se pueden utilizar plantas para elaborar jabones y lociones que sirvan para combatir infecciones de la piel causada por hongos y bacterias; en el caso de infecciones bacterianas el tratamiento a emplear es la ingesta de antibióticos y soluciones inyectables de los mismos, pero al implementar el uso de extractos de hierbas y preparaciones a base de las mismas en forma de jabones, geles, cremas y lociones, se logra erradicar las infecciones tanto bacterianas como las causadas por hongos en la piel. Las hojas de *T. diversifolia* utilizadas para la elaboración del jabón a base de extracto fueron recolectadas en el distrito de Mbeere, provincia Oriental de Kenia y fue autenticada taxonómicamente en el museo nacional de Kenia; se realizaron los jabones a base de plantas y en cuanto al elaborado con *T. diversifolia* se demostró efectividad contra las infecciones de la piel causadas por la bacteria *Escherichia coli* pero en cuanto a la actividad antifúngica contra las infecciones causadas por *Candida albicans* su capacidad de erradicar la infección es muy inferior.

Por su parte, Oso & Ogunnusi (2017), señalaron que el extracto metanólico de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, mostró mayor actividad contra *Pseudomonas aeruginosa* y la menor actividad se registró para *Klebsiella pneumoniae*. La concentración letal mínima (CLM) para *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* fue de 80 mg/mL. Para *Staphylococcus aureus* (piel) fue de 100 mg/mL. Los resultados obtenidos de este estudio respalda el uso de esta planta en la medicina popular para el tratamiento de la fiebre tifoidea, heridas y forúnculos. Los extractos de diferentes partes de la especie botánica pueden usarse en el tratamiento de algunas infecciones que afectan al hombre.

Es oportuno mencionar, la investigación realizada por Linthoingambi & Mutum (2013), donde demostraron la eficacia *in vitro* de tres extractos en solventes orgánicos (éter de petróleo, cloroformo y metanol) de las hojas de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, probada contra nueve especies de hongos patógenos de plantas (*Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Cucurbitaria lunata*,

*Drechslera oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium expansum* y *Penicillium italicum*), un hongo antagonista (*Trichoderma viride*) y cuatro bacterias patógenos para el hombre (*Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*). Entre los extractos, fue el de éter de petróleo que mostró la mayor actividad antifúngica seguido de los extractos metanol y cloroformo. Los tres extractos ensayados mostraron un efecto inhibitorio contra todas las bacterias probadas.

Ahora bien, la investigación de Londoño & López (2016), donde evaluaron la actividad bactericida de extractos obtenidos de la planta *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray sobre las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, y su actividad fungicida sobre el hongo *Candida guilliermondii*. Se realizaron extracciones usando los solventes etanol, acetato de etilo y hexano. Se hicieron las pruebas de sensibilidad y concentración mínima inhibitoria *in vitro*, determinando que la *S. aureus* presentó sensibilidad frente a los extractos etanol y acetato de etilo. Los demás organismos presentaron nula sensibilidad.

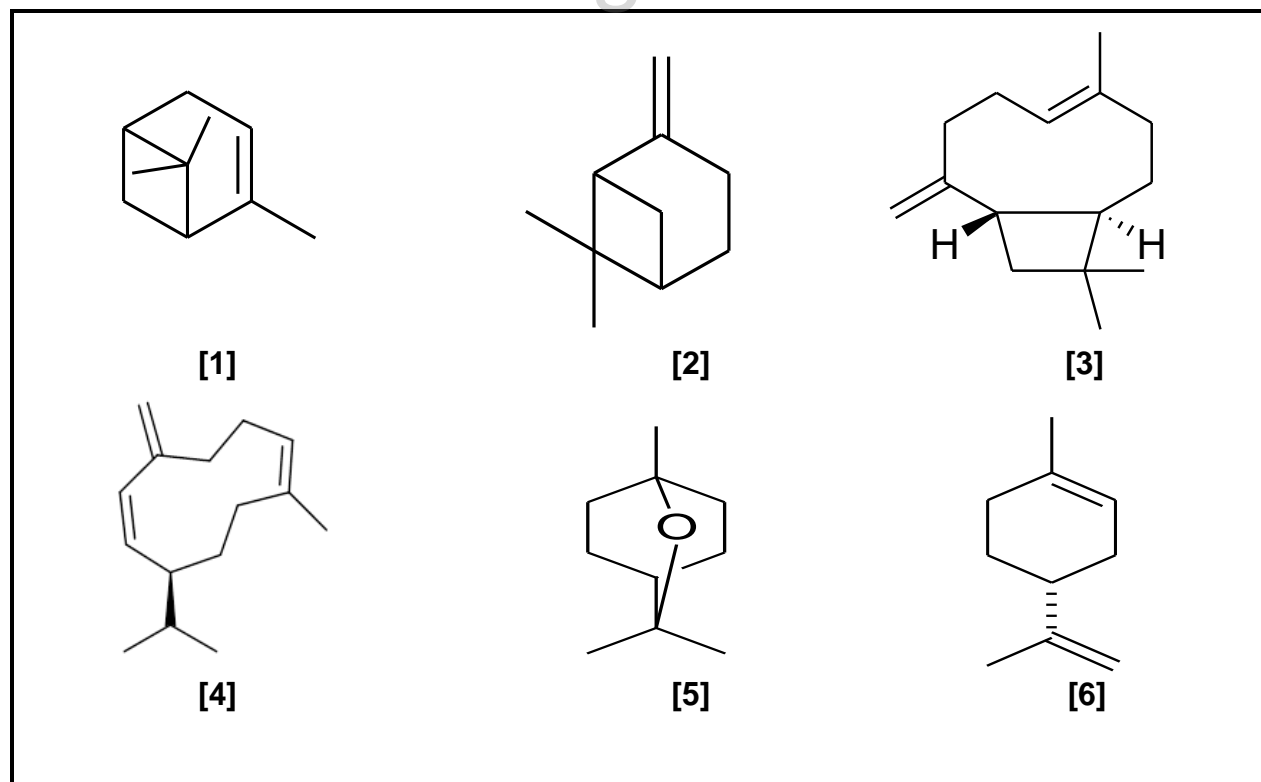
Por otro lado, el estudio realizado por Chukwuka & Ojo (2014) en el cual extrajeron el aceite esencial de las flores de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray por hidrodestilación usando la trampa de Clevenger, sometiendo el aceite cromatografía de gases, donde los componentes se separaron en función de sus pesos moleculares, identificados y caracterizados. El estudio determinó cuarenta y cinco componentes, de los cuales los mayoritarios fueron:  $\alpha$ -pineno [1],  $\beta$ -cariofileno [3],  $\beta$ -pineno [2], germacreno D [4] y el 1,8-cineol [5] con 34,42%; 22,34%; 11,14%; 11,13% y 8,76% respectivamente (ver cuadro 1).

Actualmente, la investigación de Ferreira *et al.*, (2019) tuvo como objetivo evaluar la composición química, el potencial antioxidante, la actividad citotóxica y antimicrobiana del aceite esencial de la especie vegetal *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. En la cual los principales componentes químicos identificados en el aceite de las hojas fueron:  $\alpha$ -pineno (9,9%) [1], limoneno (5,40%) [6], (*Z*)- $\beta$ -ocimeno (4,02%) [7], *p*-cimen-8-ol (3,0%) [8], piperitona (11,72%) [9], (*E*)-nerolidol (3,78%) [10] y el

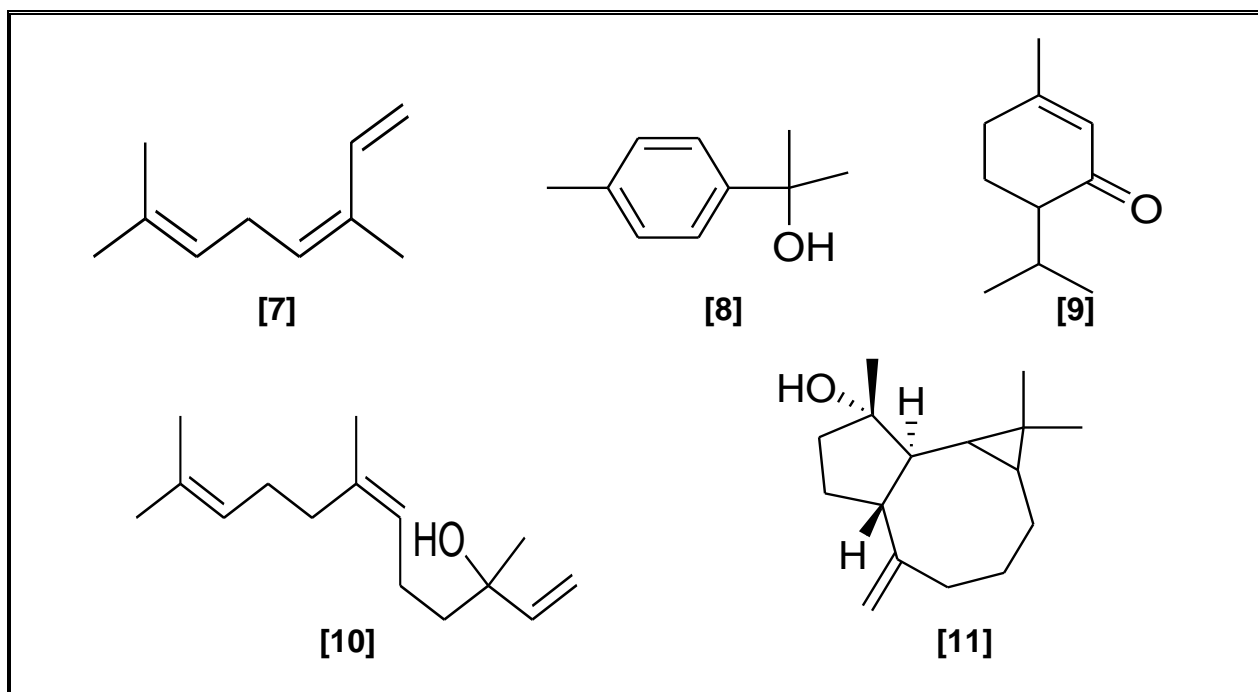
espatulenol (10,8%) [11] (ver cuadro 1). En la evaluación de la actividad antimicrobiana, utilizaron las cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los resultados mostraron que la bacteria *E. coli* fue susceptible a la presencia del aceite. Asimismo, observaron actividad antioxidante de 54,6% a la concentración de 5 mg/mL con  $CI_{50}$  de 4,30. Con respecto a la actividad citotóxica, el aceite fue altamente tóxico contra larvas de *Artemia salina*, ya que mostró un  $CL_{50}$  de 3,11. Por lo tanto, concluyeron que el aceite de *T. diversifolia* es efectivo para inhibir el crecimiento bacteriano y reducir el estrés oxidativo.

Como puede observarse, las anteriores investigaciones sustentan seguir ampliando el campo del estudio del aceite esencial de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, perteneciente a la familia Asteraceae, que se puede encontrar en diversas áreas de los Andes Venezolanos, tanto en zonas de clima frío como en zonas de clima cálido como las cercanas a la vía panamericana.

**Cuadro 1. Componentes Mayoritarios Aislados de las Partes Aéreas de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray.**



**Cuadro 1. Componentes Mayoritarios Aislados de las Partes Aéreas de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. (Continuación).**



[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

### Antecedentes Históricos Epistemológicos

El hombre a través de los años se ha percatado del uso de las plantas y de cómo estas han contribuido con la cura de muchas enfermedades, parte de estos conocimientos se han transmitido de padres a hijos lo cual ha abierto puertas para los diferentes estudios de las plantas y su composición.

Según la compilación que realizó Domínguez (1973), establece que todas las tribus y pueblos han adquirido conocimientos de las diferentes propiedades medicinales de las plantas en especial las típicas de su región, pero estos conocimientos los han acumulado una clase de individuos en especial, como lo son hechiceros, sacerdotes, curanderos entre otros. Se dice que en la biblia están descritas aproximadamente unas 200 plantas del tipo medicinal y no solo eso sino sus aplicaciones; otro reconocido conocedor de las propiedades de las plantas es Hipócrates, este señaló el uso del ajeno, beleño, manzanilla entre otras.

En el año 372 a. de C., Teofrasto, que era un discípulo de Aristóteles escribió 10 libros sobre las plantas y 8 sobre los usos de las plantas medicinales. Plinio, un naturalista del año 23-79, d. C. escribió 47 volúmenes de historia natural donde menciona más de mil especies de plantas entre ellas medicinales que aún están en uso. Galeno un destacado farmacéutico y médico griego de los años 131-200, d. C., destacó por su extensa colección de libros sobre farmacia donde indicaba el uso y adulterio de las plantas medicinales y como esto a su vez dio paso a la apertura de la industria farmacéutica europea. Mucha de la información sobre plantas en el continente africano aún se transmite verbalmente entre algunos elegidos para llevar el conocimiento. Actualmente estos conocimientos se han ido plasmando en libros, tesis y artículos científicos, entre los descubrimientos de la actualidad se tiene la composición química y caracterización taxonómica de las plantas. Los protagonistas principales en el descubrimiento de plantas medicinales han sido los naturalistas como lo eran Alexander Humboldt y Bonpland, Benlandier, Stephens, Spencer y otros naturalistas viajeros (Domínguez, 1973).

Por su parte Albonoz (1980) señala que los primeros documentos escritos sobre alimentos y plantas con propiedades medicinales se podrían remontar a Egipto (1500 a.C.) y están conservados en papiros, el más famoso es el papiro de Ebers, este documento contiene 877 prescripciones y recetas y en ellas se mencionan muchos vegetales tales como el apio, aloe, semillas de lino, cassia, sen, tomillo, ricino y la marihuana. Muchas de estas recetas empleaban gomas, resinas y barro probablemente con hongos productores de antibióticos, este último se empleaba como cataplasma para las llagas ulcerosas. Si la medicina moderna se hubiera detenido en analizar estas prácticas, seguramente el hombre no hubiera tenido que esperar hasta los años 30 para descubrir la penicilina en forma accidental.

## Bases Teóricas

### Aceites Esenciales

Los aceites esenciales (AE) son sustancias odoríferas de naturaleza oleosa encontradas prácticamente en todos los vegetales; son muy numerosos y están ampliamente distribuidos en distintas partes del mismo vegetal: en las raíces, tallos, hojas, flores y frutos. Son componentes heterogéneos, compuestos por diterpenos, sesquiterpenos, ácidos, ésteres, fenoles, lactonas; todos ellos fácilmente separables ya sean por métodos químicos o físicos. Son compuestos volátiles, arrastrables por vapor y responsables de las fragancias de las flores y otros órganos vegetales (Marcano & Hasegawa, 2002; Albornoz, 1980).

Asimismo, se denominan esencias, si bien esta denominación es mucho más amplia, ya que engloba aceites esenciales y a otras sustancias obtenidas por métodos extractivos bastante diversos (Kuklinski, 2000). La mayoría de los aceites volátiles son menos densos que el agua, inmiscibles con ella, pero lo suficientemente solubles para impartirle su olor (las aguas aromáticas dependen de esta ligera solubilidad). Algunos son sólidos y forman mezclas eutécticas como el caso del metanol y el alcanfor (Albornoz, 1980). La esencia varía tanto en rendimiento (de muy poco hasta 1 a 3 %) como en composición, de acuerdo al lugar geográfico y a la variedad genética (Marcano & Hasegawa, 2002). Por lo tanto, las características químicas específicas de los AE varían en función de la zona de cultivo y condiciones ambientales (Ávalos & Pérez, 2009).

Por otra parte, los AE en las plantas pueden encontrarse en las diferentes células oleíferas (jengibre, cúrcuma, vainilla), en los canales secretorios (pino, artemisia, anís, angélica), estar presente en las glándulas (cítricos, eucaliptos) o en los tricomas (muchas plantas de las familias labiadas, asteráceas, solanáceas, geraniáceas) (Stashenko, 2009).

## Propiedades Generales de los Aceites Esenciales

- Líquidos a temperatura ambiente.
- Volátiles.
- Aromáticos.
- Incoloros o amarillentos (Manzanilla: azul).
- Menos densos que el agua (Canela y clavo: más densos que el agua).
- Insolubles en agua.
- Lipófilos.
- Solubles en disolventes orgánicos apolares.
- Solubles en alcoholes de alta graduación.
- Índice de refracción elevado.
- Extraíbles por arrastre de vapor de agua o expresión (Kuklinski, 2000).

## Usos de los Aceites Esenciales

Los AE son utilizados comúnmente en la industria farmacéutica, alimentos, de sabores/fragancias, cosmética y de productos de aseo (Albarracín & Gallo, 2003; Peredo *et al.*, 2009), debido a la capacidad que tienen de conservar el aroma y además por las distintas propiedades medicinales que han demostrado a través de los años en las diferentes investigaciones que se han realizado sobre ellos (Marcano & Hasegawa, 2002).

Además, cumplen un rol ecológico como atrayentes de polinizadores y dispersores de frutos y semillas; así mismo pueden actuar como repelentes de insectos y forman parte de la defensa química de las plantas. Los AE son una opción importante para el control de insectos, hongos y nemátodos, como una alternativa al uso de plaguicidas sintéticos (Albarracín & Gallo, 2003).

Por otra parte, desde el enfoque de la farmacología, los AE tienen decenas de propiedades conocidas y seguramente muchas más por conocer, cada aceite tiene

decenas de componentes bioquímicos que los hacen más adecuados para unas aplicaciones u otras. Por ejemplo los esteres son antiinflamatorios y cicatrizantes, los aceites ricos en fenoles tienen un efecto antibiótico y estimulante mental (Sanz, 2004).

### **Composición Química de los Aceites Esenciales**

Todos los seres vivos son capaces de producir compuestos que son conocidos con el nombre de metabolitos secundarios que no son de utilidad para el ser vivo que los produce a diferencia de los llamados metabolitos primarios como lo son: Carbohidratos, lípidos, proteínas, etc. Todos los seres vivos poseen una composición química que le brinda las características que pueden ser percibidas por los sentidos o no como lo es el caso de las estructuras microscópicas (Marcano & Hasegawa, 2002).

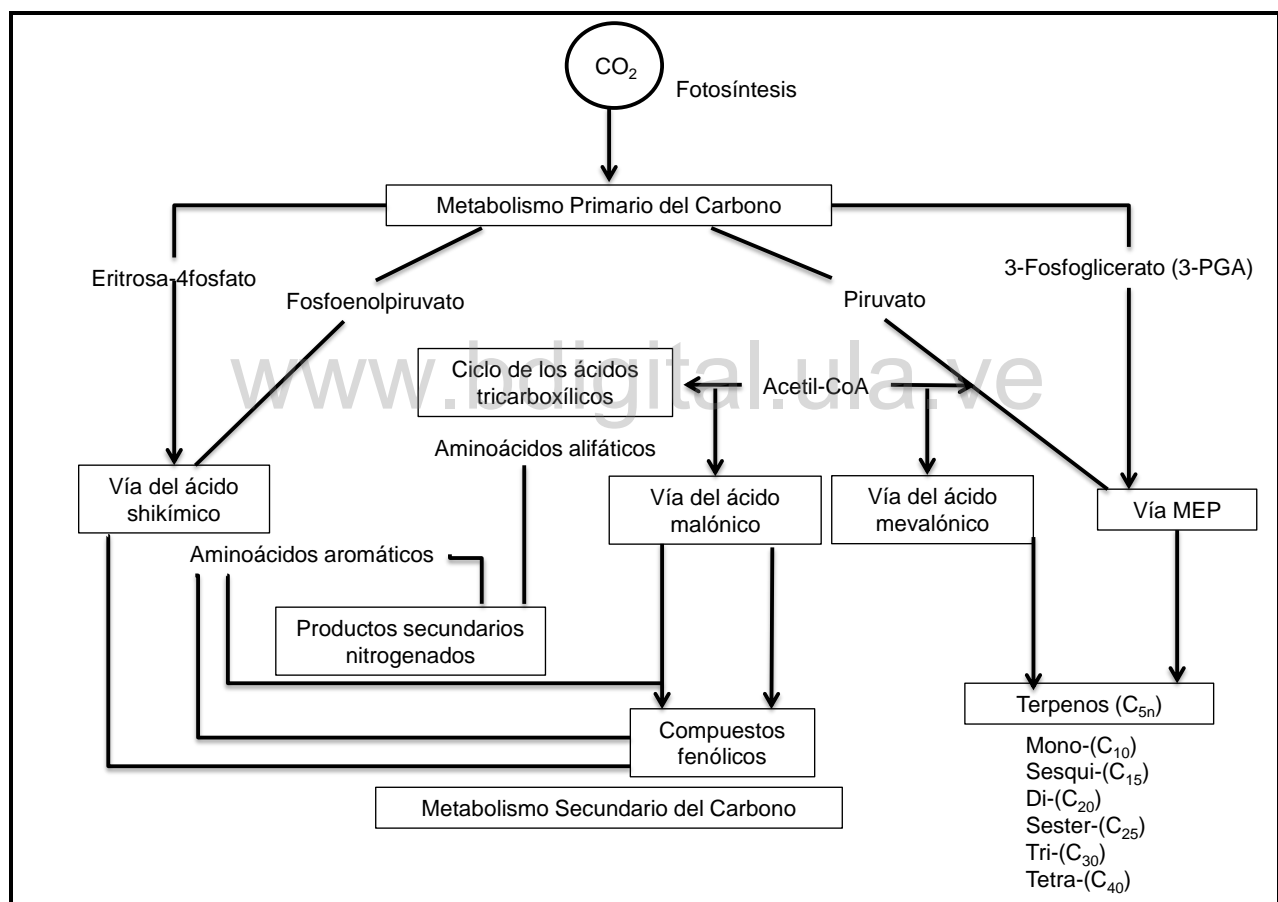
La síntesis de metabolitos secundarios depende de la etapa de desarrollo de la planta y sus niveles constitutivos solo se incrementan como parte de la respuesta al estrés abiótico o biótico. Este aumento en los niveles de metabolitos secundarios, es importante para la supervivencia de las plantas, ya que su síntesis se deriva del metabolismo primario y porque algunos compuestos son tóxicos para la misma planta. Es así como algunos metabolitos secundarios constituyen una parte importante de la respuesta de la defensa de las plantas sometidas a heridas y al ataque por parte de las plagas (Sepúlveda *et al.*, 2007).

En lo que se refiere a la composición química de los AE, estos son el resultado de mezclas obtenidas de especies vegetales, que presenta una compleja composición química. De los millones de plantas que existen en el planeta se conocen unos 4000 aceites esenciales diferentes, estos son datos de esperar ya que no todas las plantas tienen aceites o quizás sí pero están en concentraciones tan bajas que es difícil su extracción (Ortuño, 2006).

Los AE o esencias están constituidos por monoterpenos, sesquiterpenos, así como también por alcoholes, aldehídos, sustancias azufradas y nitrogenadas, fenoles simples, lactonas sesquiterpénicas, diterpenos, cannabinoides, alcaloides de origen

diversos, polisacáridos, enzimas, heterósidos, entre otros ( Vanaclocha & Cañigueral, 2003). Algunos aceites esenciales se encuentran bajo la forma de precursores no volátiles, por ejemplo como glicósidos, tal es el caso de aceites de almendras amargas y de la vainilla que se producen en glándulas especiales formando bolsas de células secretoras. Son particularmente ricas las familia Lauráceas, Myrtaceas, Umbellíferas, Pinaceas, Rutaceas, Verbenaceas y Compuestas (Marcano & Hasegawa, 2002). En el esquema 1 se resume los metabolitos secundarios en los AE.

**Esquema 1. Metabolitos Secundarios en los Aceites Esenciales.**



(Tomado y modificado de Sepúlveda *et al.*, 2007).

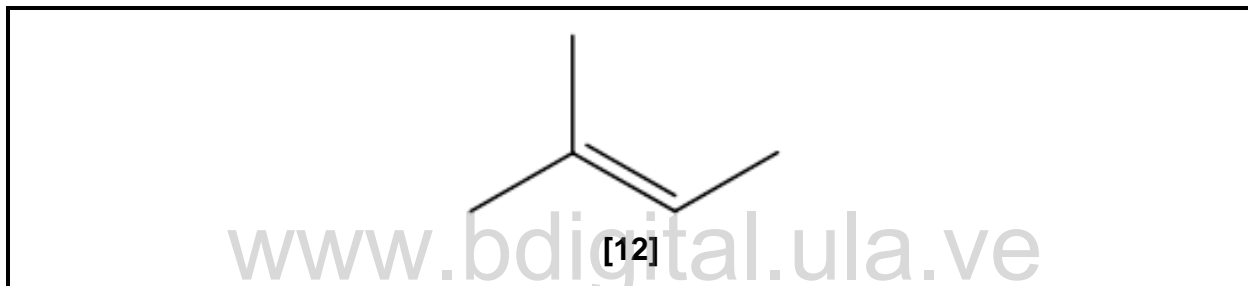
Los aceites esenciales son mezclas complejas y muy variables de constituyentes que pertenecen, de manera casi exclusiva, a dos grupos caracterizados por orígenes biogénicos distintos: el grupo de los terpenoides por una parte y el grupo de los

compuestos aromáticos derivados del fenilpropano, muchos menos frecuentes (Bruneton, 2001).

### **Terpenos:**

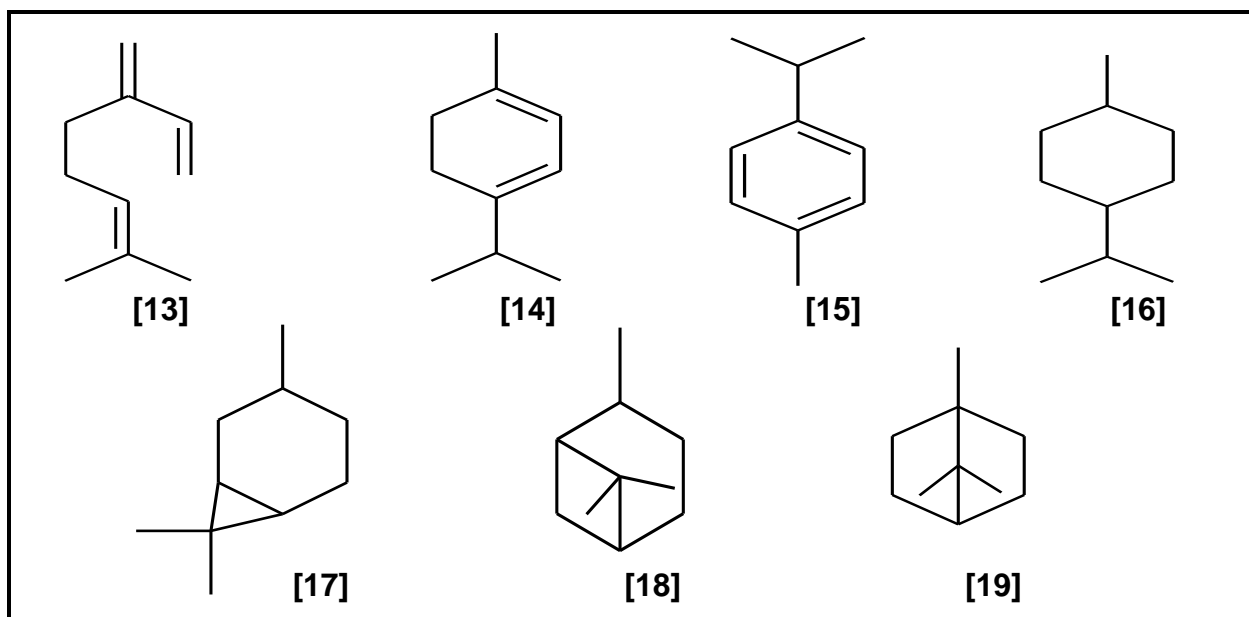
Estos compuestos poseen una unidad fundamental que las define, que consta de 5 átomos de carbono llamado isopreno [12] (Cuadro 2), los terpenos no pueden ser hallados en las plantas sino están asociados a otras unidades iguales u otras moléculas; la agrupación de una o más unidades de isopreno pueden formar monoterpenos, diterpenos, y así de manera sucesiva (Marcano & Hasegawa, 2002).

#### **Cuadro 2. Molécula de Isopreno.**



**Monoterpenos:** Son derivados de dos unidades de isopreno no solo se encuentran en plantas sino pueden hallarse e microorganismos e insectos. Estos pueden tener alguna actividad específica dentro del organismo que lo produce y una gran variedad de ellos desempeña actividades biológicas de distinta naturaleza (Romo, 2006). Casi siempre se encuentran como hidrocarburos. Además éstos pueden ser acíclicos: mirceno [13], monocíclicos:  $\gamma$ -terpineno [14], *p*-cimeno [15] y *p*-mentano [16], o bi y tricíclicos: formados por dos o más ciclos, entre estos esqueletos se encuentra el carano [17], pinano [18], bornano [19]. A veces constituyen más del 90% del aceite esencial (ver Cuadro 3) (Bruneton, 2001).

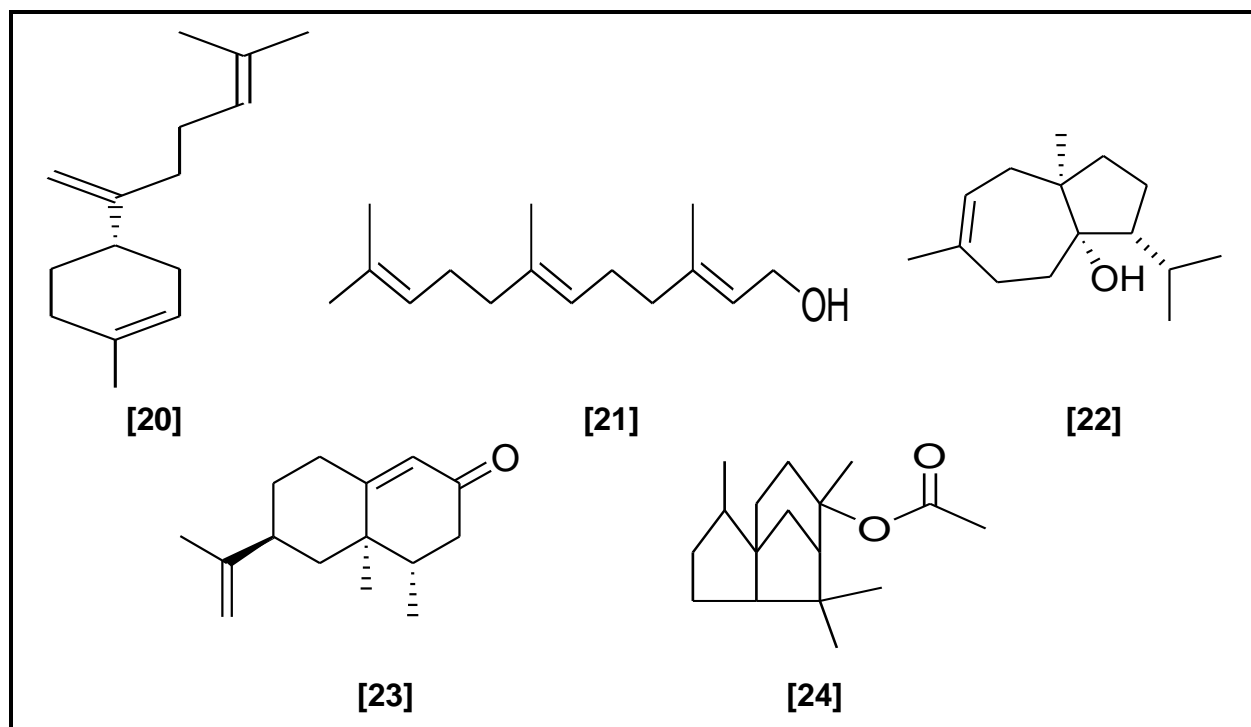
**Cuadro 3. Ejemplos de Monoterpenos.**



**Sesquiterpenos:** Son compuestos que poseen 15 átomos de carbono, y a su vez tienen la capacidad de reacomodar los átomos de su estructura, una muestra de esa característica está en los casos en los que algunos aceites esenciales se tornan de un color azul debido al tratamiento con ácidos o por el calentamiento u oxidación y se les denomina azulenos ya que tienen en su composición un derivado de algunos sesquiterpenos que lleva por nombre esqueleto carbonado de azuleno (Marcano & Hasegawa, 2002).

Las variaciones estructurales son variadas siendo los más frecuentes hidrocarburos, alcoholes y cetonas. El alargamiento de la cadena aumenta el número de ciclaciones posibles, de ahí la gran variedad de estructuras conocidas (más de una centena de esqueletos diferentes). Algunos de los sesquiterpenos característicos de los aceites esenciales: hidrocarburos mono o policíclicos ( $\beta$ -bisaboleno [20],  $\beta$ -cariofileno [3]), alcoholes (farnesol [21], carotol [22]), cetonas (nootkatona [23]), ésteres (acetato de cedrilo [24]), entre otros (ver Cuadro 4) (Bruneton, 2001).

#### Cuadro 4. Ejemplos de Sesquiterpenos.

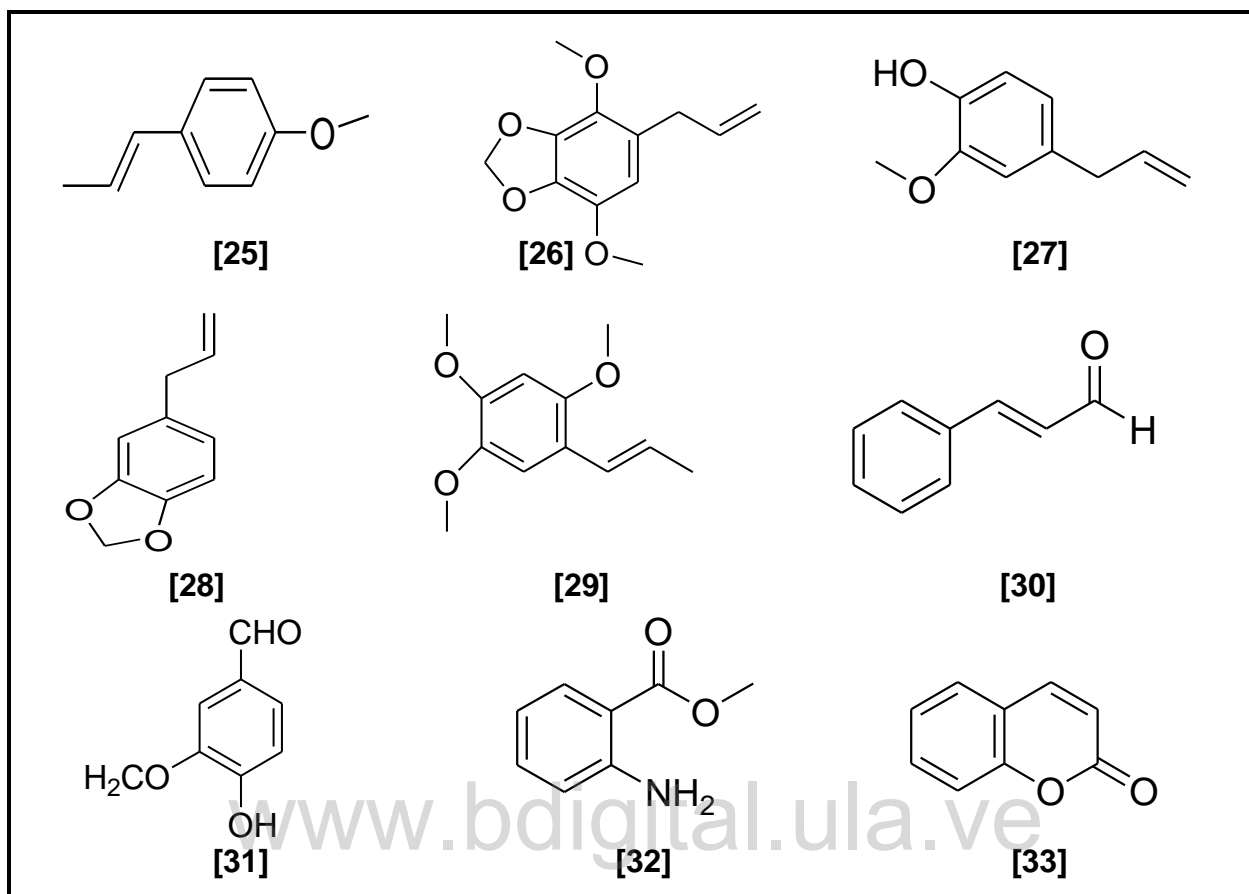


#### Derivados del Fenilpropano ( $C_6-C_3$ ):

Son mucho menos frecuentes que los terpenoides. Generalmente son alil- y propenil - fenoles, aldehídos, característicos de determinados aceites esenciales de Apiaceae: anís, hinojo, perejil, etc.: anetol [25], apiol [26], pero también de los clavo, nuez moscada, estragón, albahaca, canela (eugenol [27], safrol [28], asaronas [29], cinamaldehído [30]) (Bruneton, 2001).

También se pueden encontrar compuestos  $C_6-C_1$ , como la vainillina [31] o como el antranilato de metilo [32]. Las lactonas derivados de los ácidos cinámicos (cumarinas) [33] al ser, al menos las más sencillas de ellas, arrastables por corriente de vapor de agua, se encontrarán en algunos aceites esenciales (ver cuadro 5) (Bruneton, 2001).

### Cuadro 5. Ejemplos de Derivados del Fenilpropano (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>):



### Proceso de Obtención de Aceites Esenciales

El método de extracción depende del tipo de material a procesar ya sea pétalos, hojas, cortezas, entre otros. Es importante considerar el lugar donde se ubica la sustancia aromática dentro de la estructura celular. La cual es dependiente del tipo de material vegetal y de la familia botánica de la misma (Bandoni, 2000).

**Método de Destilación por Arrastre con Vapor:** Es la evaporación de compuestos volátiles de una mezcla, en este caso se inyecta vapor de agua en el seno de la mezcla a este vapor se le denomina vapor de arrastre, aunque la función que desempeña no es la de arrastrar compuestos volátiles sino de crear a través de la condensación una fase inmisible que provocara la evaporación al pasar el calor a la mezcla que será destilada; por esta razón a lo largo de la destilación se tendrán dos

fases inmiscibles una orgánica y otra acuosa, y estos a su vez se comportaran de manera individual, esto quiere decir que cada uno ejercerá su propia presión. La condición más importante para que se de esta destilación radica en que el compuesto volátil como una impureza sea insoluble en agua, porque el compuesto a destilar que es el volátil formara dos fases al condensarse que permitirá separar el compuesto volátil fácilmente del agua, no se puede utilizar en flores ni en los materiales que se pueden apelmazar (Peredo *et al.*, 2009).

**Método de Hidrodestilación Empleando la Trampa de Clevenger:** Consiste en hervir el agua en la cual se ha colocado el material vegetal preferiblemente licuado, el calentamiento puede realizarse por fuente de calor directo, camisa de vapor o una camisa de aceite; el vapor que se genera arrastra los aceites esenciales del material vegetal hasta otro recipiente donde se condensan y se separan, el material vegetal debe estar sumergido por completo en el agua y en constante agitación para que el mismo no se aglomere o se adhiera a las paredes del recipiente, y evitar de este modo la degradación térmica, para evitar que el agua se seque durante la destilación los equipos cuentan con un tubo de cohobación lateral para el retorno del agua al recipiente que contiene el material vegetal (Olaya y Méndez, 2003).

**Método de Prensado, Estrujado o Expresión:** Es el método que más se emplea para la extracción de aceites esenciales de todos los cítricos (naranja, mandarina, pomelo, lima, etc.); este consiste en tomar fragmentos de la cascara y exprimirlos entre los dedos contra una esponja, luego de hacer esto varias veces la esponja se satura del aceite esencial y se exprime en el recipiente en el que va a almacenarse, la calidad de este aceite es muy buena (Olaya & Méndez, 2003).

Este método se basa en la ruptura de las glándulas secretoras de aceite y en recolectar en forma inmediata la esencia, para evitar que sea adsorbida por la corteza esponjosa que resulta después del proceso. Por esta razón los equipos de extracción

de cítricos cuentan con un sistema de aspersión de agua que moja constantemente la superficie del fruto (Bandoni, 2000).

**Método de Enfleurage:** Esta es una técnica antigua en la que se utilizan grasas animales o vegetales para extracción de esencias. Se usan grandes bandejas untadas de grasas en la que se extiende el material vegetal, y este se cambia regularmente hasta que la grasa se satura; esta grasa es tratada con alcohol que luego es destilado para luego obtener la esencia. Esta es una buena alternativa pero no da grandes rendimientos, es una forma simple de extraer el aceite de flores y de algunas plantas que no pueden obtener con arrastre de vapor (Olaya & Méndez, 2003).

La extracción con grasa en frío (enfleurage) es un método antiguo de obtención de aceites esenciales que ha sido muy empleado sobre todo en la región de Grasse, al sur de Francia. Se basa en el hecho de que las grasas absorben sustancias aromáticas con facilidad. Este procedimiento se utiliza para flores cuyo contenido en aceite esencial es tan bajo que se queda en el agua de destilación, o bien que tienen un aceite esencial sensible al calor y también para otras como el nardo o el jazmín que siguen produciendo aceite esencial después de la recolección (Ortuño, 2006). En el enfleurage se utilizan grasas completamente purificadas, las cuales se difunden en cubetas especiales, preferentemente de vidrio, donde los capullos de las flores son esparcidos sobre la grasa. Se deja en reposo un cierto periodo (25 a 30 horas), luego los capullos son retirados y reemplazados por otros, hasta que la grasa quede saturada con el aceite (Chiliquinga, 2006).

**Método de Extracción con Solventes Volátiles:** En este caso la muestra seca y molida se pone en contacto con disolventes orgánicos tales como alcohol y cloroformo, entre otros. Estos disolventes solubilizan la esencia pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una oleoresina o un extracto impuro. Se utiliza a escala de laboratorio porque a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los disolventes, porque se obtienen esencias

contaminadas con otras sustancias, y además por el riesgo de explosión e incendio característicos de muchos disolventes orgánicos volátiles (Peredo *et al.*, 2009).

Dentro de este método se engloban muchos procedimientos diferentes que incluyen la utilización de distintos tipos de solventes, desde el caso de derivados del petróleo hasta la utilización de CO<sub>2</sub> líquido (Ortuño, 2006). La extracción con disolventes derivados del petróleo, tiene la ventaja sobre la hidrodestilación en que los aceites esenciales extraídos representan mejor el perfume original de las flores (Ortuño, 2006).

**Método de Extracción por Fluidos Supercríticos:** Un fluido supercrítico es cualquier sustancia a una temperatura y presión por encima de su punto crítico termodinámico. Tiene la propiedad de difundirse a través de los sólidos como un gas, y de disolver los materiales como un líquido. Adicionalmente, puede cambiar rápidamente la densidad con pequeños cambios en la temperatura o presión. Estas propiedades lo hacen conveniente como un sustituto de los solventes orgánicos en los procesos de extracción (Velasco *et al.*, 2007).

Usando dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), en particular, el tratamiento es a temperatura moderada y es posible lograr una alta selectividad de microcomponentes valiosos en productos naturales. La selectividad del CO<sub>2</sub> también es apropiada para la extracción de aceites esenciales, pigmentos, carotenoides antioxidantes, antimicrobianos y sustancias relacionadas, que son usadas como ingredientes para alimentos, medicinas y productos de perfumería, obtenida de especias, hierbas y otros materiales biológicos (Peredo *et al.*, 2009).

### **Análisis de la Composición de los Aceites Esenciales.**

Los métodos utilizados en el análisis son los siguientes:

- Técnicas cromatográficas de alta resolución, principalmente cromatografía de gases con columnas capilares.
- Espectrometría de masas.

- Espectroscopia infrarroja, espectroscopia de resonancia magnética nuclear.
- Sistemas cromatográfico acoplados como por ejemplo:
  - Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
  - Cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de resonancia magnética nuclear.
  - Cromatografía de gases acoplada a espectroscopia infrarroja (Bandoni, 2000).

### **Actividad Farmacológica de los Aceites Esenciales.**

Son muchas las propiedades farmacológicas que se podrían atribuir a los AE. La principal propiedad de las esencias que se utiliza en medicina es su volatilidad, lo que las hace ideales para ser usadas en nebulizaciones, baños de inmersión o simplemente por vía nasal en inhalaciones. En el Tabla 1 se resumen algunas propiedades de los AE de uso común (Cruz & Vela, 2011).

### **Actividad Antibacteriana**

Se refiere a la presencia de cualquier agente que interfiera con el crecimiento y la actividad de las bacterias. El espectro de actividad antibacteriana, comprende bacterias grampositivas como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y bacterias gramnegativas como por ejemplo *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (Murray *et al.*, 2009). Por su parte, las bacterias son microorganismos unicelulares procariotas que carecen de un núcleo delimitado por una membrana, aunque presenta un nucleoide que contiene una molécula circular de ADN; su citoplasma carece de organelos, presenta también vacuolas y ribosomas. La membrana citoplasmática está compuesta de lípidos que rodean al citoplasma. Algunas presentan una segunda membrana lipídica (membrana externa característica de las bacterias gramnegativas). El espacio comprendido entre la membrana citoplasmática y la pared celular o membrana externa se denomina espacio periplásmico (Prescott *et al.*, 2003).

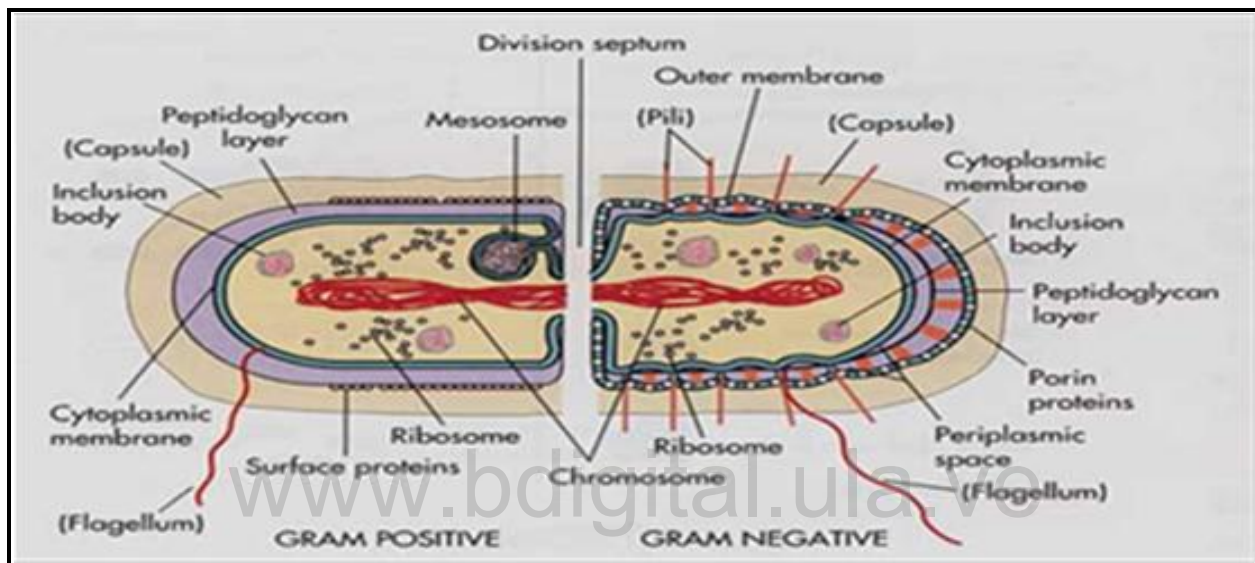
**Tabla 1. Propiedades Farmacológicas de Algunos Aceites Esenciales.**

<b>Acción</b>	<b>Especies</b>	<b>Principales Compuestos Químicos</b>
<b>Antiséptica y Bactericida</b>	Tomillo ( <i>Thymus vulgaris</i> )	Contiene altos porcentajes de timol y carvacrol, geraniol, linalol.
	Clavo ( <i>Eugenia caryophyllus</i> )	Eugenol, isoeugenol.
	Orégano ( <i>Origanum vulgare</i> )	Carvacrol y timol.
	Árbol de té ( <i>Melaleuca alternifolia</i> )	Terpin-1-en-4-ol.
	Alcanfor ( <i>Cinnamomun canphora</i> )	Safrol, alcanfor.
<b>Antihelmíntica o Antiparasitaria</b>	Paico ( <i>Chenopodium spp.</i> )	Ascaridol.
	Ajenjo ( <i>Artemisia absinthium</i> )	Tuyana, tuyol.
<b>Tranquilizante</b>	Melisa ( <i>Melissa officinalis</i> )	Citral, citronelal, linalol.
<b>Antiinflamatorios</b>	Manzanilla alemana ( <i>Matricaria recutita</i> )	Azulenos, bisabolol (Sesquiterpenos) Polisacáridos y flavonoides como la apigenina.
	Manzanilla ( <i>Matricaria chamomilla</i> )	Flavonoides, cumarinas, varias lactonas sesquiterpénicas.
<b>Antiartrítica, antirreumática</b>	Clavo ( <i>Eugenia caryophyllata</i> )	Eugenol, verbenona, timol.
<b>Sedante</b>	Tomillo ( <i>Thymus vulgaris</i> )	
	Tilo ( <i>Tila platyphylos</i> )	Farnesol, geraniol, eugenol.
<b>Antiespasmódico</b>	Anís estrellado ( <i>Illicium verum</i> )	Anetol, estragol, safrol.
	Comino ( <i>Cuminum cyminum</i> )	Aldehído cumínico, terpenos.
<b>Hipolipemiente</b>	Alcachofa ( <i>Cynara scolymus</i> )	Lactonas sesquiterpénicas, heterósidos de luteol, taraxacol.

(Cruz & Vela, 2011).

La mayoría de las bacterias presentan una cápsula que le permite protegerse de las células fagocitadoras y de los agentes antibacterianos; otras son capaces de evolucionar a endosporas (Estadios latentes capaces de resistir condiciones extremas) (Prescott *et al.*, 2003). La clasificación de las bacterias radica en su pared celular donde se pueden diferenciar por la coloración del Gram, un método tradicionalmente

empleado para la clasificación de las especies bacterianas. Así, las bacterias Gram negativas tienen una pared relativamente fina, consistente en unas pocas capas de peptidoglicano rodeada por una segunda membrana lipídica (membrana externa) que contiene lipopolisacáridos y lipoproteínas. En cambio, las bacterias Gram positivas tienen una pared gruesa que contienen numerosas capas de peptidoglicano en las que se inserta el ácido teicoico (Figura 1) (Tortora *et al.*, 2007).



**Figura 1. Bacterias Gram positivas y Gram negativas.** (Ruiz y Moreno, 2005).

### **Bacterias Gram Positivas**

Son uno de los principales grupos de bacterias que poseen una pared gruesa y está a su vez consta de varias capas, y está formada por peptidoglúcano principalmente que rodean la membrana citoplasmática, el peptidoglúcano representa un elemento que es clave para la supervivencia de las bacterias en el medio en el que prolifera la misma (Murray *et al.*, 2009). Los microbios grampositivos son causantes de muchas y muy diversas afecciones como el tétanos y la difteria. Dentro de esta clasificación existen organismos como: *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, entre otros (Tortora *et al.*, 2007).

**Género *Staphylococcus*:** De la familia micrococcacea, el género *Staphylococcus* comprende actualmente 32 especies y 15 subespecies; las especies de importancia

medica son: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus*. Desde el punto de vista de la medicina *Staphylococcus aureus* es la bacteria más importante de este género, que a diferencia de las otras especies, produce coagulasa, que hace que la fibrina se aglomere y forme un coagulo. La coagulasa es una proteína capaz de coagular el plasma citratado u oxalatado, con factores presentes en el suero. La importancia medica de esta bacteria radica en que es el agente etiológico de un gran número de infecciones en el hombre. Otro aspecto muy importante es que con gran facilidad puede desarrollar resistencia a una gran variedad de antimicrobianos, lo que significa que la colonización en el hombre es un peligro (Romero, 2007).

**Género *Enterococcus*:** Los enterococos (cocos entéricos) se clasificaron previamente como estreptococos del grupo D debido a que poseen el antígeno D en la pared celular del grupo D, un ácido teicoico con glicerol que se asocia a la membrana citoplasmica. En el año 1984, los enterococos se clasificaron en el nuevo género *Enterococcus*, el cual consta actualmente de 38 especies que se aíslan con una mayor frecuencia y clínicamente las más importantes son *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum* y *Enterococcus casseliflavus*, y frecuentemente son colonizadores del aparato digestivo del ser humano y revisten importancia porque estas especies muestran una resistencia inherente frente a la vancomicina (Murray *et al.*, 2009).

### **Bacterias Gram Negativas**

Son microorganismos que poseen una capa delgada de péptidoglicano y una membrana externa que protege al citoplasma bacteriano. Muchas enfermedades son provocadas por bacterias gramnegativas como la meningitis causada por *Neisseria meningitidis*, la fibrosis quística pulmonar fruto de una infección por *Pseudomonas aeruginosa*, septicemia como consecuencia de una infección extraintestinal de *Escherichia coli* o cualquier tipo de enfermedad nosocomial en donde se ha visto implicado el microorganismo *Klebsiella pneumoniae* (Ruiz y Moreno, 2005). Estas bacterias poseen pared celular más complejas a diferencia de las gram positivas, estas

poseen dos capas en el exterior de la membrana citoplasmática, e inmediatamente por fuera de la membrana citoplasmática se encuentra una ligera capa de peptidoglúcano que representa solo 5% a 10% del peso de la pared (Murray *et al.*, 2009).

**Género *Escherichia*:** Este género está formado por las especies: *Escherichia coli* y *Escherichia hermannii*. Donde la *Escherichia coli* es la bacteria más constantemente encontrada en la materia fecal del hombre y de muchas especies animales. Su nicho ecológico natural es el intestino delgado y grueso, forma parte de la flora nativa intestinal y se encuentra en calidad de saprobio sin causar daño. Poco después del reconocimiento de *E. coli* como un entero patógeno, se hace aparente que no todas las cepas son igual de virulentas; es la especie predominante de la flora anaerobia facultativa del colon humano. Las infecciones producidas por esta cepa patógena pueden estar limitadas a las mucosas o bien diseminarse. Cuatro síndromes clínicas pueden resultar de la infección por cepas patogénicas: infecciones urinarias, sepsis, meningitis y enfermedad diarreica (Romero, 2007).

**Género *Klebsiella*:** Este género incluye las especies: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella planticola* y *Klebsiella terrigena*. Los factores de patogenicidad de este género son: la capsula que es un factor antifaocitario, y la endotoxina de pared, que es lipopolisacárido, como los otros bacilos de esta familia; que puede infectar diversos tejidos, especialmente las infecciones del aparato respiratorio producidas *K. pneumoniae*, que se manifiestan por neumonías de alta gravedad. La *K. rhinoscleromatis* es el agente etiológico del rinoscleroma y la rinitis granulomatosa crónica, y *K. ozaenae* produce una rinitis crónica atrófica que se manifiesta por olor fétido (Romero, 2007).

**Género *Pseudomonas*:** Esta constituido inicialmente por una gran colección heterogénea de la bacteria sin capacidad de fermentación que se agruparon por sus parecidos morfológicos; se denominaban *Pseudomonas* porque se solían disponer en parejas de células que recordaban a una célula única, donde incluyen casi 200 especies. La más importante es *P. aeruginosa* que se dan en infecciones nosocomiales

y en pacientes inmunodeficientes. Los individuos de la familia son de vida libre, y se encuentran en el material orgánico en descomposición, donde tienen un importante papel en su degradación; algunas especies son patógenas de plantas, mientras que otras pueden producir infecciones en animales; y solo unas pocas se han encontrado en infecciones humanas (Romero, 2007; Murray *et al.*, 2009).

### **Mecanismos de Acción de los Agentes Antibacterianos.**

Los antibacterianos usados para el tratamiento de las infecciones bacterianas pueden ser clasificados de acuerdo a su mecanismo de acción:

- 1) Interferencia en la síntesis de la pared celular.
- 2) Inhibición de la síntesis de proteínas.
- 3) Interferencia en la síntesis de ácido nucleicos.
- 4) Inhibición de rutas metabólicas.
- 5) Alteración de la estructura de la membrana bacteriana (ver Tabla 2).

Los antibacterianos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular incluyen a los  $\beta$ -lactámicos y a los glicopéptidos. En el caso de los  $\beta$ -lactámicos interfieren con las enzimas (PBP= Proteínas ligadoras de penicilina que corresponde a enzimas transpeptidasas) requeridas para la síntesis de la capa de peptidoglucano. La vancomicina y la teicoplanina se unen al residuo terminal D-ala-D-ala del precursor del peptidoglucano, impidiendo el entrecruzamiento del mismo requerido para la síntesis de una pared celular estable (Rosa & Prieto, 2006; Prats, 2008).

Por su parte, los macrólidos, aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, clindamicina, estreptograminas y oxazolidinonas producen su efecto antibacteriano inhibiendo la síntesis de proteínas. Los aminoglucósidos y tetraciclinas se unen a la subunidad 30S, mientras que el resto se unen a la subunidad 50S. Por otro lado, las quinolonas ejercen su efecto antibacteriano inhibiendo las enzimas necesarias para la síntesis de ADN (ADN girasa y ADN topoisomerasa IV), mientras que el rifampin se une a la ARN polimerasa, inhibiendo la síntesis de ARN. En el caso de las sulfonamidas inhiben un paso en la síntesis bacteriana del ácido fólico y el trimetoprim (TMP) inhibe

otro paso. Formulaciones que combinan sulfonamida/trimetoprim están inhibiendo dos enzimas secuenciales en la vía del ácido fólico (Rosa & Prieto, 2006; Prats, 2008).

**Tabla 2. Mecanismos de Acción de los Agentes Antibacterianos.**

Mecanismos	Antibióticos
Interferencia con la síntesis de la pared celular	- $\beta$ -lactámicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenems, monobactams. -Glicopéptidos: vancomicina, teicoplanina.
Inhibición de la síntesis de proteínas	-Unión a la subunidad ribosomal 50S: macrólidos, cloranfenicol, clindamicina, quinupristina-dalfopristina, linezolid. -Unión a la subunidad ribosomal 30S: aminoglucósidos, tetraciclinas. -Unión a isoleucil-tRNA-sintetasa bacteriana: mupirocina.
Interferencia con la síntesis de ácido nucleico	-Inhibe síntesis de ADN: quinolonas. -Inhibe síntesis de ARN: rifampin
Inhibición de la vía metabólica:	-Inhibición de la vía metabólica: sulfonamidas, análogos de ácido fólico.
Alteración de la estructura de la membrana bacteriana	-Polipéptidos: polimixinas. -Lipopéptidos: daptomicina

(Olivaro, 2015).

Ahora, la alteración de estructura de la membrana bacteriana se postula que las polimixinas ejercen sus efectos inhibidores mediante el aumento de permeabilidad de la membrana bacteriana, causando fuga de contenidos de la bacteria. La daptomicina actúa como una molécula anfipática, insertándose directamente dentro de la membrana citoplasmática de las bacterias grampositivas, mediante un proceso que es dependiente de la concentración de calcio ( $Ca^{2+}$ ). Como consecuencia de ello se produce una rápida despolarización de la membrana bacteriana y la salida al exterior de una corriente de iones potasio ( $K^+$ ). Estos cambios determinan una rápida detención de los procesos de síntesis proteica y de ácidos nucleicos (DNA y RNA), que provoca la muerte de la bacteria (Straus & Hancock, 2006).

## **Mecanismos de Resistencia Bacteriana.**

Existen cuatro mecanismos por medio de los cuales una bacteria puede hacerse resistente al efecto del antibiótico, los cuales pueden ocurrir simultáneamente:

### ***Inactivación y Modificación del Antibiótico:***

Este mecanismo se lleva a cabo mediante la producción de enzimas que inactivan o modifican el antibiótico volviéndolo inefectivo. Un ejemplo son las  $\beta$ -lactamasas, enzimas que inactivan el antibiótico hidrolizando el anillo  $\beta$ -lactámico de la molécula. También se conocen casos de resistencia a macrólidos y tetraciclinas debido a la inactivación de los mismos por enzimas (Olivaro, 2015).

Otro ejemplo de este mecanismo son las enzimas que modifican químicamente a los aminoglucósidos comprometiendo su unión a su blanco molecular (subunidad ribosomal 30S). Tres tipos de modificaciones han sido descritas, catalizadas por Ofosfotransferasas (APH), O-adeniltransferasas (ANT) y N-acetiltransferasas (ACT). La resistencia al cloranfenicol es típicamente otorgada por acetiltransferasas existentes tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas. Estas enzimas acetilan los dos grupos hidroxilo de la molécula y previenen la unión del cloranfenicol al ribosoma 50S (Olivaro, 2015).

### ***Alteración del Sitio Blanco del Antibiótico:***

Modificaciones en los blancos específicos de las bacterias hacen que se limite o impida la interacción con el antibiótico y así se promueve la resistencia. El mecanismo más común de resistencia a los macrólidos se da por modificación del sitio blanco, específicamente a través de una metilación en un residuo de adenina en el dominio V del 23S rARN. La resistencia a los  $\beta$ -lactámicos por expresión de blancos de baja afinidad (PBPs) es también común. Por otra parte, la resistencia a las fluoroquinolonas ha sido atribuido a mutaciones en el blanco, ADN girasa y topoisomerasa. También ocurre resistencia a las tetraciclinas y aminoglucósidos por mutaciones en el sitio blanco (Olivaro, 2015).

### ***Disminución de la Permeabilidad al Antibiótico:***

La membrana externa en bacterias Gram negativas proporciona una formidable barrera que tiene que ser superada. En efecto, esta barrera explica, al menos en parte, la resistencia mejorada de organismos Gram negativos vs Gram positivos a muchos antibacterianos. Los antibióticos presentan dos vías para atravesar la membrana externa: una vía mediada por la bicapa lipídica para los antibióticos hidrófobos (macrólidos, aminoglucósidos, rifampicina, etc.) y otra vía mediada por porinas, que son proteínas que forman poros de tamaños específicos, para antibióticos hidrófilos ( $\beta$ -lactámicos, cloranfenicol). Las tetraciclinas y las quinolonas utilizan las dos vías para ingresar a la célula. Las características de permeabilidad de esta membrana dada por la composición de lípidos y proteínas tienen un alto impacto en la susceptibilidad de los microorganismos a muchos tipos de antibióticos, los cuales esencialmente tienen sus blancos de acción en el interior de la célula (ver Figura 2) (Troncoso *et al.*, 2017).

### ***Aumento de la Extrusión del Antibiótico por Bombas de Eflujo:***

Las bombas de eflujo son proteínas transportadoras involucradas en la extrusión de sustratos tóxicos (incluyendo todas las clases de antibióticos clínicamente relevantes) desde el interior celular hacia el ambiente externo. Estas proteínas son encontradas tanto en bacterias Gram negativas como Gram positivas y los genes que las codifican están localizados en cromosomas o plásmidos. Confiere resistencia a tetraciclinas, fluoroquinolonas, cloranfenicol,  $\beta$ -lactámicos, novobiocina, rifampicina, ácido fusídico, ácido nalixídico, antisépticos y desinfectantes de tipo amonio cuaternario (Olivaro, 2015).

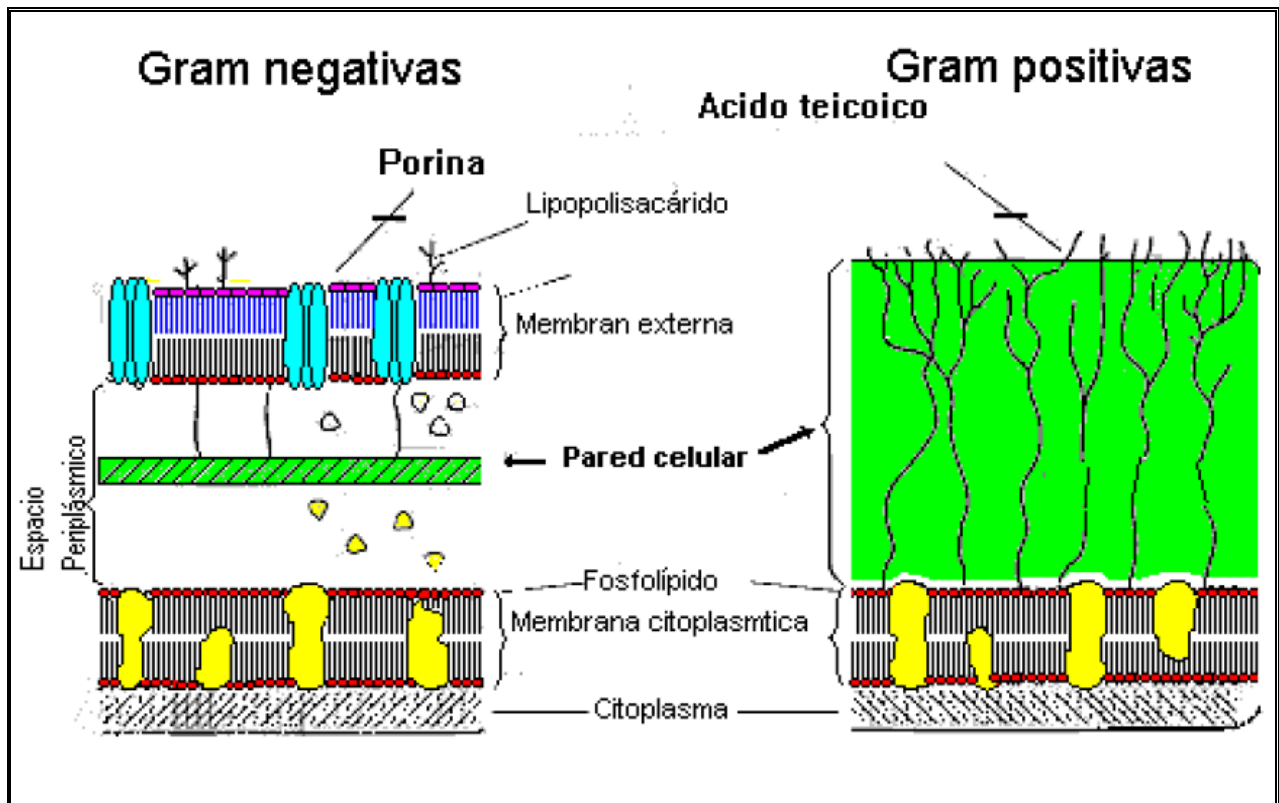


Figura 2. Estructuras de las Paredes Celulares de las Bacterias Gram negativas y Gram positivas. (Olivaro, 2015).

### Familia Asteraceae

Las asteráceas reúnen aproximadamente 23000 especies que se reparten en 1500 géneros, las plantas de estas familia se caracterizan por ser muy adaptables, ya que se pueden encontrar miembros de esta familia en diversas partes del mundo, muchas de ellas son de interés económico para el hombre como es el caso del girasol; la diversidad de plantas que encierra esta familia comprende hierbas anuales o perennes, arbustos, lianas, epifitas y plantas acuáticas; muchas de ellas han desarrollado la capacidad de defenderse de los herbívoros o sobrevivir a condiciones climáticas aridas o frio intenso (ver Esquema 2) (Izco, 2004).

## Esquema 2. Clasificación Taxonómica de la Familia Asteraceae.



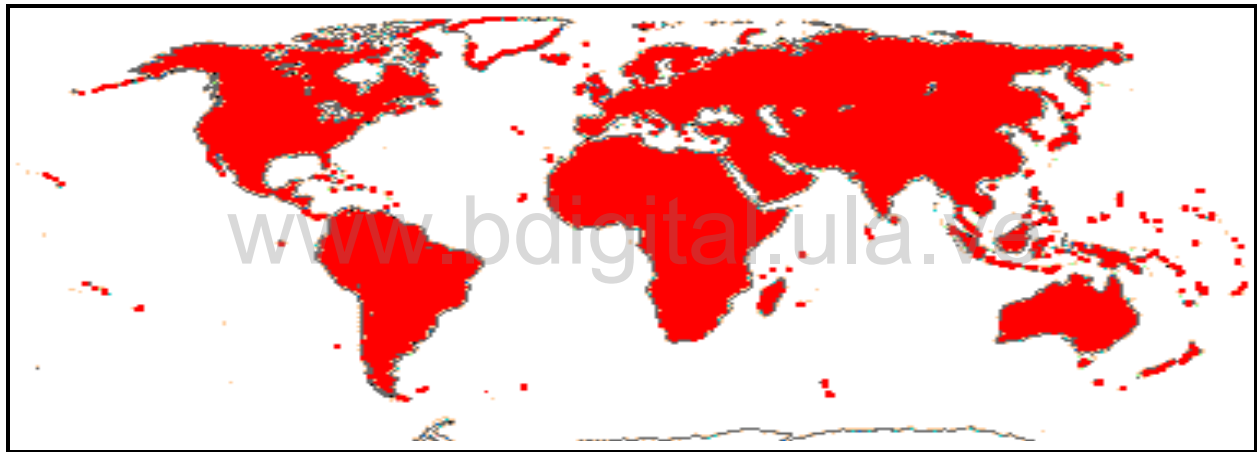
### Descripción Botánica de la Familia Asteraceae

Son plantas herbáceas anuales o perennes, más raramente arbustos o árboles. Se caracterizan por presentar las flores agrupadas en capítulos, inflorescencia que funcionalmente se comporta como una flor. Hojas sin estípulas, generalmente alternas, en ocasiones en roseta basal; pueden presentar espinas. La inflorescencia es un capítulo, que consiste en una estructura ensanchada (receptáculo) donde se sitúan desde una a cientos de flores, rodeadas por las brácteas del involucre. El receptáculo puede ser plano, cóncavo o convexo y tener escamas o pelos entre las flores (Izco, 2004).

Las flores hermafroditas, unisexuales o estériles. Sin cáliz o con éste reemplazado por vilano de pelos o escamas; los pelos pueden ser lisos, escábridos o plumosos. Corola formada por 5 pétalos soldados; puede ser tubulosa, con forma de tubo (flósculos o flores flosculosas) o de lengüeta con 3 o 5 dientes (lígulas o flores liguladas). En un mismo capítulo todas las flores pueden ser flosculosas (*Cirsium*), todas liguladas (*Taraxacum*) o una combinación de flosculosas y liguladas (*Anthemis*). Androceo formado por 5 estambres epipétalos soldados por sus anteras (singénésicos). Son plantas entomógamas. El gineceo es ínfero y unilocular. El fruto tipo aquenio o cipsela (Izco, 2004).

### **Distribución Geográfica de la Familia Asteraceae**

Las Asteráceas (Compositae) constituyen un grupo claramente monofilético en el que se reconocen actualmente cerca de 1500 géneros y unas 23000 especies. Entre ellas se cuentan desde plantas perfectamente adaptadas a vivir en las zonas alpinas de las montañas más elevadas, hasta elementos cactiformes capaces de sobrevivir en zonas desérticas; además, la familia comprende plantas de extraordinario interés económico para el hombre y numerosos taxones empleados habitualmente en jardinería (Izco, 2004). Está ampliamente distribuida por todo el mundo (cosmopolita) pero se halla mejor representada en regiones semiáridas, tropicales y subtropicales (Figura 3) (Heywood, 1985).



**Figura 3. Distribución Geográfica de la Familia Asteraceae.** (Heywood, 1985).

### **Usos Generales de la Familia Asteraceae.**

El capítulo de las Asteráceas es una unidad ecológica que atrae polinizadores sobre todo por el efecto visual, incrementado por flores reunidas en densas y conspicuas agrupaciones. Así, el néctar y el polen ofrecido a prónubos y oportunistas están reunidos en un breve espacio, facilitando su tarea y optimizando el consumo energético. La apicultura de casi todo el mundo debe gran parte de la producción de néctar y polen de ecosistemas naturales y agroecosistemas a la diversidad y al predominio de asteráceas en la vegetación natural y en la agricultura; en algunos

lugares son su principal fuente y dan grandes mieladas junto a especies de fabáceas, mirtáceas, etc. (Del Vitto & Petenatti, 2015).

Ahora bien, numerosas Asteráceas son promisorias como hortalizas, pero contienen principios amargos (que inducen baja palatabilidad) o tóxicos. Las que resultan comestibles presentan bajos niveles de toxinas, o han sufrido intensa selección artificial, como los diversos cultivares de “lechuga” (*Lactuca sativa*), nativa del sur de Europa que es hoy el tercer cultivo hortícola en Argentina. Etnias locales emplean el follaje de otras Asteráceas, como especies de *Achillea*, *Acmella*, *Adenocaulon*, *Arctium*, *Artemisia*, *Aster*, *Guizotia*, *Heteropappus*, *Silybum* y *Senecio*. El “yacón” o “aricoma” de los Andes centro y sudamericanos (*Smallanthus sonchifolius*) es una hierba cuyas hojas se usan en medicina popular en tanto que la harina de los rizomas se recomienda en dietas hipocalóricas y para diabéticos por sus fructooligosacáridos (Sánchez & Genta, 2007).

Por otra parte, estudios etnobotánicos y etnofarmacológicos de plantas de todo el mundo han revelado el uso terapéutico y las propiedades de gran cantidad de Asteráceas. Son riquísimas en sustancias bioactivas y participan tanto en la medicina popular, donde constituyen una tradición acendrada como en la formulación de medicamentos herbarios e industriales. Asimismo, muchas son ampliamente cultivadas en parques y jardines, sobre todo por el atractivo de sus inflorescencias, follaje o fructificación. Algunas de estas plantas resultan muy decorativas ya que todas o casi todas las flores de la inflorescencia son liguladas, dando lugar a vistosos capítulos “compactos” o “dobles”, como en la mayoría de las especies de *Dahlia*, *Dendranthema* (el “crisantemo” de los floristas) y *Gerbera*, entre otras (Del Vitto & Petenatti, 2015).

En el caso de las Asteráceas arbóreas no son numerosas y, en general, su distribución se limita a las zonas tropicales. No participan del mercado maderero porque no alcanzan dimensiones suficientes, salvo algunas especies de *Brachylaena*, del oriente africano y Madagascar, que rinden maderas fragantes, semejantes a las de “sándalo”, aptas para pisos, mueblería y construcciones durables. Entre las especies de

interés ganadero, con alto valor energético como forraje, destaca el “topinambur” (*Helianthus tuberosus*), llamado también “papa chanchera” porque los cerdos pueden extraer los tubérculos por sus propios medios, ahorrando el uso de maquinaria. El follaje de otras Asteráceas es alimento para el ganado, a veces por su alto valor proteico como en el “mirasol” o “botón de oro” (*Tithonia diversifolia*) y las “toras” blanca (*Verbesina turbacensis*), originarias de América Central (Del Vitto & Petenatti, 2015).

Es importante resaltar, la acción de algunas Asteráceas como insecticidas, pues en momias egipcias se han hallado capítulos pulverizados de plantas de la tribu Anthemideae, con posible función insecticida para preservar el cuerpo embalsamado. En agricultura se ha comenzado a aplicar metabolitos secundarios de Asteráceas y otras plantas en el control de plagas, que a diferencia de los compuestos sintéticos no generan resistencia en los parásitos y son ecológicamente menos riesgosos (Del Vitto & Petenatti, 2015).

### **Género *Tithonia***

El género *Tithonia*, cuenta con más de 10 especies, es originario de Centroamérica pero se encuentra ampliamente distribuido en el área tropical de diferentes continentes, lo que le confiere una gran plasticidad ecológica. Es comúnmente aceptado que su centro de origen es América Central o México, aunque no se descarta que lo sea América del Sur. Ha sido reportada en Cuba, las Filipinas, Kenia, India, Celián, Sur de México, Guatemala, el Salvador, Costa Rica, Honduras, Panamá, Colombia y Venezuela, con diferentes nombres y usos incluida la nutrición animal (Pérez *et al.*, 2009). Este género es frecuente en Venezuela, tanto en jardines como plantas semi-silvestres, y pueden hallarse en zonas cálidas como en zonas de clima templado (Cruz & Vela, 2011).

### **Especie *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray**

Es una planta herbácea de la familia Asteraceae, tribu Heliantheae y subtribu Helianthinae originaria de Centro América. Tiene un amplio rango de adaptación, tolera condiciones de acidez y baja fertilidad en el suelo. Comúnmente conocida como botón de oro, falso girasol o girasol mexicano, goza de una amplia adaptación edafoclimática pues ha sido reportada en más de 50 países. Es además una especie con buena capacidad de producción de biomasa, rápido crecimiento y baja demanda de insumos y manejo para su cultivo. Presenta características nutricionales importantes que la han considerado como una especie con potencial en alimentación animal (Rivera *et al.*, 2018).

Por lo tanto, se ha reportado su uso en la apicultura y alimentación de vacas, conejos, curíes, ovejas y cerdos. También se siembra como cerca viva para rodear sitios donde se ubican colmenas y áreas de bosque para protección de fuentes de agua. Se utiliza también como especie ornamental y en parcelas de producción agrícola con alta diversidad para atraer insectos benéficos. En Costa Rica se está utilizando *T. diversifolia* a nivel experimental para incrementar la producción de frijol en barbechos mejorados. Se considera que esta especie aporta nutrientes en especial fósforo, para el desarrollo del frijol. En Filipinas se utiliza como abono verde en cultivos de arroz (Rivera *et al.*, 2018).

### **Características Botánicas de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray**

Es una planta herbácea o arbustiva robusta, que pertenece al reino Plantae (ver Esquema 3) (Pérez *et al.*, 2009), su altura aproximada esta entre 1,5 y 4,0 metros; su tallo es erecto con ramificaciones, las ramas más tiernas poseen pelillos en la superficie esto se pierde con el tiempo; sus hojas están alternadas y pecioladas, las hojas miden hasta 20 centímetros de largo y de ancho, pueden poseer de 3 a 5 lóbulos, las bases pueden estar en ocasiones algo truncadas, pero muy angosta a lo largo del peciolo, y en cuya base se amplía en dos lóbulos pequeños, la cara superior de la hoja puede

estar cubierta por pelos de base hinchada con abundantes pelillos y con algunos puntos glandulares en la cara interior (Pérez *et al.*, 2009; González-Castillo *et al.*, 2014).

En cuanto a la inflorescencia, se presenta en capítulos formados por flores sésiles, estas se disponen sobre un receptáculo convexo, en su superficie posee brácteas rígidas, puntiagudas que pueden tener hasta 11 mm de largo que rodean las flores del disco; las flores van de 12 a 14, son liguladas, se ubican en la periferia de la cabezuela, la corola de hasta 6 cm de largo, es un tubo ubicado en la base y llega hasta el ápice en forma de un pétalo de una flor sencilla y puede ser de color amarillo o anaranjado y puede tener de 2 a 3 dientes en el ápice. Las flores de disco son numerosas, hermafroditas, que se ubican en la parte central (Pérez *et al.*, 2009; González-Castillo *et al.*, 2014).

### Esquema 3. Clasificación Taxonómica de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray.

<p><b>Reino:</b> Plantae.</p> <p><b>Subreino:</b> Traqueobionta.</p> <p><b>División:</b> Magnoliophyta.</p> <p><b>Clase:</b> Magnoliopsida.</p> <p><b>Subclase:</b> Asteridae.</p> <p><b>Orden:</b> Asterales.</p> <p><b>Familia:</b> Asteraceae.</p> <p><b>Género:</b> <i>Tithonia</i>.</p> <p><b>Especie:</b> <i>diversifolia</i>.</p>	
--	---

### Nombres Comunes de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray

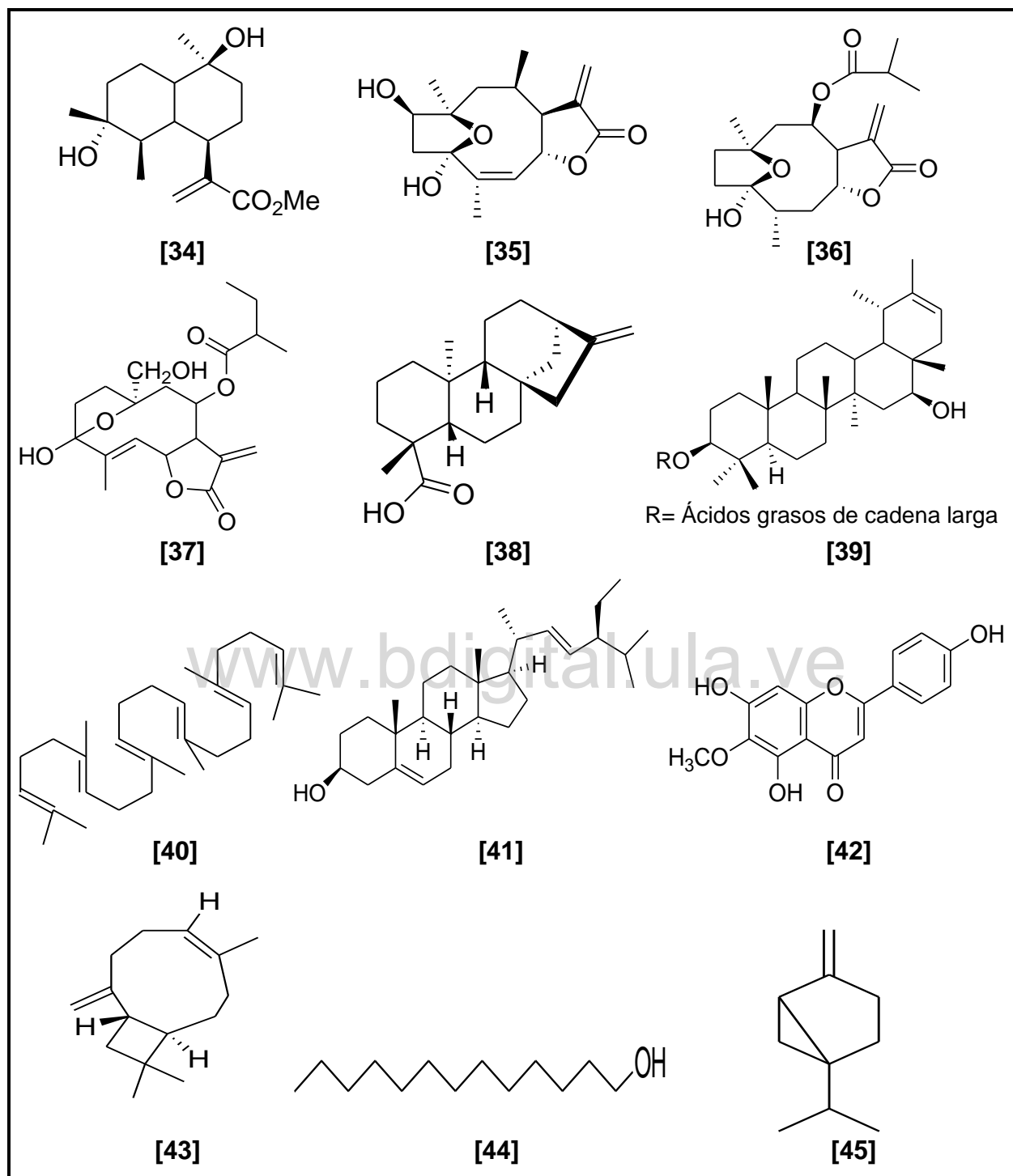
En Guatemala se conoce con los nombre de mirasol, quil amargo y saján grande, en Venezuela como tara, taro (Estados Carabobo y Aragua), flor amarillo (Estado Portuguesa) y árnica (Estados Trujillo y Mérida). En Colombia se denomina mirasol, botón dorado, girasola, gamboa, y botón de oro y en Cuba margaritona o árnica de la tierra, también se conoce como girasol silvestre, o Flor de sol mexicana (González-Castillo *et al.*, 2014).

## Composición Química de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray

Según Chagas *et al.*, (2012) la especie *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray es una fuente importante y natural de diversos productos, particularmente lactonas sesquiterpénicas, diterpenos, flavonoides y saponinas, razón por la cual pueden modificar las poblaciones microbianas a nivel de rumen sin afectar la digestibilidad y aprovechamiento de los nutrientes en la dieta. Dentro de estos grupos se ha reportado la presencia de un análogo del ácido artemisinico [34]. La artemisinina es una lactona sesquiterpénica con un puente endoperóxido de la planta *Artemisia annua*, derivados de este compuesto se han utilizado en el tratamiento de la malaria (Bordoloi *et al.*, 1996; González, 2005). Asimismo, se ha reportado la presencia de tagitinin A [35] y tirotundin [36] (Ambrosio *et al.*, 2008). Por su parte Obafemi *et al.*, (2006) identificaron del extracto de las hojas de la *T. diversifolia* un germacranolido [37] tipo lactona sesquiterpénica, la cual ha demostrado actividad antibacteriana y antifúngica.

Por otro lado se ha reportado la presencia del ácido kaurénico [38] de las hojas de la especie en estudio y de las flores ácidos grasos como el éster de faradiol [39], escualeno [40] y estigmasterol [41] y un flavonoide la hispidulina [42] (Ambrosio *et al.*, 2008; Rasaga *et al.*, 2007) (ver Cuadro 6). Ahora bien, Wanzala *et al.*, (2016) caracterizaron el aceite esencial de las partes aéreas frescas de *T. diversifolia*, donde mostró una composición compleja de aproximadamente 50 compuestos, una mezcla de monoterpenos y sesquiterpenos, 54% y 46%, respectivamente. Entre estos el  $\alpha$ -pineno [1] se produjo en la mayor cantidad (63,64%), seguido del  $\beta$ -pineno [2], isocariofileno [43], (*E*)-nerolidol [10], 1-tridecanol [44], limoneno [6], sabineno [45], entre otros (ver Cuadros 1 y 6). Estos compuestos pueden ser útiles en el futuro en las industrias farmacéutica, agrícola, alimentaria y de perfumería.

**Cuadro 6. Compuestos Aislados de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray.**



## Hipótesis de la Investigación

En vista de que existen estudios realizados con anterioridad, que demuestran la alta potencialidad de los géneros pertenecientes a la familia botánica Asteraceae, en lo que se refiere a su capacidad de biosintetizar compuestos volátiles, es posible encontrar en las hojas y flores de la especie *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, compuestos volátiles estructuralmente relacionados con los que hasta ahora se han reportado en géneros de la familia Asteraceae.

Puesto que en investigaciones realizadas anteriormente se comprobó la eficiencia de los metabolitos secundarios obtenidos de las hojas y flores de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray perteneciente a la familia Asteraceae, contra bacterias grampositivas y gramnegativas, es posible que los aceites esenciales extraídos de dicha especie posean actividad antibacteriana contra cepas de referencia ATCC.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## Operacionalización de Variables

La operacionalización de variables es el proceso a través del cual se observan las propiedades del objeto de estudio que no son cuantificables, se llevan a una expresión que las hace más directamente medible. Según Hernández *et al.*, (2010) definen las variables como una propiedad que puede variar y que esa variación puede ser observada o medida; esta se aplica a un grupo de personas u objetos, y estas adquieren diversos valores o manifestaciones en relación a la variable.

**Variable Dependiente:** Actividad antibacteriana contra bacterias grampositivas y gramnegativas ATCC.

**Variable Independiente:** Composición química del aceite esencial de las hojas y flores de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae).

**Variable Interviniente:** Metodología e instrumentos utilizados en el cultivo de las bacterias y uso de la técnica.

El investigador define tanto conceptualmente como operacionalmente a la variable, para indicar a cualquier persona que lea la investigación que pasos debe seguir para medirla (Toro & Parra, 2006). La operacionalización de las variables estudiadas se representa en la Tabla 3.

**Tabla 3. Operacionalización de las Variables.**

<b>Objetivos Específicos</b>	<b>Variables</b>	<b>Dimensiones</b>	<b>Indicadores</b>
Extraer el aceite esencial de las hojas y flores de la especie <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray, por hidrodestilación empleando la Trampa de Clevenger.	Aceites esenciales de hojas y flores	Características organolépticas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Color</li> <li>- Olor</li> <li>- Sabor</li> <li>- Solubilidad</li> </ul>
Separar e identificar los compuestos de los aceites esenciales obtenidos, por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.	Compuestos presentes en los aceites esenciales	Moléculas activas en el ámbito medicinal  Conservación	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Monoterpenos</li> <li>- Sesquiterpenos</li> <li>- Alcoholes</li> <li>- Fenoles simples</li> <li>- Lactonas sesquiterpénicas</li> <li>- Diterpenos</li> </ul> Luz, envase y temperatura
Calcular los índices de Kováts de los compuestos identificados.	Compuestos presentes en los aceites esenciales	Tiempos de retención	Valores publicados en la literatura
Analizar la actividad antibacteriana de los compuestos volátiles extraídos de la <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray, a través del método de difusión en agar con disco frente a cepas de referencia ATCC.	Actividad antibacteriana	Cepas grampositivas  Cepas gramnegativas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Stapylococcus aureus</i></li> <li>- <i>Enterococcus faecalis</i></li> <li>- <i>Escherichia coli</i></li> <li>- <i>Klebsiella pneumoniae</i></li> <li>- <i>Pseudomona aeruginosa</i></li> </ul>
Establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los aceites con actividad antibacteriana de la especie <i>Tithonia diversifolia</i> (Hemsl.) A. Gray, en cepas ATCC.	Concentración mínima inhibitoria	Actividad antibacteriana obtenida	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bacterias grampositivas</li> <li>- Bacterias gramnegativas</li> </ul>

## **CAPITULO III**

### **MARCO METODOLÓGICO**

#### **Enfoque de la Investigación**

La presente investigación se planteó en un enfoque mixto, en el que se presentaron los resultados tanto cualitativos como cuantitativos, siempre buscando la consistencia entre ellos para evitar contradicciones o paradojas, ya que ambos enfoques se entremezclan y complementan durante todo el proceso de investigación (Gómez, 2006).

#### **Tipo de Investigación**

La investigación fue definida bajo un tipo de investigación confirmatoria, ya que se basó en demostrar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de las hojas y flores de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, así como los componentes químicos presentes en los aceites.

#### **Diseño de la Investigación**

Según Arias (2012) el diseño de investigación “es la estrategia general que adopta el investigador para responder al problema planteado” (p. 27). Al respecto, la presente investigación se basó en un diseño de laboratorio o experimental. La investigación experimental es: “un proceso que consiste en someter a un objeto de estudio o grupo de individuos a determinadas condiciones, estímulos o tratamiento (variable independiente), para observar los efectos o reacciones que se producen (variable dependiente)” (p. 34). Es importante señalar que este estudio se realizó en un lapso de tiempo determinado. Por lo tanto también es un tipo de diseño de investigación transversal, según Hernández *et al.*, (2010), porque los datos se recolectan en un solo momento, en un tiempo único.

## Población y Muestra

En el caso objeto de estudio de la presente investigación, la población fue constituida por la especie *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. (Asteraceae) recolectada en el Municipio Julio Cesar Salas, Sector El Aguacil a 100 metros del puente junto al río, Zona Panamericana (zona cálida), Estado Mérida- Venezuela. De la población señalada se tomó una muestra no probabilística. La muestra estuvo integrada por la recolección de dos (2) kilos de hojas y dos (2) kilos de flores frescas de la especie vegetal. La determinación botánica se realizó en el herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes, con la ayuda de un taxónomo especialista, la Ing. María Rodríguez. Un voucher de cada muestra fue depositado bajos el número 01, para la extracción de los aceites esenciales y los ensayos de actividad antibacteriana (ver Figuras 4 y 5).



Figura 4. Planta *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. (Asteraceae).

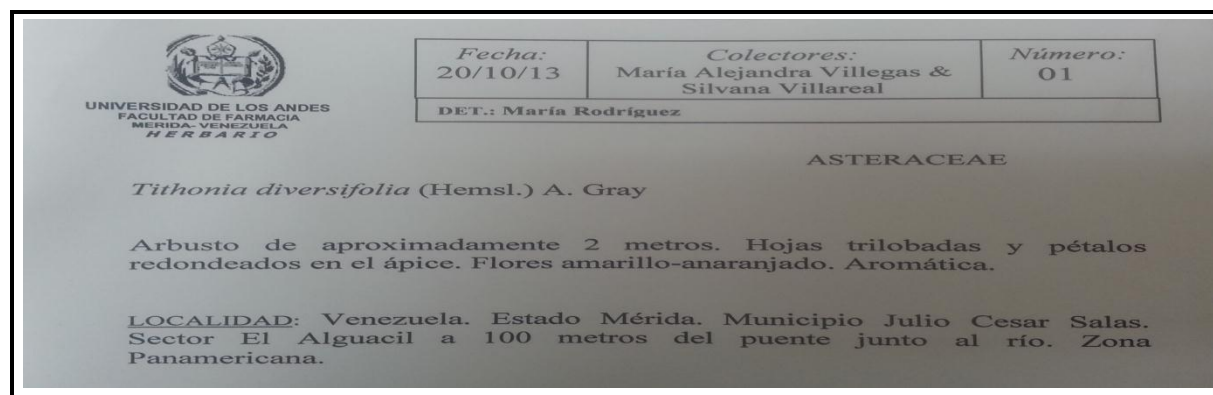


Figura 5. Voucher *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. (Asteraceae).

## Procedimiento de la Investigación

### **Extracción del Aceite Esencial de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray.**

Las hojas y flores frescas se separaron del resto del material vegetal y se licuaron, con la finalidad de romper las células que contienen el aceite aromático y aumentar así el rendimiento de la extracción. Ésta se realizó con un equipo de hidrodestilación, empleando la trampa de Clevenger. El proceso se realizó durante 3 horas, hasta obtener un aceite esencial de color característico de cada muestra. Los aceites obtenidos fueron guardados a baja temperatura de 4-6 °C, tomando la precaución de protegerlos de la luz y de la presencia de oxígeno, debido a que estos factores alteran la composición de las esencias oxidando los dobles enlaces y cambiando la configuración de algunos componentes (Takeoka *et al.*, 1986) (ver Esquema 4).

### **Técnicas para la Caracterización de los Compuestos Volátiles del Aceite Esencial de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray.**

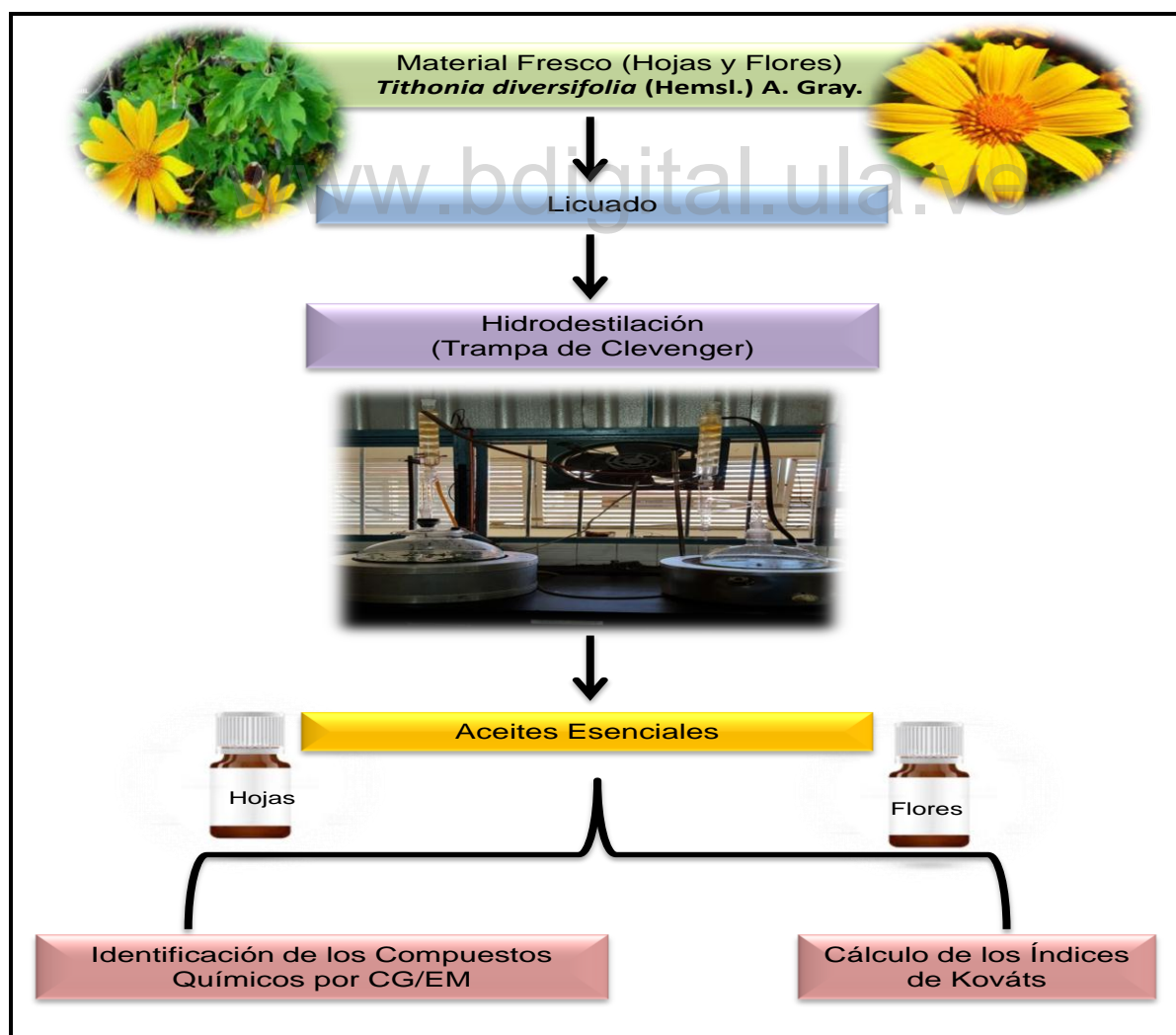
#### **Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)**

Las esencias obtenidas fueron analizadas por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) utilizando un cromatógrafo de gases marca Hewlett-Packard modelo 6898, con columna capilar HP-5 de 30 metros de largo y equipado con un detector de masa marca Hewlett-Packard modelo 5973. El espectro de masa muestra información sobre el patrón de fragmentación del compuesto, su masa molecular y porcentaje de similitud con los compuestos contenidos usando la base de datos Wiley MS Data Library 6th edición (Sandra & Bicchi, 1987). Para el análisis se preparó una solución de 20 µL de cada aceite en 1 mL de éter dietílico. De cada muestra se inyectó 1,0 µL. El programa de temperatura utilizado fue el siguiente: iniciándose en 60 °C durante cero (0) minutos, luego se incrementó a razón de 4 °C/min hasta 260 °C. El inyector se mantuvo a 200 °C. La relación de reparto fue de 1:100.

## Cálculo de los Índices de Kováts

El cálculo de los índices de Kováts se realizó en un cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer modelo Autosystem. Se compararon los tiempos de retención de los componentes de cada aceite esencial con una serie de *n*-parafinas (C<sub>7</sub>-C<sub>22</sub>) (Kováts, 1958). Los valores obtenidos se compararon con los valores publicados en la literatura (Adams, 1995; Davies, 1990). (Esquema 4). El estudio fitoquímico del aceite esencial de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, se realizó en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (IIFFB) de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela, bajo la asesoría del Dr. Luis B. Rojas.

**Esquema 4. Obtención de los Aceites Esenciales de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray.**



## Prueba de Susceptibilidad Antibacteriana

Para evaluar la actividad antibacteriana se empleó la técnica de difusión en agar con disco llamada también método de Kirby- Bauer, prueba que permite medir la susceptibilidad *in vitro* de microorganismos patógenos y fitopatógenos frente a una sustancia o a la mezcla de varias sustancias desconocidas de origen vegetal con potencial antimicrobiano (Prescott *et al.*, 2004). Se emplearon bacterias de referencia internacional: *Staphylococcus aureus* (ATCC 27922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Esta prueba se realizó en el Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Bioanálisis Clínico, Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo la asesoría de la Profesora Yndra Cordero de Rojas.

### Método de Difusión en Agar con Discos

**Preparación de las Placas:** Se depositaron aproximadamente 20 mL de agar Müeller-Hinton (HIMEDIA®) en placas de Petri (CLSI, 2014), suplementado con 2 % p/v de glucosa y azul de metileno (0,05 µg/mL) (NCLS, 2004). Luego las placas se dejaron solidificar a temperatura ambiente y se conservaron a 4 °C hasta su uso.

**Preparación de los Discos:** Se emplearon discos de papel de filtro de 2 mm de grosor por 6 mm diámetro, los cuales se organizaron en una placa de Petri y se esterilizaron con luz ultravioleta (LUV), durante toda la noche previa al ensayo. Posteriormente fueron impregnados con 10 µL de cada aceite por separado y de igual modo se impregnaron discos con el solvente utilizado (dimetil-sulfóxido DMSO), como control negativo.

**Preparación del Inóculo Microbiano:** Cada inóculo bacteriano se preparó en solución salina fisiológica (SSF) estéril (0,85 % p/v NaCl), a partir de un cultivo fresco de cada cepa bacteriana repicada en caldo Müeller-Hinton, con antibiótico control para cada cepa, hasta que se logró una turbidez correspondiente al patrón de McFarland N° 0,5 ( $1 \times 10^{6-8}$  UFC/mL, UFC: unidades formadoras de colonias).

**Inoculación:** Una vez preparado el inóculo de cada microorganismo, se sembró en la superficie del agar con un aplicador estéril. Se colocaron los discos de papel de filtro, previamente impregnados con los aceites y con el control negativo sobre la superficie del agar inoculado. También se colocó el disco estándar del antibiótico de referencia como control positivo según el microorganismo (Tabla 4).

**Incubación:** Después de haber colocado los discos en las placas con agar Müeller-Hinton éstas se dejaron a temperatura ambiente por 30 minutos (Pre-incubación); luego se incubó a 37 °C por 24 horas en posición invertida, en atmósfera aeróbica. Durante dicho tiempo las cepas inoculadas bacterias adquieren los nutrientes necesarios para su crecimiento, específicamente cuando alcanzan su fase exponencial o de multiplicación en la curva de crecimiento bacteriano.

**Lectura de los Ensayos:** Se realizó la lectura de los halos de inhibición a las 24 horas (Esquema 5). La medición de los diámetros de inhibición alrededor de los discos impregnados con los aceites, son producto de la acción antibacteriana y se expresaron en milímetros para luego realizar su comparación con las tablas de referencia permitiendo calificar a la cepa como resistente, intermedia o susceptible a los aceites empleados.

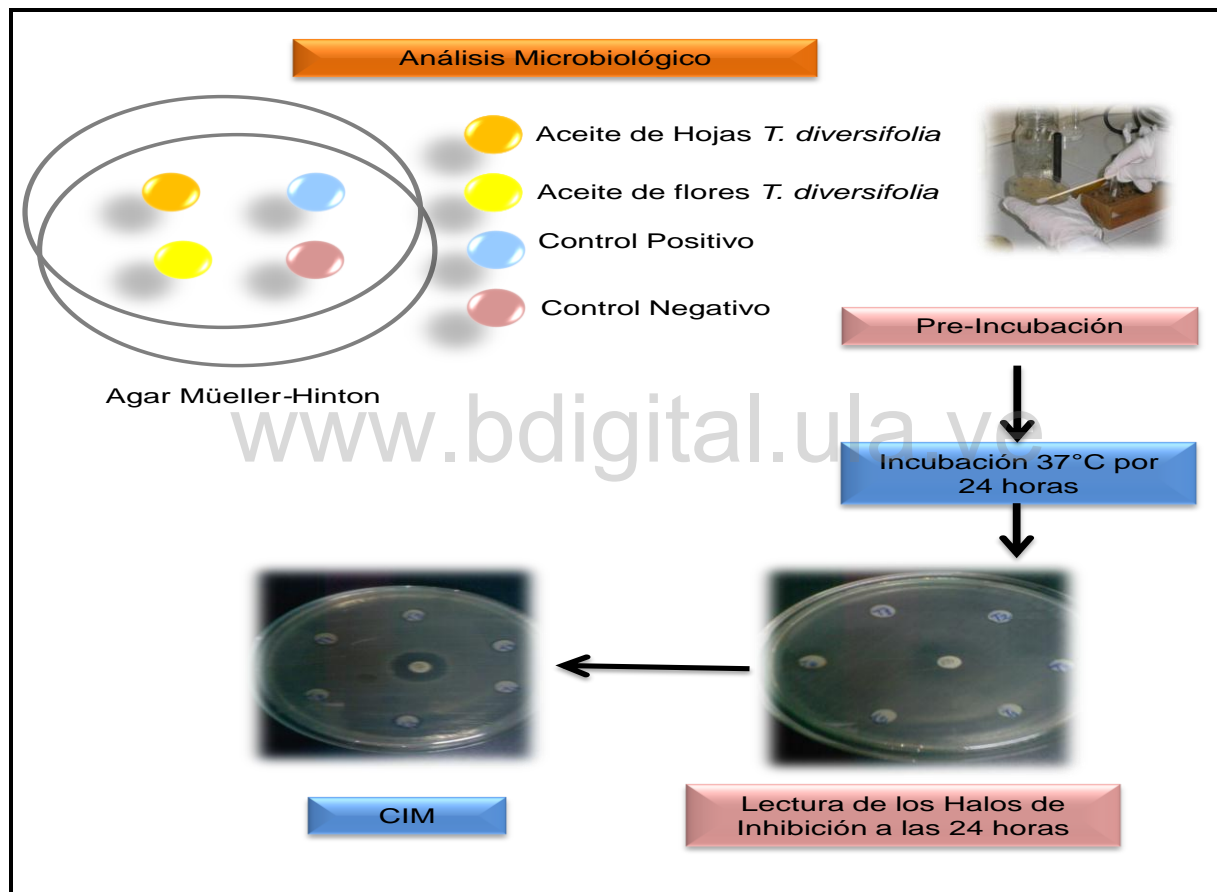
**Tabla 4. Microorganismos y Compuestos de Referencia Usados en la Prueba de Susceptibilidad Antibacteriana.**

Microorganismos	Compuestos de Referencia
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27922	Eritromicina 15 µg
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	Ampicilina 10 µg
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Piperacilina 100 µg
<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 23357	Piperacilina 100 µg
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Piperacilina 100 µg

(Rondón *et al.*, 2005; modificado).

**Concentración Inhibitoria Mínima (CIM):** Es la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo visible (CLSI, 2014). Este método consiste en enfrentar a las cepas de referencia a diferentes concentraciones de las muestras (Romero, 2007). La cual se realizó preparando diluciones de los aceites esenciales con DMSO, y se impregnaron discos con 10  $\mu$ L de cada dilución, para luego ser evaluados por el método de difusión en agar con discos (Esquema 5).

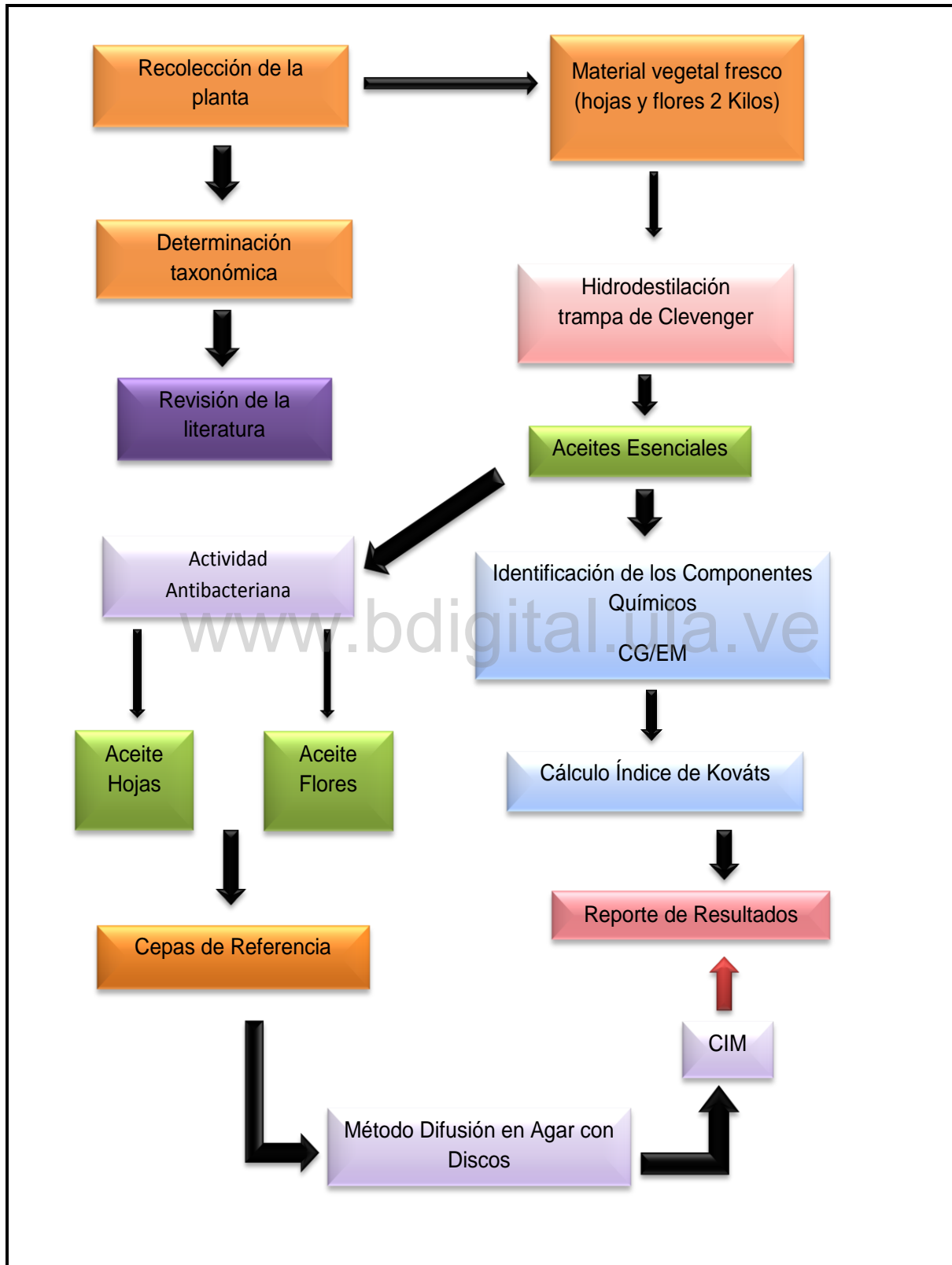
**Esquema 5. Análisis Microbiológico y Lectura de los Halos de Inhibición.**



### Organización de la Información

En tablas mediante números y gráficos. Finalmente, en el Esquema 6, se resumen todos los pasos desarrollados en orden metodológico para la obtención de la verificación de las hipótesis planteadas, a través de los materiales y métodos empleados.

## Esquema 6. Camino Metodológico.



## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### **Composición Química de los Aceites Esenciales de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl). A. Gray. (Asteraceae)**

En la extracción del aceite esencial de las hojas de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, se obtuvo 1,2 mL de aceite a partir 1 kg de hojas y 0,6 mL de aceite en relación a 1,320 kg de flores, ambas muestras recolectadas a las orillas del río, a 100 metros del puente en la comunidad de Aguacil Municipio Julio Cesar Salas del Estado Mérida, a finales del mes de febrero del 2018. En la identificación de compuestos volátiles presentes en las hojas, el cromatograma reportó 11 compuestos, los cuales representan el 98,39 % del total del aceite extraído de las hojas (Figura 6). Con respecto al aceite extraído de las flores se identificaron 12 compuestos, que representan el 96,45 % del aceite obtenido (Figura 7). Es importante señalar que debido a la ubicación geográfica, clima y estación en la que fue recolectada la planta para la extracción de los aceites esenciales, se puede comprender las diferencias en relación a la composición de los mismos, al compararlos con los reportados en la literatura (Ruiz *et al.*, 2015).

Los elementos que componen el aceite esencial de las hojas y flores de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl). A. Gray., se pueden observar en las Tablas 5 y 6 respectivamente, donde se listan todos los componentes químicos en orden de elución en la columna HP-5. Además están reportados los Índices de Kováts calculados y los de referencia. La abundancia relativa de cada componente y el grado de similitud con los componentes consultados en las bibliotecas digitales del sistema CG-EM. Las muestras se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría. La identificación de los componentes se realizó a partir de sus espectros de masas, los índices de retención y

los índices de Kóvats, comparando con datos de la literatura (Adams, 1995), con compuestos testigos o con datos propios.

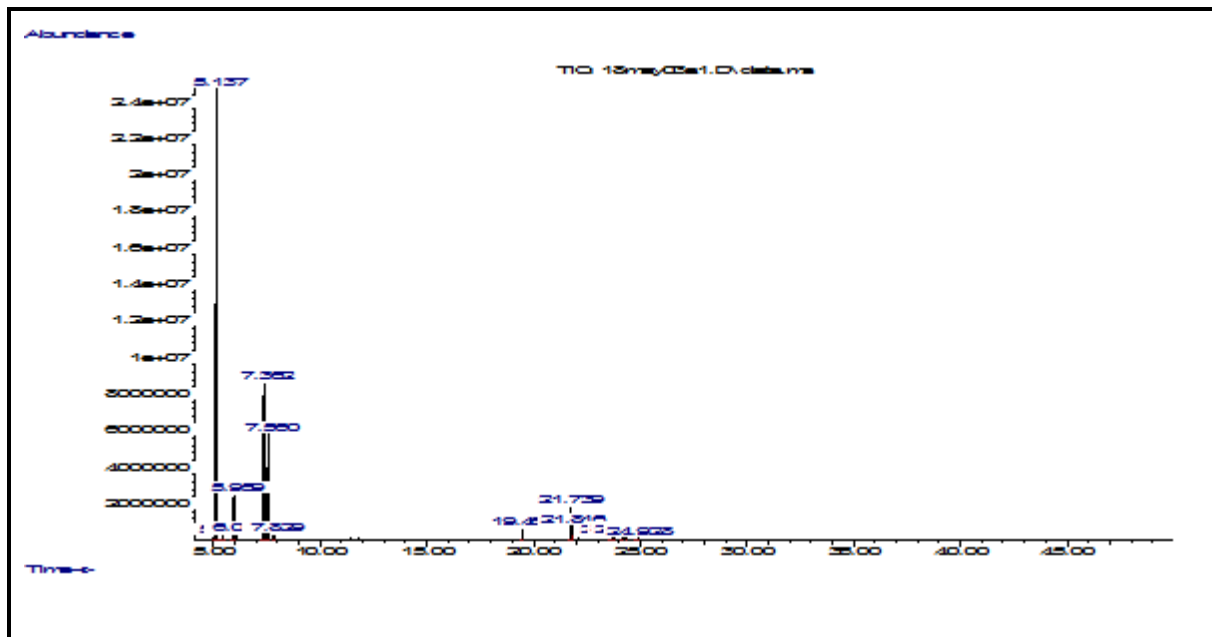


Figura 6. Cromatograma del Aceite Esencial de las Hojas de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl). A. Gray.

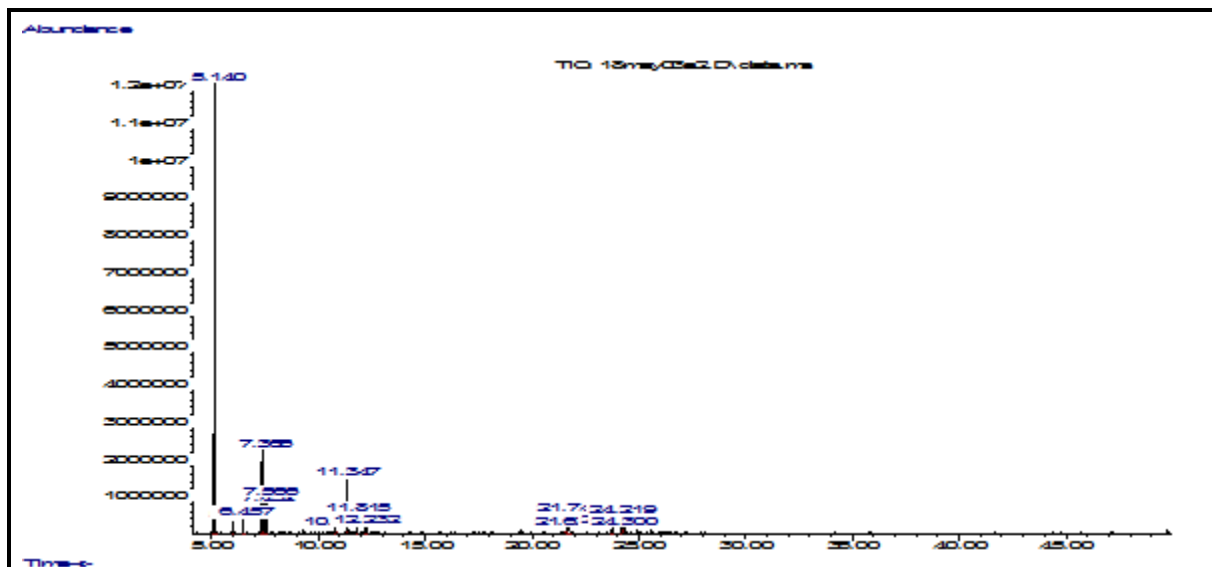


Figura 7. Cromatograma del Aceite Esencial de las Flores de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl). A. Gray.

**Tabla 5. Componentes del Aceite Esencial de las Hojas de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl). A. Gray.**

Picos	Componentes	TR (min)	Área (%)	IKcal	IKtab
1	$\alpha$ -pineno	5,139	54,44	939	939
2	camfeno	5,429	0,45	951	946
3	sabineno	5,958	4,03	970	976
4	$\beta$ -pineno	6,049	0,48	973	980
5	limoneno	7,365	19,26	1014	1031
6	trans- $\beta$ -ocimeno	7,564	10,90	1019	1040
7	$\beta$ -cariofileno	19,472	1,43	1419	1418
8	$\alpha$ -farneseno	21,740	4,17	1499	1505
9	biciclogermacreno	21,814	1,90	1501	1494
10	espatulenol	24,197	0,88	1576	1576
11	Ledol	24,363	0,54	1581	1602

TR: Tiempo de Retención, IKcal: Índice de Kováts calculado, IKtab: Índice de Kovats referencial.

**Tabla 6. Componentes del Aceite Esencial de las Flores de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl). A. Gray.**

Picos	Componentes	TR (min)	Área (%)	IKcal	IKtab
1	$\alpha$ -pineno	5,140	53,55	940	939
2	$\beta$ -fellandreno	5,976	1,44	971	1025
3	limoneno	7,366	11,57	1014	1031
4	1,8-cineol	7,449	3,68	1016	1026
5	trans- $\beta$ -ocimeno	7,565	4,42	1019	1040
6	2,4-hexadienal	11,347	8,99	1166	907
7	Terpineno-4-ol	11,819	3,05	1180	1177
8	$\alpha$ -terpineol	12,232	1,08	1193	1189
9	Hexadeceno (1)	21,617	1,27	1595	1589
10	$\alpha$ -farneseno	21,749	3,17	1499	1505
11	<i>E</i> -Nerolidol	23,768	1,32	1563	1564
12	espatulenol	24,215	2,91	1577	1576

TR: Tiempo de Retención, IKcal: Índice de Kováts calculado, IKtab: Índice de Kovats referencial.

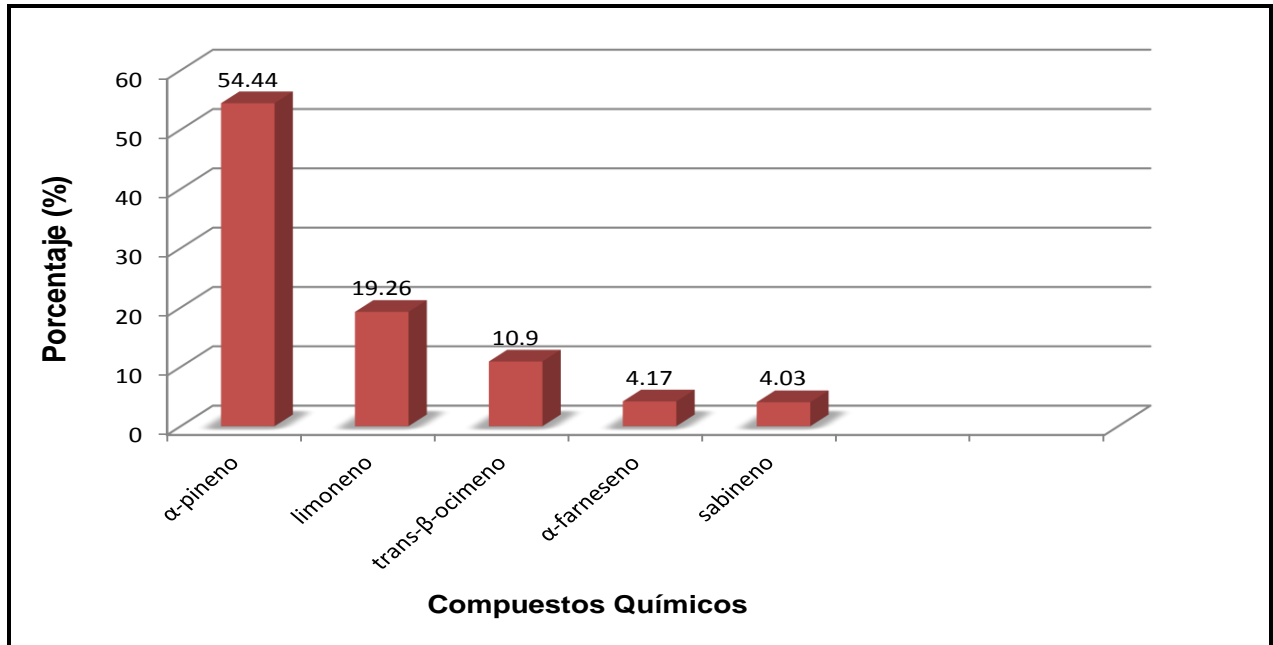
En relación a los 11 compuestos identificados del aceite esencial de las hojas de *T. diversifolia*, se reconocieron los siguientes compuestos como mayoritarios:  $\alpha$ -pineno (54,44 %), limoneno (19,26 %), trans- $\beta$ -ocimeno (10,90 %),  $\alpha$ -farneseno (4,17 %) y el sabineno (4,03 %) (Gráfico 1); estos compuestos han sido identificados en diferentes investigaciones realizadas a plantas pertenecientes a la familia Asteraceae:  $\alpha$ -pineno,

limoneno,  $\beta$ -cariofileno y espatulenol, por ejemplo son compuestos presente en el aceite esencial de *Achyrocline ramosissima* Britton ex. Rusby, los cuales fueron sometidos a ensayos de actividad antimicrobiana dando como resultado que los mismos, poseen una significativa actividad antibacteriana contra bacterias grampositivas patógenas para el ser humano (Buitrago *et al.*, 2016).

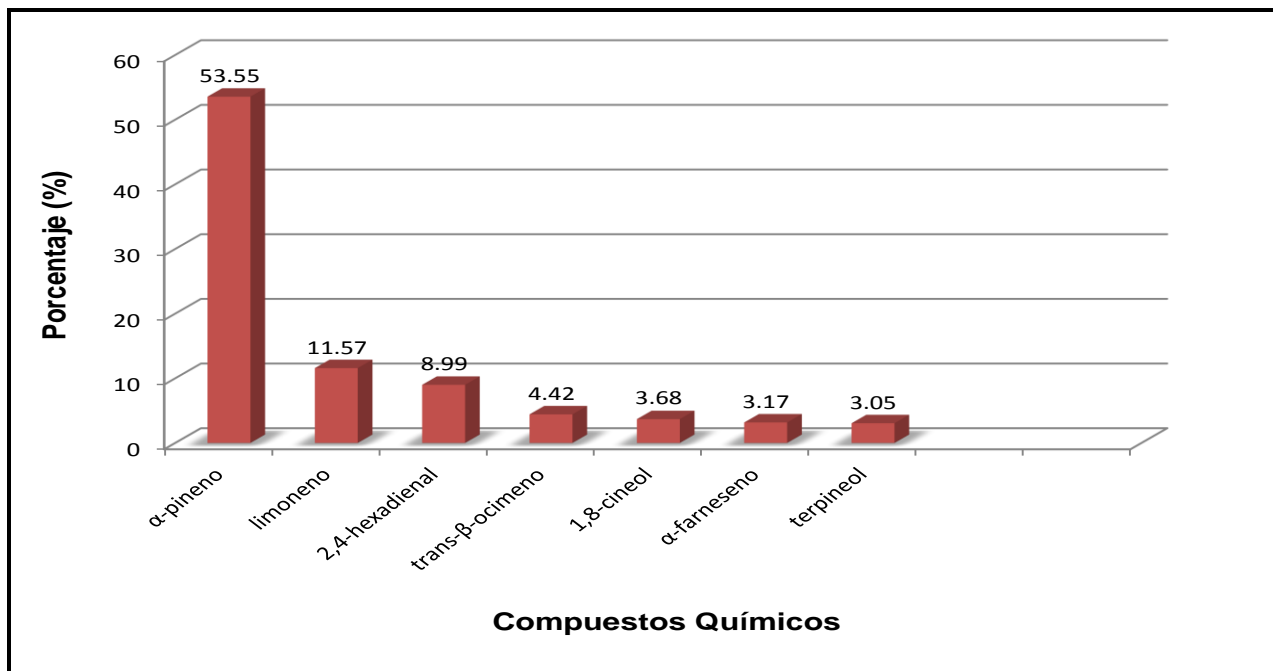
Por su parte, el estudio realizado a la especie *Senecio ventanensis* (Asteraceae), donde los compuestos del aceite esencial reportados coinciden en cuatro con la especie estudiada, como: espatulenol,  $\alpha$ -pineno, limoneno y  $\beta$ -pineno (Alza y Murray, 2016); asimismo, dichos compuestos se encuentran presente en la *Espeletia shultzii* Wedd (Asteraceae) (Alarcón *et al.*, 2016). Por lo antes expuesto, se puede asumir que los miembros de la familia Asteraceae indistintamente pueden compartir compuestos en común en la constitución de sus aceites esenciales. Con respecto a la composición de los aceites esenciales de las hojas de la *T. diversifolia*, en estudios previos han presentado similitud en 9 compuestos de los 11 con los anteriormente aislados:  $\alpha$ -pineno, espatulenol, sabineno,  $\beta$ -pineno, limoneno, trans- $\beta$ -ocimeno, trimetibiciclo,  $\beta$ -cariofileno, biciclogermacreno y camfeno (Dorcas *et al.*, 2007).

Ahora bien, de los 12 compuestos volátiles identificados en el aceite de las flores de *T. diversifolia* se reconocieron los siguientes compuestos como mayoritarios:  $\alpha$ -pinene (53,55 %), limonene (11,57 %), 2-4-hexadienal (8,99%), trans- $\beta$ -ocimeno (4,42 %), 1,8-cineol (3,68 %),  $\alpha$ -farneseno (3,17 %) y el terpineol (3,05 %) (Gráfico 2). Debido a los resultados obtenidos, al igual que en el aceite esencial de las hojas, se puede asumir que gran parte de los compuestos presentes en el aceite de las flores, se encuentran presentes en otros miembros de la familia Asteraceae, como es el caso del limoneno, espatulenol (Buitrago *et al.*, 2016),  $\alpha$ -pineno (Oliva *et al.*, 2018) y  $\beta$ -pineno (Alarcón *et al.*, 2016).

**Gráfico 1. Principales Componentes del Aceite Esencial de las Hojas de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray.**



**Gráfico 2. Principales Componentes del Aceite Esencial de las Flores de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray.**



Con respecto a los estudios realizados al aceite esencial de las flores de *Tithonia diversifolia*, se llevó a cabo una investigación por parte de Dorcas *et al.*, (2007) titulada: Identificación de los Principales Compuestos Volátiles en la Hoja y Flor de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, en este estudio se muestran el aislamiento de 72 compuestos en el aceite de las flores de estos coinciden con la composición de las flores del presente estudio cuatro (4) compuestos que son:  $\alpha$ -pineno, limoneno, 1,8-cineol y el espatulenol.

Además, la presente investigación se correlaciona con los resultados aportado por Wanzala *et al.*, (2016) donde los aceites esenciales de las partes aéreas frescas de la *Tithonia diversifolia* del oeste de Kenia, fueron analizados por CG/EM, donde el  $\alpha$ -pineno se produjo en la mayor cantidad (63,64%). Se concluye que con la naturaleza de aplicaciones multipotenciales descritas de la especie botánica *T. diversifolia*, sus metabolitos secundarios pueden ser útiles en el futuro en las industrias farmacéutica, agrícola, alimentaria y de perfumería.

www.bdigital.ula.ve

### **Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de Hojas y Flores de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray.**

Se estudió la actividad antibacteriana a través del método de difusión en agar con discos o método de Kirby Bauer y la concentración inhibitoria mínima (CIM), se determinó por medio del método de difusión radial, haciendo uso de diferentes concentraciones de los aceites esenciales de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. Las bacterias utilizadas en el ensayo microbiológico fueron cepas ATCC que englobaron 5 microorganismos de importancia clínica.

En el ensayo preliminar de los aceites puros de las hojas y flores de la especie en estudio, se determinó que el aceite obtenido de las hojas no tenía una capacidad inhibitoria significativa, por su parte el aceite obtenido de las flores demostró tener una capacidad de inhibición significativa (Tabla 7); por lo que el aceite de las flores se

sometió al ensayo por el método de Kirby Bauer y concentración inhibitoria mínima (CIM).

**Tabla 7. Ensayo Preliminar de los Aceites Esenciales Puros de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray.**

Muestras	Microorganismos				
	<i>S. aureus</i> 27923	<i>E. faecalis</i> 29212	<i>E. coli</i> 25922	<i>K. pneumonia</i> 23357	<i>P. aeruginosa</i> 27853
Aceite Puro 10µL					
Flores	IND	IND	+30	+ 30	0
Hojas	IND	IND	0	10	0

IND: Inhibición no definida (No hay crecimiento bacteriano). +: Actividad significativa. 0: no hubo halo de inhibición.

De este modo, los resultados de la actividad antibacteriana del aceite esencial de las flores de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, reportado en la Tabla 7, revelan que dicho aceite es efectivo contra bacterias Gram negativas y Gram positivas. Con respecto a las cepas Gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Klebsiella pneumonia* (ATCC 23357); de estas cepas los resultados de inhibición positivos significativos se obtuvieron para *E. coli* (ATCC 25922) con un halo de inhibición de 7mm y una CIM de 12,5 ppm. Por su parte, las cepas Gram positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 27923) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), los resultados positivos significativo se obtuvieron para *E. faecalis* (ATCC 29212) con un halo de inhibición de 7 mm y una CIM de 50 ppm (ver Tabla 8). Según Holetz *et al.*, (2002) se considera que si las muestras ensayadas muestran una CIM menor a 100 µg/mL, la actividad antimicrobiana es buena.

Estos resultados pueden compararse con los obtenidos en la investigación realizada por Miranda *et al.*, (2016), donde los aceites esenciales de diversas plantas se ensayaron para analizar su actividad antimicrobiana entre estos las hojas de *T. diversifolia*, mostrando actividad antibacteriana contra cepas tanto Gram positivas como Gram negativas. La actividad del aceite contra la bacteria Gram positiva permite inferir que el mecanismo de acción de los compuestos volátiles, es capaz de inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana, por su parte en el caso de las cepas Gram negativas que

posee una pared selectiva que no permite el paso de macromoléculas y elementos hidrófobos, se puede inferir que los compuestos volátiles actúan sobre las bombas de expulsión o los diferentes mecanismos de membrana encargados de regular la entrada de sustancias a través de la membrana bacteriana (Bueno-Sánchez *et al.*, 2009).

En este mismo orden de ideas, los aceites esenciales y sus constituyentes también interactúan con la membrana bacteriana, causando trastornos a través de productos lipofílicos. Estas perturbaciones conducen a la expansión de la membrana, al aumento de la fluidez y permeabilidad de la membrana, a la alteración de las proteínas embebidas en la membrana, a la inhibición de la respiración y a la alteración de los procesos de transporte iónico en bacterias Gram positivas y Gram negativas (Nazzarro *et al.*, 2013).

Recientemente, Ferreira *et al.*, (2019), demostraron que el aceite esencial extraído de las partes aéreas de la especie *T. diversifolia* presentan actividad antibacteriana contra cepas Gram positivas y Gram negativas, corroborando con los resultados encontrados en este estudio. Además, se observa que los compuestos que son diferentes en el aceite esencial de las flores y comunes con el aceite de las hojas, al estar mezclados se crea un sinergismo capaz de inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas en este caso *Escherichia coli* hasta concentraciones inhibitorias mínimas de hasta 12,5 ppm en una escala de CIM que va de 100 ppm hasta 6,25 ppm. Por lo que se concluye, que la actividad de los terpenos por separado no explica la actividad antibacteriana presentada por el aceite esencial completo en anteriores estudios. La posible explicación a este fenómeno es el sinergismo entre los diversos componentes de la mezcla (Bueno-Sánchez *et al.*, 2009).

Con respecto al resto de los microorganismos empleados en el ensayo antibacteriano, no fueron tomados en consideración para el estudio de la concentración mínima inhibitoria (CIM), debido a que no se realizaron diluciones con concentraciones menores a 6,25 ppm, y dichas bacterias seguían presentando actividad hasta esa

dilución, por lo cual no hay una concentración que se pueda tomar como la mínima para que el aceite inhiba el crecimiento bacteriano.

**Tabla 8. Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de las Flores de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray.**

Microorganismos	Controles		Muestras / Diluciones					
		T7	TAP/T6	T5	T4	T3	T2	T1
Cepas ATCC	Control Negativo	Control Positivo	AP	100 ppm	50 ppm	25 ppm	12,5 ppm	6,25 ppm
<i>Escherichia coli</i> 25922	0	20 Pip	12	7	7	7	7	0
<i>Klebsiella pneumonia</i> 23357	0	16 Pip	18	8	8	8	8	8
<i>P. aeruginosa</i> 27853	0	18 Pip	9	9	9	9	9	9
<i>Staphylococcus aureus</i> 27923	0	25 Eri	25	8	8	8	8	8
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	0	9 Amp	24	9	7	0	0	0

Controles positivos: Pip: Piperacilina 100 µg; Eri: Eritromicina 15 µg; Amp: Ampicilina 10 µg. Zona de inhibición en mm, diámetro del disco 6 mm. Rango de concentración 100 a 6,25 ppm.

Finalmente, es importante señalar que en ambas muestras estudiadas el compuesto mayoritario fue el  $\alpha$ -pineno el cual puede ser un compuesto natural utilizado como una nueva opción terapéutica en infecciones oportunistas causadas por *Proteus mirabilis* (De Sousa *et al.*, 2017). Asimismo, se ha demostrado que el  $\alpha$ -pineno y el  $\beta$ -pineno, son capaces de inhibir significativamente el crecimiento y la viabilidad celular de la endocarditis infecciosa causada por bacterias Gram positivos. Estos resultados apoyan el reconocimiento fitoquímicos como compuestos antibacterianos alternativos para ser utilizado en formulaciones farmacéuticas (Medeiros *et al.*, 2007).

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### Conclusiones

- Los componentes químicos mayoritarios encontrados en el aceite esencial de las hojas de *T. diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, por análisis fitoquímico fueron:  $\alpha$ -pineno (54,44 %), limoneno (19,26 %), trans- $\beta$ -ocimeno (10,90 %),  $\alpha$ -farneseno (4,17 %) y el sabineno (4,03 %).
- De los compuestos volátiles identificados en el aceite de las flores de *T. diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, se reconocieron los siguientes compuestos mayoritarios:  $\alpha$ -pineno (53,55 %), limoneno (11,57 %), 2-4-hexadienal (8,99%), trans- $\beta$ -ocimeno (4,42 %), 1,8-cineol (3,68 %),  $\alpha$ -farneseno (3,17 %) y el terpineol (3,05 %).
- El aceite obtenido de las hojas de *T. diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, no tenía una capacidad inhibitoria significativa contra las cepas ATCC ensayadas.
- El aceite esencial de las flores de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, demostró ser efectivo contra bacterias Gram negativas y Gram positivas.
- La inhibición significativa positiva se obtuvo para *E. coli* (ATCC 25922) con un halo de inhibición de 7mm y una CIM de 12,5 ppm y en el caso de las cepas Gram positivas fue para *E. faecalis* (ATCC 29212) con un halo de inhibición de 7 mm y una CIM de 50 ppm.
- Finalmente, se puede concluir que la ubicación, el clima y la estación de recolección tuvo influencia en la composición química de los aceites esenciales de la *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, ya que al compararla con la composición química reportada en la literatura en otros lugares de recolección, hay variación en algunos

compuestos lo que permite inferir que debido a esta variación la actividad antibacteriana es diferente entre ellas.

### **Recomendaciones**

- Realizar estudios comparativos de la planta recolectada en un mismo tiempo en zonas con clima cálido y clima frío, para observar la influencia de los cambios climáticos y la calidad del suelo en la composición de los aceites esenciales de la especie estudiada.
- Ampliar el ensayo microbiológico, incluyendo cepas bacterianas de origen nosocomial que posean mecanismos de resistencia asociados a las membranas celulares.
- Con respecto a otros microorganismos se sugiere incluir hongos y parásitos en futuros ensayos, puesto que estudio previos demuestran que es posible que los aceites posean actividad antimicótica y antiparasitaria.

## REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

Adams, R. P. (1995). **Identificación of esencial oils components by gas chromatography/ mass spectroscopy.**

Agboola, O.O., Oyedeji, S., Olowoyo, J.O., Ajao, A., and Aregbesola, O. (2016). Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil extracted from *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) flower. **Bioresour. Bioprocess**, 1: 169–176.

Albarracín, G., & Gallo, S. (2003). **Comparación de dos métodos de extracción de aceite esencial utilizando Piper Aduncum (Cordoncillo) procedente de la zona cafetera.** Universidad Nacional de Colombia, Sede Manizales.

Albornoz, A. (1980). **Productos naturales sustancias y drogas extraídas de las plantas.** Caracas: Publicaciones de la Universidad Central de Venezuela.

Ambrósio, S. R., Oki, Y, Heleno, V. C., Chaves, J. S., Nascimento, P. G., Lichston, J. E., Constantino, M. G., Varanda, E. M., and Costa, F. B. (2008). Constituents of glandular trichomes of *Tithonia diversifolia*: Relationships to herbivory and antifeedant activity. **Phytochemistry**, 69: 2052–2060.

Arias, F. (2012). **El proyecto de investigación.** Sexta edición. Editorial Episteme. Caracas-Venezuela.

Alarcón, L., Peña, A., Velasco, J., Usubillaga, A., Contreras-Moreno, B., Rojas, L., Ramírez, D., Aparicio, R. (2016). Composición química y evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Espeletia schultzii* Wedd (Asteraceae) recolectada en el estado Trujillo – Venezuela. Universidad de los Andes. Venezuela. **Revista ACADEMIA**, 15 (35): 69-79.

Alza, N., and Murray A (2016). Chemical Constituents and Acetylcholinesterase Inhibition of *Senecio ventanensis* Cabrera (Asteraceae). **Rec. Nat. Prod.**, **10** (4): 513-518.

Ausina, V., and Moreno, S. (2005). **Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. Editorial Médica Panamericana. Madrid- España.

Ávalos, A., y Pérez, E. (2009). Reduca (Biología). **Serie Fisiología Vegetal**, **2**: 119-145.

Bandoni, A. (2000). **Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica**. 2da. Edición. Editorial Universidad Nacional de la Plata. La Plata. Argentina.

Benites, J., Bravo, F., Rojas, M., Fuentes, R., Moiteiro, C., and Florencia, V. (2011). Composition and antimicrobial screening of the essential oil from the leaves and stems of *Senecio atacamensis* Phil. from Chile. **Journal of the Chilean Chemical Society**, **56** (2): 712 – 714.

Bordoloi, M., Barua, N., and Ghosh, A. (1996). An artemisinic acid analog from *Tithonia diversifolia*. **Phytochemistry**, **41** (2): 557-59.

Bruneton, J. (2001). **Plantas tóxicas: vegetales peligrosos para el hombre y los animales**. 1 ed. España: Editorial Acribia, S.A.

Bueno-Sánchez, J. G., Martínez-Morales, J. R., y Stashenko, E. (2009). Actividad antimicobacteriana de terpenos. **Salud UIS**, **41**: 231-235.

Buitrago, D., Morales, A., Rojas-Fermín, L., Lucena, M., Araujo, L., Moujir, L., (2016). Chemical composition and biological activity of essential oil of *Achyrocline ramosissima* Britton ex Rusby (Asteraceae). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, **15** (1): 69-76.

Chagas-Paula, D., Oliveira, R., Rocha, B., and Da Costa, F. (2012). Ethnobotany, Chemistry, and Biological Activities of the Genus *Tithonia* (Asteraceae). ***Chemistry & Biodiversity***, **9**: 210-235.

Chiliquinga, I. (2006). ***Extracción del aceite esencial de las semillas de (Elettaria cardamomum) para uso en la industria alimenticia***. Ambato, Ecuador. Universidad Técnica de Ambato. Disponible en:<http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/3340>

Chukwuka, K. S., and Ojo, O. M. (2014). Extraction and Characterization of Essential Oils from *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. ***American Journal of Essential Oils and Natural Products***, **1** (4): 1-5.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2014). ***Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement***. Wayne, Pennsylvania: CLSI.

Cruz, L., & Vela, K. (2011). ***Evaluación de la actividad antibacteriana de aceite esencial y extracto de la especie Tithonia diversifolia Helms A. Gray y Wedella trilobata (L) contra especie de origen nosocomial***. [Tesis Pregrado]. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela.

Da Silva, G. J. & Domingues, S. (2016). Insights on the horizontal gene transfer of carbapenemase determinants in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. ***Microorganisms***, **4** (3):E29.

Davies, N. W. (1990). Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silica and carbowax 20M. Phases. ***Journal of Chromatography A***, **502**, 1-24.

De Sousa, L., Costa, F. T., Nunes, G., Da Silva, L. F., and Benvindo, F. S. (2017). Antibacterial Potential Of The Alpha-pinene Positive Enantiomer Against The Strain

*Proteus mirabilis*. MOL2NET, **International Conference Series on Multidisciplinary Sciences**, **3**: 1-6.

Del Vitto, L. A., Petenatti, E. M. (2015). Asteráceas de importancia económica y ambiental Segunda parte: Otras plantas útiles y nocivas. **Multequina**, **24**: 47-74.

Do Rocio, M., and Bonissoni, C. (2012). Leaf and stem microscopic identification of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, **48**, (1): 109-116.

Domínguez, X. (1973). **Método de Investigación Fitoquímica**. Primera edición. Editorial LIMUSA. México D. F.

Dorcas, O., Moronkola, Isiaka, O., Walker, T., Setzer, and W., Oyewole, I. (2007). Identification of the main volatile compounds in the leaf and flower of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) Gray. **Journal of Natural Medicines**, **61**: :63-66.

Ekalu, U., Ikpeme, E., Etta, S., and Ekpo, P. (2015). Effect of Aqueous Extract of Tigernut (*Cyperus esculentus* L.) on Sperm Parameters and Testosterone Level of Male Albino Rats. **Asian Journal of Biotechnology**, **7** (1): 39-45.

Fabri, R.L., Nogueira, M.S., Dutra, L.B., Bouzada, M. L., y Scio, E. (2011). Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. **Rev. Bras. Plantas Med.**, **13**: 183–189.

Ferreira, A. L., Lobato, A., Lopes, R., De Menezes, R., Ferreira, C., and Moreira, S. S. (2019). Chemical Characterization, Antioxidant, Cytotoxic and Microbiological Activities of the Essential Oil of Leaf of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray (Asteraceae). **Pharmaceuticals**, **12**, 34: 1-14. Doi:10.3390.

Gakuubi, M., Wanzala, W., Osundwa, E. M., and Alwala, J. (2016). Chemical composition of essential oil of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray from the Southern slopes of Mount Elgon in Western Kenya. **Indian Journal of Ethno-Phytopharmaceuticals, IJEPP**, 2, (2): 72-83.

Gómez, M. (2006). **Introducción a la metodología de la investigación científica**. Córdoba Argentina. Editorial brujas. 85-86.

González, D. (2005). Nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de la malaria. **Enf. Emerg.**, 7 (1): 40-3.

González-Castillo, J., Von-Hessberg, C., Narváez-Solarte, W. (2014). Características botánicas de *Tithonia diversifolia* (Asterales: Asteraceae) y su uso en la alimentación animal. **Bol.Cient. Mus. Hist. Nat.**, 18 (2): 45-58.

Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, P. (2010). **Metodología de la Investigación**. Quinta edición. Editorial McGrawHill. México.

Heywood, V. H. (1985). **Las plantas con flores**. Ed. Reverté. España.

Holetz, F. B., Pessini, G. L., Sanches, N. R., García, C. D., Vataru, N. C., and Prado, D. B. (2002). Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, 97 (7): 1027-1031.

Izco, J., Barreno, E., Brugués, M., Costa, M., Devesa, J. A., Fernández, F., Gallardo, T., Llimona, X., Prada, C., Talavera, S. y Valdés, B. (2004). **Botánica**. Segunda edición. Editorial Mc GRAW-HILL-Interamericana. Madrid, España.

Kareru, P. G., Keriko, J. M., Kenji, G. M., Thiongo, G. T., Gachanja, A. N., and Mukiira, H. N. (2010). Antimicrobial Activities of Skincare Preparations from Plant Extracts. **Afr. J. Trad. CAM.**, 7, (3): 214–218.

Kováts E. (1958). Retention indices aliphatischer, halogenide, aldehyde und ketone. **Helvetica Chimica Acta, XLI**, 1915.

Kuklinski, C. (200). **Farmacognosia**. 1 ed. Barcelona: Ediciones Omega. León-Rosales, S., Arredondo-Hernández, R., yLópez-Vidal, Y. (2015). La resistencia a los antibióticos: Un grave problema global. **Gac Med Mex., 151**: 681-9.

Lezcano-Más, Y., Soca-Pérez, M., Roque-López, E., Ojeda-García, F., Machado-Castro, R., y Fontes-Marrero, D. (2016). Forraje de *Tithonia diversifolia* para el control de estrongílicos gastrointestinales en bovinos jóvenes. **Pastos y Forrajes, 39** (2): 133-138.

Linthoingambi, W. and Mutum, S. (2013). Antimicrobial activities of different solvent extracts of *Tithonia diversifolia* (Hemsely) A. Gray. Asian. **Journal of Plant Science and Research, 2013**, 3 (5): 50-54.

Londoño, D., & Fernando L. D. (2016). **Determinación de la actividad bactericida y fungicida in vitro de Tithonia diversifolia (Helmsl) A. Gray**. Universidad Pontificia Bolivariana. Facultad de Ingeniería [Tesis Maestría]. Medellín-Colombia.

Marcano, D., & Hasegawa, M. (2002). **Fitoquímica Orgánica**. UCV-CDHT. Caracas-Venezuela.

Mauricio, R, M., Calsavara, L., Ribeiro, R., Pereira, L., Freitas, D., Paciullo, D., Barahona, R., Rivera, J., Chará, J., and Murgueitio, E. (2017). Feeding ruminants using *Tithonia diversifolia* as forage. **Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research 5** (4): 00146.

Medeiros L. A., eite, De Oliveira L. E., Leite E., Formiga M. M., Nogueira T. V., and Almeida I. de Medeiros. (2007). Inhibitory effect of  $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 43** (1): 121-126.

Miranda, C., Cardoso, M., Batista, L., Rodríguez, L., Rodrigues, A., and Figueiredo, Ana. (2016). Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogénicas. **Rev. Ciênc. Agron., 47** (1): 213-220.

Miranda, M., Varela, R., Torres, A., Molinillo, J., Gualtieri, S., and Macías, F. (2015). Phytotoxins from *Tithonia diversifolia*. **Journal of natural products, 78**: DOI - 10.1021/acs.jnatprod.5b00040

Munita, J. M., and Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiol. Spectr., 4** (2). doi: 10.1128/microbiolspec.

Murray, P., Rosenthal, K., y Pfaller, M. (2009). **Microbiología Médica**. Sexta edición. Editorial ELSEVIER MOSBY. Barcelona-España.

Mustonen, P. S. J., Oelbermann, M., and Kass, D. C. L. (2015). Biomass production and phosphorus use efficiency in two *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray genotypes. **Journal of Plant Nutrition, 38**:1083–1096.

Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., and De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals (Basel), 6**, (12); 1451-74.

NCCLS. (2004). **Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; approved guideline**. NCCLS document EP5-A2. 2 nd ed. Wayne, Pennsylvania.

Obafemi, C., Sulaimon, T., Akinpelu D., and Olugbad, T. (2006). Antimicrobial activity of extracts and a germacranolide type sesquiterpene lactone from *Tithonia diversifolia* leaf extract. **Afr. J. Biotechnol., 5** (12): 1254-8.

Ochoa, K., Paredes, L. R., Bejarano, D., y Silva, R. (2012). Extracción, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd (Wiskataya). **Scientia Agropecuaria**, **3**: 291-302.

Olaya, J. M. & Méndez, J. (2003). **Guía de plantas y productos naturales**. Bogotá Colombia. Editorial CAB ciencia y tecnología. 17-20.

Olivaro C. (2015). **Estudio de Metabolitos Antibacterianos de la Flora Medicinal Nativa de Uruguay**. [Tesis Doctoral]. Universidad de la República Facultad de Química Montevideo.

Oliva, A., Garzoli, S., Sabatino, M., Tadić, V., Costantini, S., Ragno, R., and Božović, M. (2018). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don fil. (Asteraceae) from Montenegro. **Natural Product Research**, DOI: 10.1080/14786419.2018.1538218

Ortuño, M. (2006). **Manual Práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes**. España. Aiyana Ediciones. 7-8.

Oso, B. A., and Ogunnusi, T. A. (2017). Antibacterial Activity of Methanolic Extracts of *Euphorbia heterophylla* and *Tithonia diversifolia* against Some Microorganisms. **European Journal of Medicinal Plants**, **20** (3): 1-8.

Peredo, H, Palou, E, y López, A. (2009). Aceites Esenciales: Métodos de Extracción. **Temas Selectos de Ingeniería de alimentación**, **3**, (1):24-32.

Pérez, A., Montejo, I., Iglesias, J. M., López, O., Martín, G. J., García, D. E., Milián, I. y Hernández, A. (2009). *Tithonia diversifolia* (Helms.) A. Gray. **Pastos y Forrajes**, **32**, (1): 1-15.

Pontes, S. I., Chagas-Paula, D., Fabiane, R., Tiozzi, J., De Oliveira, S. E., Abreu, M. M., *et al.*, (2018). Essential oils from *Tithonia diversifolia* display potent anti-oedematogenic effects and inhibit acid production by cariogenic bacteria. ***Journal of Essential Oil Research***, **31**, (1): 43-52.

Prats, G. (2008). ***Microbiología clínica***. Madrid: Editorial Médica Panamericana.

Prescott, L., Harley, L., and Klein, D. (2004). ***Microbiología***. Quinta edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. España.

Rasaga, C., Tepora, M., Rideout, J. (2007). Terpenoids from *Tithonia diversifolia*. ***JRSCE***. **4** (1): 1-7.

Rivera, J. E., Chará, C., Gómez-Leyva, J., Ruíz, T., y Barahona R. (2018). Variabilidad fenotípica y composición fitoquímica de *Tithonia diversifolia* A. Gray para la producción animal sostenible. ***Livestock Research for Rural Development***, **30**, (12): SP.

Rocha, C., Reynolds, N. D., y Simons, M. P. (2015). Resistencia emergente a los antibióticos: Una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud. ***Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública***, **32** (1): 139-45.

Romero, C. R. (2007). ***Microbiología y Parasitología Humana***. Tercera edición. Editorial Médica Panamericana S. A. México D. F.

Romo, A. (2006). ***Química de la Flora Mexicana***. Coyoacán México. Instituto de Química de la Universidad Nacional autónoma de México. 39-40.

Rondón, M., Velasco, J., Morales, A., Rojas, J., Carmona, J., Gualtieri, M. and Hernández V. (2005). Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Salvia leucantha* Cav. cultivated in Venezuela Andes. ***Revista latinoamericana Quimioterapia***, **33**, 40-44.

Rosa, M. & Prieto, J. (2006). **Microbiología en Ciencias de la Salud, conceptos y aplicaciones**. Madrid: Elsevier España S.A.

Ruiz, A. & Moreno, S. (2005). **Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica**. Madrid España. Editorial Médica Panamericana. 337.

Ruiz, C., Díaz, C., y Rojas, R. (2015). Composición química de aceites esenciales de 10 plantas aromáticas peruanas. **Revista de la Sociedad Química del Perú, 81**, (2): 81-94.

Sánchez, E., & Genta, S. (2007). Yacón: **Un potencial producto natural para el tratamiento de la diabetes**. En: Isla, M.I. (Comp.). Avances de la Farmacobotánica en Latinoamérica (2004-2007). Tucumán.

Sandra, P. & Bicchi, C. (1987). **Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis**. Heidelberg.

Sanz, B. E. (2004). **Aromaterapia**. Editorial Hispano Europea. 11 -12.

Sepúlveda, G., Porta, H., y Rocha, M. (2007). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. **Revista Mexicana de Fitopatología, 21** (3): SP.

Stashenko, E. (2009). **Aceites esenciales**. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander.

Straus, S., and Hancock, R.E. (2006), Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. **Biochim Biophys Acta, 1758** (9): 1215-23.

Takeoka G. R., Guentert M., Smith S. L. and Jennings W. (1986). **Changes in aroma concentrates during storage. In biogeneration of aromas.** T.H. Parliment and R. Croteau eds. Washington DC, 65.

Terry, S. A., Ribeiro, R. S., Freitas, D. S., Delarota, G. D., Pereira, L. G. R., Tomich, T. R., Maurício, R. M., and Chaves, A. (2016). Effects of *Tithonia diversifolia* on *in vitro* methane production and ruminal fermentation characteristics. **Animal Production Science, 56:** 437-441.

Toro, I. & Parra, R. (2006). **Metodología de la Investigación.** Medellín Colombia. Fondo Editorial Universidad Eafit. 134-135.

Tortora, G., Funke, B. & Case, C. (2007). **Introducción a la Microbiología.** 9ª edición. Editorial Medica Panamericana, pp.988.

Troncoso, C., Pavez, M., Santos, A., Salazar, R., y Barrientos, L. (2017). Implicancias Estructurales y Fisiológicas de la Célula Bacteriana en los Mecanismos de Resistencia Antibiótica. **Int. J. Morphol., 35 (4):**1214-1223.

Vanaclocha, B., & Cañigüeral, S. (2003). **Fitoterapia.** Barcelona España. Editorial El Sevier. 29-30.

Velasco, R., Villada, H. y Carrera, J. (2007). Aplicaciones de los fluidos supercríticos en la agroindustria. **Información tecnológica, 18 (1):** 53-66.

Vivot, E., Sánchez, C., Cacik, F., y Sequin, C. (2012). Actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora de Entre Ríos (Argentina). **Cienc. Docencia tecnol., 45:** 177-189.

Wanzala, W., Osundwa, E. M., Alwala, O., and Gakuubi, M. M. (2016). Chemical composition of essential oil of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray from the Southern slopes of Mount Elgon in Western Kenya. **IJEPP, 2 (2):** 72-83.